Nancy-Université
INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources,Procédés, Produits, Environnement

UMR 1121 Nancy Université - INRA Agronomie et Environnement Nancy-Colmar

ENSAIA - INPL

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL

En Sciences Agronomiques

Par

Lama HAMDAN

Caractérisation de la communauté fongique impliquée dans la minéralisation de soufre organique dans les rhizosphéres de colza et d'orge

Soutenue publiquement le 09Novembre2010, devant le jury composé de :

M. Christian STEINBERG	Directeur de Recherches, INRA, Dijon	Rapporteur
Mme Sylvie RECOUS	Directeur de Recherches, INRA, Reims	Rapporteur
M. Patrice REY	Professeur, ENITA, Bordeaux	Examinateur
M. Armand GUCKERT	Professeur Emérite, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinateur
Mme Sophie SLEZACK-DESCHAUMES	Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinatrice
M. Emile BENIZRI	Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinateur

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce Doctorat a été réalisé à l'Unité Mixte de Recherche Agronomie et Environnement, Nancy-Colmar. Je tiens à exprimer, en quelques lignes, ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ce travail de recherche.

Je remercie le **Gouvernement Syrien** d'avoir financé ce doctorat.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur **Armand Guckert**, Professeur Emérite à l'ENSAIA, qui m'a donné l'opportunité de suivre mes études en France et qui m'a également offert la possibilité de travailler au sein du laboratoire Agronomie et Environnement. Merci Monsieur Guckert pour vos précieux conseils, en toutes occasions.

Tout le respect et tous mes chaleureux remerciements à Monsieur **Emile Benizri**, Professeur à l'ENSAIA et Directeur de cette recherche. Sa disponibilité, son écoute et l'attention soutenue qu'il a manifestée ont très précieuses pour moi ; je le remercie de tout mon coeur.

J'adresse également mes remerciements à Madame **Sophie Deschaumes-Slezack,** Maître de Conférences à l'ENSAIA. Je la remercie sincèrement pour sa patience, pour le temps qu'elle m'a consacré, notamment pour l'ensemble des expérimentations réalisées, ainsi que pour ses conseils avisés tout au long de cette thèse.

Comment oublierais-je Monsieur **Phuy-Chhoy Vong**, Ingénieur d'étude à l'ENSAIA? Je le remercie pour sa collaboration soutenue tout au long de ma thèse. Ses conseils et sa connaissance du sujet m'ont été précieux quotidiennement. Je n'oublierai pas sa disponibilité et sa gentillesse.
J'aimerais remercier Monsieur **Frédéric Bourgaud**, Professeur à l'ENSAIA et Directeur du laboratoire, qui m'a accueilli dans l'équipe de recherche.

Merci également à Messieurs **Yves Leroux** et **Alain Hehn**, Maîtres de Conférences, pour leur aide aussi bien en statistiques qu'en biologie moléculaire.

Je voudrais vivement remercier les chercheurs qui ont participé au Jury de cette thèse : Madame **Sylvie Recous**, Directeur de Recherches à l'INRA de Reims, Monsieur **Christian**

Steinberg, Directeur de Recherches à l'INRA de Dijon, Monsieur **Patrice Rey**, Professeur à l'ENITA de Bordeaux ainsi que Monsieur **Armand Guckert**, Professeur Emérite à l'ENSAIA.

Durant ce Doctorat, j'ai également eu la chance de bénéficier des conseils de chercheurs dans le cadre de mon Comité de Pilotage. Merci à Madame **Sylvie Recous**, Directeur de Recherches à l'INRA de Reims et à Monsieur **Alain Hehn**, Maître de Conférences à l'ENSAIA.

Je tiens à présenter toute ma sympathie et ma reconnaissance pour les discussions que nous avons eues mais aussi pour les bons moments passés en salle de pause et en salle de manip à **Séverine Piutti, Ségolène Christophe**, **Flore Biteau**, **Mickael Cregut, Etienne Gaujour**, **Romain Larbat**, **Benoît Mignard, Alexandre Olry** et **Thamara Olivier**

Enfin, un grand merci à **mes parents**, **ma famille** et à **mon mari Nerouz**, pour leur soutien sans faille et continuel.

SOMMAIRE

CONTEXTE GENERAL

P 12

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

P 17

1. La rhizosphère p 17

1.1. Définition p 17

1.2. Les rhizodépôts p17

1.3. Facteurs modulant la rhizodéposition p 18

1.3.1. Influence de la plante p 18

1.3.2. L'environnement abiotique de la plante p 19

1.3.3. L'environnement biotique racinaire p 20

1.4. Conséquences de la rhizodéposition sur les communautés microbiennes rhizosphériques p 20

1.5. Influence de la rhizodéposition sur la biodisponibilité des éléments nutritifs p 22

1.5.1. Influence directe p 22

1.5.2. Influence indirecte p 22

2. Assimilation du soufre par les plantes p 23

2.1. Besoins des plantes en soufre p 23

2.2. Absorption du soufre par les plantes p 24

2.2.1. Absorption racinaire des sulfates p 25

2.2.2. Assimilation des sulfates p 25

2.2.3. Autres formes de soufre participant à la nutrition soufrée de la plante p 27

2.3. Contraintes agronomiques liées au soufre p 28

3. Les transformations du soufre dans le sol p 32

3.1. Le soufre dans le sol p 32

3.1.1. Le soufre minéral p 32

3.1.2. Le soufre organique p 33

3.2. Transformations du soufre dans le sol p 34

3.2.1. Immobilisation (organisation) du soufre par la microflore p 35
3.3.2. La minéralisation du soufre p 36
3.2.2.1. Le modèle de McGill et Cole (1980) **p 36**
3.2.2.2. Enzymes microbiennes impliquées dans la minéralisation **p 37**
3.2.2.2.1. Enzymes de la voie de minéralisation biologique **p 37**
3.2.2.2.2. Enzymes de la voie de minéralisation biochimique **p 38**
4. Rôle des communautés fongiques dans la dynamique du soufre p 41
4.1. Quelques éléments de l'écologie des champignons dans les sols p 41
4.1.1. Biomasse fongique et diversité spécifique dans les sols p 42
4.1.2. Fonctions remplies par les champignons saprophytes dans les agrosystèmes p 44
4.2. Métabolisme soufré chez les champignons filamenteux p 45
4.2.1. Les différentes formes de S assimilables par les champignons p 45
4.2.2. Utilisation des esters de sulfate : rôle de l'arylsulfatase p 47
5. Objectifs de la thèse p 48

MATERIEL ET METHODES

1. Caractéristiques des plantes étudiées p 53
2. Caractéristiques du sol étudié p 53
3. Protocoles expérimentaux p 54
3.1. Expérimentation en phytotron p 54
3.2. Expérimentation au champ p 60
3.3. Expérimentation sur souches fongiques isolées p 61
4. Méthodes analytiques p 65
4.1. Indicateurs de la dynamique du soufre p 65
4.1.1. Dosage de l'activité arylsulfatase p 65
4.1.1.1. Dosage de l'activité ARS sur sol **p 65**
4.1.1.2. Dosage de l'activité ARS sur souches fongiques ARS$^+$ **p 66**
4.1.2. Dosage des sulfates p 68
4.2. Indicateurs de la rhizodéposition p.69
4.2.1. Dosage du carbone soluble racinaire p 69
4.2.2. Dosage du carbone labile du sol p 69
4.3. Caractérisation de la biomasse microbienne p 70

4.3.1. Mesure de la biomasse carbonée et azotée p 70

4.3.2. Caractérisation de la microflore fongique p 71

4.3.2.1. Estimation de la taille de la communauté fongique totale cultivable et de la communauté fongique fonctionnelle (ARS^+) fonctionnelle **p 71**

4.3.2.1.1. Préparation des suspensions-dilutions de sol **p 71**

4.3.2.1.2. Estimation de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable **p 71**

4.3.2.1.3. Estimation de la taille de la communauté fongique totale cultivable **p 73**

4.3.2.2. Caractérisation taxonomique **p 73**

4.3.2.2.1. Extraction de l'ADN de souches fongiques fonctionnelles **p 73**

4.3.2.2.2. Conditions de PCR et analyse RFLP **p 74**

4.3.2.3. Analyse de la structure génétique de la communauté fongique du sol **p 75**

4.4. Identification des séquences ARS p 77

4.4.1. Amorces dégénérées utilisées p 77

4.4.2. Amplification et clonage des séquences ARS p 78

4.5. Induction de l'activité ARS chez différentes souches en conditions de croissance limitantes en SO_4^{2-} p 79

4.5.1. Etude de la croissance des souches en conditions limitantes en SO_4^{2-} p 79

4.5.2. Conditions d'induction de l'activité ARS selon la disponibilité en SO_4^{2-} dans le milieu p 80

RESULTATS

Chapitre 1. Caractérisation de la communauté fongique cultivable minéralisant les esters de sulfate

1. Introduction p 87

2. Résultats et Discussion

2.1. Caractérisation de la structure génétique des communautés fongiques globales p 89
2.2. Mise au point d'un milieu de culture différentiel permettant de détecter les champignons du sol possédant l'activité arylsulfatase p 93
2.2.1. Mise au point du milieu de culture p 93
2.2.2. Validation de l'utilisation du milieu de culture p 95
2.3. Caractérisation des souches fongiques isolées p 97
2.3.1. Caractérisation taxonomique p 97
2.3.2. Confirmation de l'activité ARS p 102

Chapitre 2. Etude de l'induction de l'activité arylsulfatase en réponse à la disponibilité en soufre du milieu chez différentes souches de champignons

1. Introduction p 107
2. Résultats et Discussion
2.1. Cinétiques de croissance des différentes souches fongiques en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu de culture p 109
2.2. Induction de l'activité arylsulfatase en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu de culture p 116
2.3. Relation entre croissance et activités arylsulfatases, selon la disponibilité en S minéral du milieu p 127
2.4. Activités arylsulfatases et nature du S disponible p 128
2.5. Identification de séquences ARS putatives p 130

Chapitre 3. Effet du couvert végétal sur la communauté fongique fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate

1. Introduction p 137
2. Résultats et Discussion
2.1. Analyse des différentes variables indépendamment p 142
2.1.1. Estimation de la rhizodéposition p 142
2.1.2. Biomasse microbienne p 145
2.1.3. Dynamique de S p 151
2.2. Analyses mutivariées p 163

2.3. Corrélations entre variables **p 170**

2.3.1. Matrice de corrélation totale **p 170**

2.3.2. Matrice de corrélation « sol » **p 173**

2.3.3. Matrice de corrélation « orge » **p 175**

2.3.4. Matrice de corrélation « colza » **p 177**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **p 183**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **p 193**

Annexes **p 237**

CONTEXTE GENERAL

CONTEXTE GENERAL

Le soufre (S) est l'un des six macro-éléments (5^{ième} élément majeur) requis pour la croissance et le développement des organismes vivants (Kertesz *et al*., 2007). Il intervient dans de nombreuses fonctions métaboliques et, en tout premier lieu, dans la synthèse des protéines, en tant que constituant de deux acides aminés : la cystéine et la méthionine. Ces deux acides aminés sont également des précurseurs des enzymes impliquées dans la synthèse de la chlorophylle, de certains co-enzymes (co-enzyme A…) et de vitamines (biotine, thiamine…). Par ailleurs, le S intervient dans la résistance des plantes aux stress biotiques ou abiotiques. En effet, la cystéine et la méthionine interviennent dans la synthèse de composés possédant un groupement thiol (glutathion, thiorédoxine) qui jouent un rôle dans les réactions d'oxydo-réduction (Leustek et Saito, 1999 ; Noctor *et al*., 2002 ; Tausz *et al*., 2003 ; Droux, 2004). Ces acides aminés sont également des constituants des métallothionines et des phytochélatines qui sont impliquées dans la résistance des plantes aux métaux lourds (Van Hoof *et al*., 2001 ; Verkleij *et al*., 2003). Enfin, le S joue un rôle important dans les mécanismes de protection des plantes vis à vis des agents pathogènes, soit en tant que constituant de composés biocides, comme par exemple les glucosinolates et les alliins (Bloem *et al*., 2005), soit par l'émission à partir des feuilles de composés soufrés volatils à activité fongicide (Walker et Dawson, 2002).

Le S est absorbé par les racines des plantes sous forme inorganique (sulfates, SO_4^{-2}). Or, le S est essentiellement présent dans les sols sous des formes organiques, indisponibles pour la plante. De plus, en Europe de l'Ouest, des déficiences en S ont été observées depuis une vingtaine d'années sur certaines cultures, notamment sur les crucifères et les céréales (Tabatabai, 1984 ; Zhao *et al*., 2006). Plusieurs facteurs ont contribué à l'apparition de ces carences comme la diminution des émissions soufrées dans l'atmosphère et l'utilisation d'engrais ne contenant plus de S libre (Scherer, 2001). En conséquence, la bio-disponibilité de S pour la plante dépend plus étroitement des processus de transformation du S organique du sol. Ces transformations sont assurées par une microflore, majoritairement hétérotrophe pour le carbone (C) et qui, jusqu'à récemment, a été considérée comme «une boîte noire» génératrice de flux.

Cette étude vise donc à caractériser, génétiquement et fonctionnellement, une composante de la microflore impliquée dans la minéralisation de S, à savoir la communauté fongique, et de mieux comprendre sa dynamique sous deux couverts présentant des exigences contrastées en

S, le colza (*Brassica napus* L.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.). En effet, même s'il est admis que les communautés fongiques jouent un rôle important dans les écosystèmes notamment en tant que décomposeurs des matières organiques (Bridge *et al*., 2001 ; Gomes *et al*., 2003), les connaissances actuelles sur la biodiversité et les fonctions écologiques remplies par les communautés fongiques dans les sols et en particuliers dans les agrosystèmes sont encore très limitées (Anderson *et al*., 2004). C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, notre choix s'est porté sur cette communauté.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. La rhizosphère

1.1. Définition

Le terme « rhizosphère », défini pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner, désigne le volume de sol soumis à l'influence des racines vivantes. Cette zone du sol se caractérise par des conditions bio-physico-chimiques différentes de celles rencontrées dans le sol non rhizosphérique (Bowen et Rovira, 1999). En effet, les racines, lors de leur développement, contribuent à modifier les propriétés structurales du sol en terme de compaction (Whiteley et Dexter, 1984 ; Young, 1998). Par ailleurs, le prélèvement d'eau, de minéraux par les racines mais aussi la sécrétion de protons induisent des modifications des propriétés physico-chimiques du sol (modification du pH, de la concentration en éléments minéraux dans la solution de sol…). Enfin, la libération dans le sol de composés carbonés plus ou moins labiles, les rhizodépôts, selon le processus de rhizodéposition, se traduit par une augmentation de la taille des communautés microbiennes («effet rhizosphère») et de leur activité (Merbach *et al*., 1999 ; Benizri *et al*., 2002, 2007).

1.2. Les rhizodépôts

La rhizodéposition a été mise en évidence pour la première fois en 1894 par Dayer (Nguyen, 2003). Au cours de leur développement, les racines libèrent divers composés organiques dans leur environnement proche. Ainsi, en moyenne, 17% du C net fixé par la photosynthèse et 40% à 90% du C transféré vers les racines sont libérés au niveau des racines (Lynch et Whipps, 1990 ; Nguyen, 2003). Le phénomène de rhizodéposition est reconnu d'une grande importance écologique (Nguyen, 2003). En effet, le flux de rhizodépôts, de la plante vers le compartiment tellurique, constitue une source de C et d'énergie pour la microflore du sol impliquée dans des fonctions majeures telles que les cycles des éléments nutritifs, des polluants...

Plusieurs types de rhizodépôts peuvent être définis, selon leur mode de libération par les racines (Grayston *et al*., 1996) :

Les exsudats : ils représentent 2 à 4% des rhizodépôts et comprennent :

- Les diffusats : composés de faible poids moléculaire diffusant hors de la racine, principalement aux apex racinaires, en réponse à un gradient de concentration. Trois classes de molécules constituent ces diffusats : les sucres, les acides organiques, les acides aminés.
- Les gazs : les racines libèrent des composés volatils (CO_2, éthylène) pour faciliter leur métabolisme interne et des aldéhydes (acétaldéhyde, propionaldéhyde) (Rovira, 1956, 1969, 1973), qui peuvent influencer à distance la germination de spores fongiques (Vancura *et al*., 1977 ; Mol, 1995 ; Prescott *et al*., 1999).

Les sécrétions : il s'agit de molécules libérées de manière active. Ces sécrétions comprennent les mucilages (polysaccharides de haut poids moléculaire, composés de fucose, galactose, glucose et arabinose) sécrétés aux apex racinaires par exocytose et des enzymes (phosphatases, nucléases, invertases…).

Les débris ou lysats cellulaires : il s'agit de cellules desquamées de la coiffe racinaire, de fragments de paroi cellulaire.

Les zones d'exsudation participent à créer des gradients de densité et d'activité microbiennes le long d'un axe racinaire (Baudoin *et al*., 2003). La libération des exsudats s'effectue soit entre les cellules de l'épiderme soit au travers des parois, essentiellement à l'arrière de l'apex racinaire, au niveau de la zone d'élongation, des poils absorbants et des ramifications (Mc Dougall et Rovira, 1970 ; Rovira, 1973).

1.3. Facteurs modulant la rhizodéposition

Les composés libérés par les racines sont très divers et plusieurs facteurs contribuent à l'évolution de la nature et de la quantité de ces rhizodépôts (Grayston *et al*., 1996 ; Butler *et al*., 2003). Il s'agit en particulier de la plante, de l'environnement abiotique et de l'environnement biotique de la plante.

1.3.1. Influence de la plante

La rhizodéposition varie selon l'espèce végétale, le cultivar et le stade de développement de la plante. Différentes études réalisées sur des plantes herbacées mais aussi sur des espèces

ligneuses ont montré que les exsudats varient en termes de qualité mais aussi de quantité selon les espèces végétales considérées. Par exemple, des différences de rhizodéposition entre une graminée, l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et une crucifère, le colza (*Brassica napus* L.) ont été mises en évidence (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition des exsudats de colza (d'après Haggquist *et al*., 1984 ; Odham *et al*., 1986 ; Zhang *et al*., 1997) et d'orge (d'après Guckert 1985 ; Mench 1989)

Exsudats	**COLZA**	**ORGE**
Acides aminés	**Glycine**, **alanine**, valine, leucine, isoleucine, **phénylalanine**, **cystéine**, aspartate, glutamate, proline	Leucine, isoleucine, valine, **acide aminobutyrique**, **asparagine**, **sérine**, glutamate, aspartate
Acides organiques	Succinate, malate, citrate	**Oxalate**, malate, succinate, **lactate**, **fumarate**, **glycolate**
Sucres	Glucose, **saccharose**, **C organique dissout**	Glucose, **galactose**, **fructose**, **arabinose**, **xylose**, **ribose**, **rhamnose**, **maltose**, **raffinose**

L'exsudation varie également quantitativement et qualitativement avec l'âge de la plante. En effet, l'exsudation s'avère plus importante aux stades végétatifs par rapport aux stades reproducteurs. En effet, la rhizodéposition diminue en fin de période végétative en raison de la force de puits croissante que constituent les organes reproducteurs (Gregory et Atwell, 1991 ; Swinnen *et al*., 1994).

1.3.2. L'environnement abiotique de la plante

Différents facteurs abiotiques peuvent moduler la rhizodéposition telles que la concentration en éléments minéraux, l'alimentation hydrique, la lumière, la température, la concentration en CO_2 atmosphérique, la défoliation. A titre d'exemple, le stress hydrique influence l'exsudation du colza, les plantes « stressées » exsudant davantage après réhydratation (4,4 mg C g^{-1} de tissu) que les plantes non stressées (2,1 mg C g^{-1} de tissu) (Svenningsson *et al*., 1990). Le maïs répond de la même manière à un stress hydrique en multipliant par deux son taux d'exsudation (de 0,2 à 0,4 ml d'exsudats h^{-1} $plante^{-1}$) (Zhang *et al*., 1995).

1.3.3. L'environnement biotique racinaire

La présence de microorganismes dans la rhizosphère augmente le phénomène de rhizodéposition et en particulièrement l'exsudation (Lynch et Whipps, 1990 ; Whipps, 1987, 1990). Pour une plante cultivée sur sol stérile, 5 à 10% des photo-assimilats sont exsudés contre 12 à 18% pour une culture réalisée sur sol non stérile (Barber et Martin, 1976). Cette augmentation de l'exsudation résulte de la présence de microorganismes libres ou symbiotiques dans l'environnement racinaire, qui consomment les exsudats et augmentent ainsi la force de puits du compartiment tellurique. Ces microorganismes entretiennent un gradient de diffusion des composés C simples, de l'intérieur vers l'extérieur des racines (Barber et Lynch, 1977 ; Prikryl et Vancura, 1980). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que des composés microbiens seraient capables d'influencer l'exsudation en modifiant le métabolisme hormonal de la plante, grâce notamment à la production par les microorganismes de phytohormones telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. Ces phytohormones modifieraient en conséquence la perméabilité des cellules racinaires mais aussi le nombre d'apex, zone d'exsudation privilégiée (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000).

Le spectre d'exsudats produits peut aussi être affecté par la présence de microorganismes. L'inoculation de bactéries (*Agrobacterium sp*.) et de champignons mycorhiziens (*Glomus sp*., *Laccaria sp*.) respectivement sur des cultures de maïs, de pin et de hêtre, modifie la quantité de C libéré mais aussi la proportion d'exsudats solubles et leur composition en sucres, acides aminés et acides organiques (Laheurte *et al*., 1990 ; Leyval et Berthelin, 1993).

1.4. Conséquences de la rhizodéposition sur les communautés microbiennes rhizosphériques

La rhizodéposition, et plus particulièrement l'exsudation détermine largement la quantité relative de C et N disponibles pour la croissance des microorganismes présents dans l'environnement racinaire (Warembourg, 1975 ; Meharg et Kilham, 1988 ; Whipps, 1990 ; Xu et Juma, 1993 ; Bowen et Rovira, 1999 ; Farrar *et al*., 2003).

Différentes études portant sur la quantification et le devenir des rhizodépôts par traçage isotopique suggèrent que 30 à 85% du C d'origine racinaire sont respirés par les microorganismes (Shepherd et Davies, 1993 ; Merbach *et al*., 1999 ; Nguyen, 2003 ;

Kuzyakov et Larionova, 2005). Ainsi, la rhizosphère représente un environnement unique stimulant la croissance et l'activité des microorganismes (Grayston *et al*., 1998 ; Benizri *et al*., 2007). L'augmentation de la taille de la microflore dans le compartiment rhizosphérique correspond à « *l'effet rhizosphèr*e », évalué par le rapport R/S (rapport du nombre de microorganismes présents dans 1g de sol rhizosphérique (R) sur le nombre de microorganismes dans 1g de sol non rhizosphérique (S). Concernant les bactéries, ce rapport prend des valeurs pouvant atteindre 10^3. Cet effet rhizosphère concerne également les protozoaires, les nématodes et les champignons (Davet, 1996). Balasubramanian et Rangaswami (1978) ont cependant constaté que dans la rhizosphère du sorgho, le rapport R/S est plus élevé dans le cas des bactéries (de 12,7 à 20,1) que dans le cas des champignons (de 3,2 à 6,2). Outre cet effet sur la taille des communautés microbiennes, différentes études ont montré que les rhizodépôts structurent génétiquement les communautés microbiennes, qu'ils s'agissent des communautés bactériennes (Benizri *et al*., 2002 ; Kowalchuk *et al*., 2002 ; Nunan *et al*., 2005) et/ou des communautés fongiques (Smit *et al*., 2001 ; Marcial-Gomes *et al*., 2003). De plus, des études récentes ont mis en évidence que les communautés microbiennes utilisent différentiellement les rhizodépôts. Ainsi, l'acide citrique est utilisé préférentiellement par les champignons et influence en conséquence la structure de ces communautés (Dennis *et al*., 2010). Par ailleurs, la glycine influence de manière significative la structure des communautés bactériennes à Gram négatif (Paterson *et al*., 2006). Enfin des travaux mettent en évidence, une modification des activités enzymatiques des microorganismes en lien avec la rhizodéposition (Dedourge *et al*., 2003 ; Vong *et al*., 2003 ; Dedourge *et al*., 2004 ; Vong *et al*., 2004 ; Paterson *et al*., 2006). En ce qui concerne l'activité arylsulfatase (ARS), connue pour être impliquée dans la minéralisation du S, Vong *et al*. (2007) ont montré que cette l'activité est stimulée dans l'environnement rhizosphérique comparativement à un sol nu. De la même façon, Paterson *et al.* (2006) ont mis en évidence que l'activité phosphatase acide était significativement augmentée dans un sol amendé avec des rhizodépôts comparativement à un sol global non amendé. Par conséquent, la rhizodéposition de la plante stimulerait les activités de la biomasse microbienne impliquée dans la dynamique d'éléments nutritifs.

L'exsudation est donc un facteur important pour le développement de la microflore dans la rhizosphère en termes de taille, de structure génétique et d'activité et peut donc en conséquence modifier les fonctions assurées par la microflore, comme par exemple la dynamique des éléments nutritifs.

1.5. Influence de la rhizodéposition sur la biodisponibilité des éléments nutritifs

L'effet de la rhizodéposition sur les communautés microbiennes se traduit par une modification de la disponibilité en nutriments pour la plante (Butler *et al*., 2003). La rhizodéposition peut, en effet, stimuler la croissance de la plante, soit en rendant certains nutriments directement assimilables, soit en influençant les activités microbiennes et donc en modifiant de manière indirecte la disponibilité en nutriments pour la plante (Grayston *et al*., 1996).

1.5.1. Influence directe

L'exsudation de divers acides organiques dans la rhizosphère peut directement influencer la nutrition de la plante (Linehan *et al*., 1985 ; Grayston *et al*., 1996). En effet, ces acides organiques favorisent la biodisponibilité de métaux comme par exemple le manganèse (Godo et Reisenauer, 1980 ; Uren, 1982). Les acides citrique et malique chélatent le fer (Fe^{3+}) et l'aluminium (Al^{2+}) (Vaughan *et al*., 1993), ce qui favorise indirectement la disponibilité en P.

1.5.2. Influence indirecte

Comme nous l'avons décrit précédemment, la rhizodéposition est un phénomène majeur permettant l'apport de C, généralement limitant pour la croissance microbienne. Les microorganismes du sol peuvent en retour affecter la nutrition minérale de la plante (Grayston *et al*., 1996 ; Nguyen, 2003 ; Farrar *et al*., 2003) en agissant sur :

i) la physiologie et le développement des plantes : de nombreuses bactéries ou champignons peuvent synthétiser des acides aminés, vitamines ou régulateurs de croissance qui influencent fortement le développement et l'architecture des plantes et en particulier celui du système racinaire. Il s'agit par exemple d'analogues de phytohormones (analogues des auxines) ou des composés volatiles (aldéhydes, alcools, lactones…) (Cutler *et al*., 1991 ; Hojos-Carvajal *et al*., 2009 ; Guttierez-Luna *et al*., 2010),

ii) la disponibilité des nutriments : les microorganismes peuvent être déterminants dans la disponibilité en P, N ou encore S minéral, dans le sol. Dans le cas de N, l'apport d'exsudats racinaires synthétiques à un sol non planté (sol « nu ») stimule les activités nitrate réductases et dénitrifiantes (Henry *et al*., 2008). Nguyen (2007) a montré que

l'apport de rhizodépôts stimule l'immobilisation brute de N par la microflore tellurique tout en augmentant la minéralisation brute de cet élément. Enfin concernant S, Vong *et al*., (2007) ont montré que l'activité ARS est stimulée dans l'environnement rhizosphérique comparativement à un sol nu. Par conséquent, la rhizodéposition, et notamment celle d'une plante exigeante en S tel que le colza, stimulerait les activités microbiennes impliquées dans la minéralisation du S (Vong *et al*., 2008).

2. Assimilation du soufre par les plantes

2.1. Besoins des plantes en soufre

Les besoins en S diffèrent selon les espèces végétales Ainsi, trois groupes de végétaux peuvent être distingués selon leurs exigences en S (Studer, 1984 ; Taureau *et al*., 1987), (Tableau 2) :

Tableau 2 : Exigences des plantes en S (d'après Taureau *et al*., 1987)

Exigences des plantes en soufre (kg ha^{-1} an^{-1})		
Céréales	***Légumineuses***	***Crucifères***
10 à 20	20 à 50	50 à 80

i) Les plantes à exigences particulièrement élevées : c'est le cas des Crucifères (colza, moutarde) qui synthétisent des protéines et des métabolites secondaires riches en S. Elles exigent de 50 à 80 kg S ha^{-1} an^{-1},

ii) Les plantes moyennement exigeantes : ce sont les Légumineuses (trèfle, soja, luzerne, pois, fèverole) qui contiennent beaucoup des protéines soufrées et nécessitent entre 20 et 50 kg S ha^{-1} an^{-1},

iii) les plantes faiblement exigeantes : elles synthétisent peu de protéines soufrées et elles assimilent seulement de 10 à 20 kg S ha^{-1} an^{-1}. Ce sont principalement les céréales (blé, orge, maïs). Pour ces cultures, les besoins en S sont d'environ un dixième de ceux en N.
Les besoins en S varient également pour une espèce végétale donnée, au cours du cycle de développement. En effet, les plantes présentent des besoins plus importants pendant les stades de développement végétatif et la formation des graines.

2.2. Absorption du soufre par les plantes

Les plantes sont susceptibles d'absorber S selon deux voies (Figure 1):

i) La voie foliaire : S est absorbé sous forme de dioxyde de soufre (SO_2) et de sulfure d'hydrogène (H_2S) (Cowling *et al*., 1973 ; De Kok *et al*., 2007),

ii) La voie racinaire : S est absorbé sous forme de SO_4^{2-}.

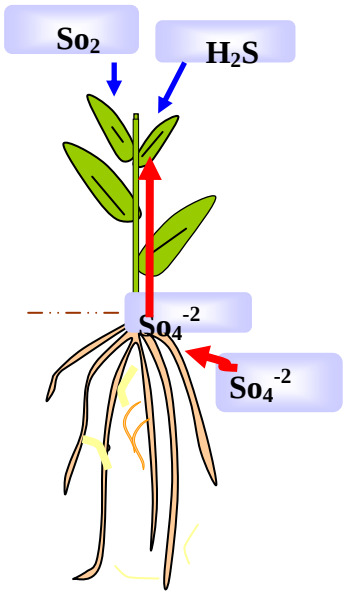


Figure 1 : Les voies d'absorption de S par les plantes (voies foliaire et racinaire)

Ces deux voies contribuent à l'alimentation en S de la plante. Le S atmosphérique constituait jusqu'à une dizaine d'années, la première source de S pour la croissance des plantes (De Kok *et al*., 2007). Ainsi, Bromifield (1972) a montré que la moutarde pouvait puiser 50% du S nécessaire à sa croissance, dans l'atmosphère. Le ray-grass ou le trèfle peuvent également utiliser le S atmosphérique, comme le montre l'augmentation des teneurs en S dans ces plantes soumises à des expositions foliaires au SO_2 (Cowling *et al*., 1971 ; Murray, 1985). Actuellement, de par la réduction drastique des émissions soufrées dans l'atmosphère (CITEPA, 2008), la principale voie d'absorption de S est la voie racinaire.

2.2.1. Absorption racinaire des sulfates

L'absorption des SO_4^{2-} se fait contre un gradient électrochimique grâce à un symport SO_4^{2-}/H^+ et nécessite un gradient de protons maintenu par une ATPase pompe à protons (Leustek et Saito, 1999). Un certain nombre de transporteurs à forte affinité ou à faible affinité a été mis en évidence chez les plantes (Leustek et Saito, 1999). Les transporteurs de SO_4^{2-} possèdent 12 domaines transmembranaires et sont codés par une même famille de gènes (Smith *et al*., 1997 ; Hawkesford, 2003). Les relations phylogéniques entre la séquence protéique de ces systèmes de transport, leur fonction et localisation dans la plante, ont permis d'en distinguer 5 classes. Les trois premières classes sont localisées dans la membrane plasmique et jouent un rôle important dans l'absorption des SO_4^{2-} dans les racines et dans le transport au niveau des tissus conducteurs de la plante (xylème). Les deux dernières classes de transporteurs sont localisées dans la membrane du tonoplaste et impliquées dans la séquestration des SO_4^{2-} dans les vacuoles (Buchner *et al.,* 2004 ; Hawkesford, 2003). Des représentants de chacune des ces classes on été caractérisés chez *Stylosannthes hamata* (Smith *et al*., 1997) et chez les plantes supérieures, en particulier chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al*., 2004). L'absorption des SO_4^{2-} dans les racines est régulée positivement au niveau transcriptionnel par la demande en S. Ainsi, les gènes codant les transporteurs de SO_4^{2-} de haute affinité sont fortement induits dans des conditions de croissance limitantes en S (Buchner *et al*., 2004 ; Hawkesford, 1993).

2.2.2. Assimilation des sulfates

Une faible proportion des SO_4^{2-} est assimilée dans les racines (Saito, 2004). Au niveau des racines, les SO_4^{2-} peuvent être stockés dans les vacuoles où transportés *via* le xylème, vers les parties aériennes où ils sont assimilés (Buchner *et al*., 2004) (Figure 2). Ce transfert des SO_4^{2-} des racines vers les parties aériennes implique le passage de multiples membranes et un transport à longue distance (Clarkson *et al*., 1989). Le flux transpiratoire est la force motrice du transport des SO_4^{2-} vers les feuilles (Rennenberg et Polle, 1994), lieu ou les SO_4^{2-} sont déchargés dans les cellules du mésophile (Buchner *et al.,* 2004). Une partie des SO_4^{2-} absorbés par les racines est également exportée sous forme de cystéine vers les parties aériennes (Zhao *et al*., 1999). Dans les parties aériennes, les SO_4^{2-} vont être assimilés ou stockés dans les feuilles âgées pour être remobilisés dans les jeunes feuilles, lors des périodes de croissance limitantes en S (Hawkesford et De Kok, 2006).

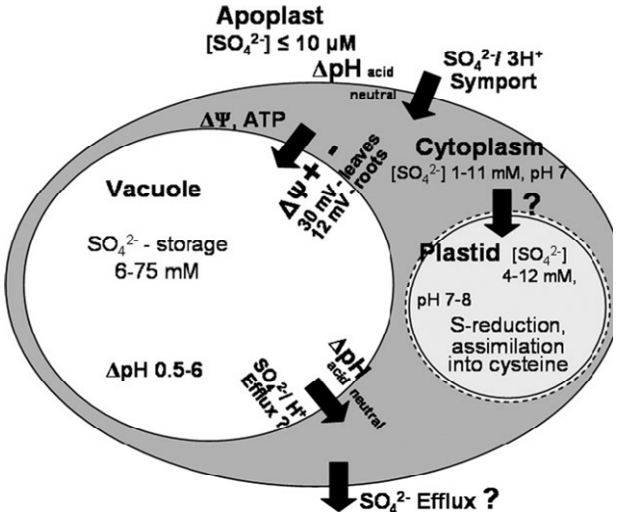


Figure 2 : Flux transmembranaires des sulfates (d'après Buchner *et al*., 2004)

L'assimilation de S par les plantes, assez largement décrite dans la littérature, (Leustek et Saito, 1999 ; Wirtz et Droux, 2004 ; Saito, 2004) comprend plusieurs étapes (Figure 3). Il s'agit d'une réduction assimilatrice des SO_4^{2-} en cystéine qui s'effectue principalement au niveau des chloroplastes. Brièvement, les SO_4^{2-} sont des composés inertes qui doivent être activés avant d'être réduits et métabolisés (Saito, 2004). Cette réduction est catalysée par une ATP sulfurylase (ATPS) dans les plastes ou dans le cytosol (Leustek et Saito, 1999). Elle active les SO_4^{2-} en le convertissant en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Scherer, 2001). Les SO_4^{2-} actifs, présents sur l'APS, sont ensuite transférés sur le groupement thiol du glutathion (GSH), *via* l'APS sulfotransférase. Du sulfite libre (SO_3^{2-}) est alors libéré. Le SO_3^{2-} peut être directement utilisé comme source de S pour la synthèse d'UDP-sulfoquinovose, le précurseur des sulfolipides (Rausch et Wachter, 2005). Le SO_3^{2-} peut aussi être réduit en S^{2-}. Le premier composé organique S synthétisé est la cystéine. Sa synthèse qui peut avoir lieu dans les plastes, le cytoplasme ou encore les mitochondries (Saito, 2004) implique deux enzymes : la Sérine Acétyl Transférase (SAT), qui catalyse la synthèse d'O-Acétyl-L-Sérine (OAS), à partir de la sérine et de l'acétyl-CoA et, l'O-acetylsérine(thiol)lyase (OAS-TL), qui catalyse la synthèse de la cystéine, à partir d'OAS et de S^{2-}. Cet acide aminé sera à l'origine de tous les autres composés organiques S comme la méthionine ou le glutathion (Rausch et Wachter, 2005).

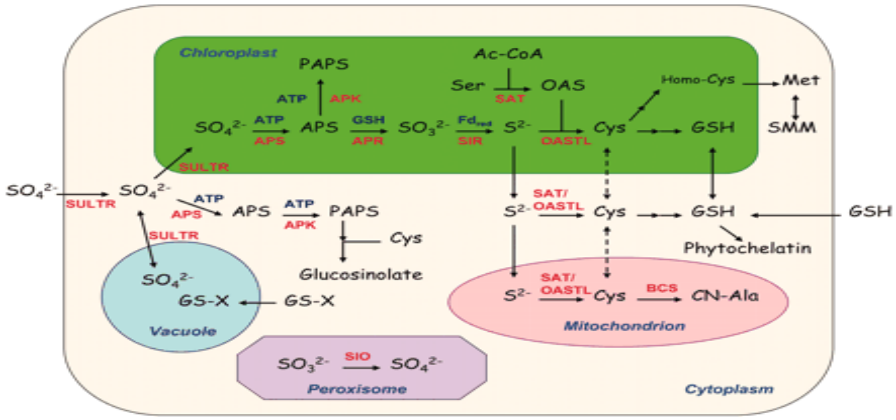


Figure 3 : Assimilation du S dans les compartiments sub-cellulaires des cellules végétales (d'après Saito *et al*., 2004).

Ac-CoA : acétyl-CoA ; ***APS*** : adénosine 5'-phosphosulfate ; ***CN-Ala*** : β-cyano-Alanine ; ***GSH*** : glutathion réduit ; ***GS-X*** : glutathion conjugué ; ***OAS*** : O-acétyl-Sérine ; ***PAPS*** : 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate ; ***SMM*** : S-méthyl-méthionine ; ***Fdred*** : ferrédoxine réduite ; ***APK*** : APS kinase ; ***APR*** : adénosine 5'-phosphosulfate réductase ; ***APS*** : ATP sulfurylase ; ***BCS*** : β-cyano-Alanine synthase ; ***OASTL*** : OAS(thiol)-lyase ; ***SAT*** : Sérine acétyltransférase ; ***SIO*** : sulfite oxydase ; ***SIR*** : sulfite réductase ; ***SULTR*** : transporteur de sulfates.

La synthèse de cystéine/méthionine a également été observée dans les racines et les graines où ces acides aminés sont importants pour les processus de maturation (Heller, 1981).

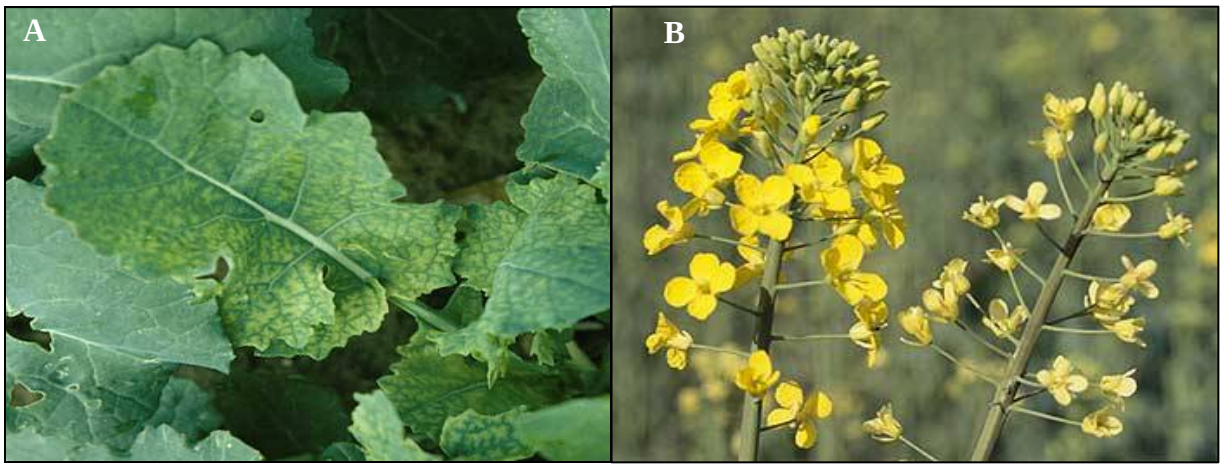
2.2.3. Autres formes de soufre participant à la nutrition soufrée de la plante

La capacité des plantes à absorber des formes de S organique est encore peu étudiée. Cependant, des études ont mis en évidence que les plantes sont susceptibles de réabsorber de manière active une partie des acides aminés libérés passivement par le processus d'exsudation racinaire (Jones et Darrah, 1992 ; Farrar *et al*., 2003 ; Phillips *et al*., 2004 ; Bais *et al*., 2006). Certains travaux montrent par ailleurs, que des microorganismes du sol, et en particulier les champignons mycorhiziens, pourraient faciliter l'absorption de S organique par la plante (Seegmuller et Rennenberg, 2002). L'absorption de glutathion par le chêne sessile a ainsi été observée en présence du champignon mycorhizien *Laccaria laccata*.

2.3. Contraintes agronomiques liées au soufre

Le S est utilisé en agriculture depuis très longtemps. Hall (1909) et Juhalin-Dannfelt (1911) rapportent que durant l'Antiquité, Romains et Grecs connaissaient les effets bénéfiques du gypse ($CaSO_4$, $2H_2O$) qui constituait une excellente source de calcium et de S pour les cultures (Tabatabai, 1984). Le S, sous forme de poudres est utilisé tel quel ou en suspension aqueuse, pour combattre des maladies cryptogamiques, principalement l'oïdium sur céréales, vigne ou tomate.

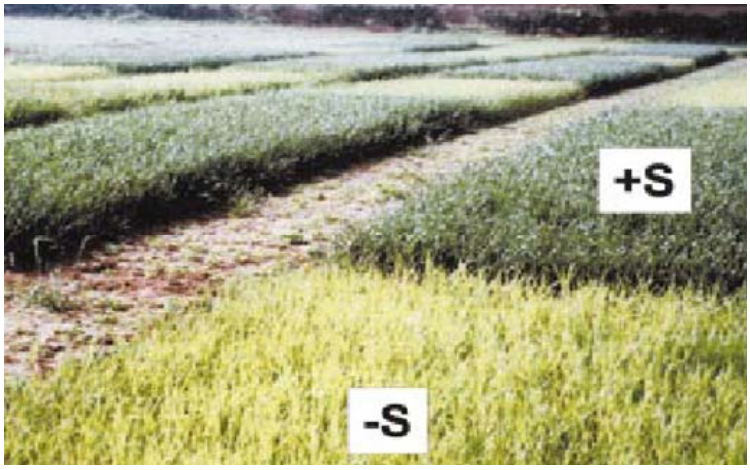
Depuis plus de 30 ans, dans de nombreuses régions du monde, une augmentation des déficiences en S est observée sur certaines cultures, notamment les crucifères (Photographie 1) et les céréales (Tabatabai, 1984 ; Zhao *et al*., 2006).



Photographie 1 : Mise en évidence de déficiences en S sur une culture de colza (CETIOM, 2006). La carence en S provoque un jaunissement des parties foliaires (A) et un avortement des fleurs (B)

En France, ces carences ont été signalées dans les années soixante sur colza, luzerne et céréales (Taureau *et al*., 1987). Chez le colza, les symptômes de carence apparaissent sur les organes foliaires jeunes, à partir de la montaison (Photographie 1). Le limbe jaunit puis devient rougeâtre et cassant. A la floraison, les fleurs deviennent blanches et avortent, donnant des siliques non remplies (CETIOM, 2006). Ces carences conduisent à une diminution des rendements pouvant atteindre jusqu'à 20 quintaux ha^{-1} dans les cas les plus graves (soit 50% du rendement moyen d'un colza).

Chez les céréales, les symptômes de carences en S sont beaucoup moins remarquables que chez les crucifères (Photographie 2).



Photographie 2 : Symptômes de carences en soufre sur une culture de blé (Zhao *et al*., 2006). La carence en S provoque un jaunissement des parties foliaires (-S) comparativement aux plantes non carencées (+S)

Les plantes sont généralement plus petites et moins vertes. L'effet le plus préjudiciable est lié à la diminution de deux composantes du rendement à savoir, le nombre d'épis par m^2 et le nombre de grains par épi, ce qui peut entraîner des pertes de rendement allant jusqu'à 20% (Schnug et Haneklaus, 1998). Wrigley *et al*. (1984) ont par ailleurs montré, que dans des conditions de déficiences en S, la synthèse des protéines riches en S, telles que les gliadines et les gluténines, qui interviennent dans l'aptitude à la panification des farines, est diminuée. Ainsi, ces carences peuvent altérer la qualité technologique des récoltes chez les céréales (Zhao *et al*., 1989).

Un ensemble de facteurs sont susceptibles d'avoir contribuer à l'apparition des carences en S :

i) La diminution des émissions atmosphériques de S (SO_2) par les industries : ceci résulte de nombreuses mesures anti-pollution (Fowler *et al*., 2005) (Figure 4),

ii) L'intensification de l'agriculture : cela concerne l'utilisation de variétés plus productives et nécessitant plus d'éléments nutritifs pour assurer leur croissance et leur développement,

iii) La diminution de l'utilisation d'intrants soufrés : les nouvelles générations d'intrants N, P, K et Mg contiennent moins de S libre (Eriksen *et al.*, 1995 ; Zhou *et al.*, 2005).

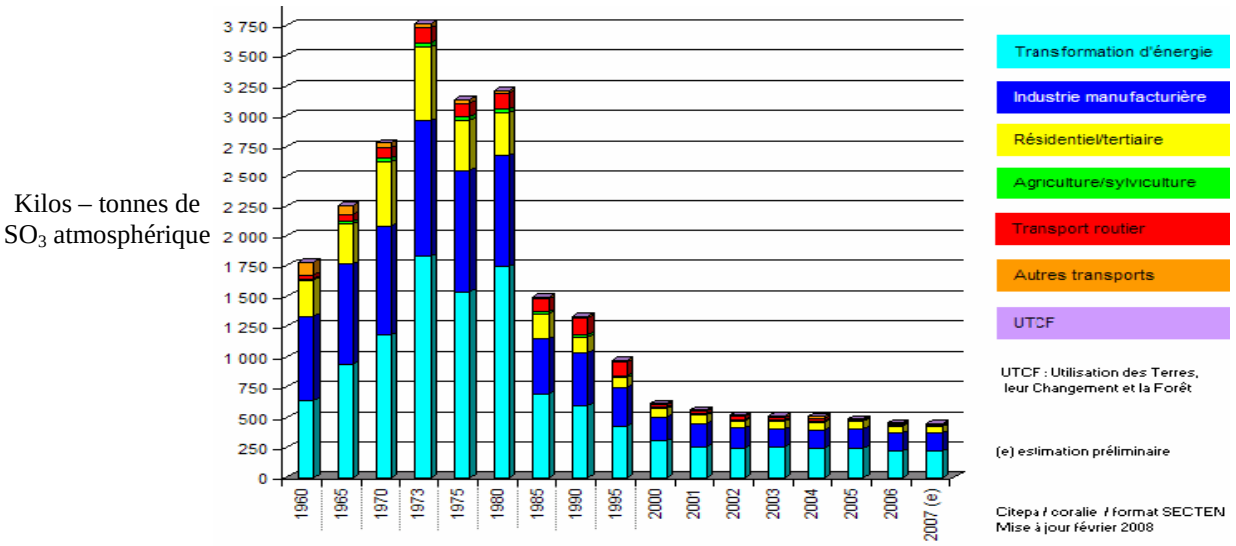


Figure 4 : Emissions de SO_2 atmosphérique en France métropolitaine (CITEPA, 2008)

Des facteurs secondaires, liés aux itinéraires techniques, contribuent à amplifier ces phénomènes de carences comme notamment, un apport de S trop précoce au printemps, générant une réorganisation de l'apport au profit de la matière organique du sol. Par ailleurs, les conditions climatiques à l'année n sont également susceptibles d'aggraver ces phénomènes de carences en S : les pluies hivernales entraîneront un lessivage des SO_4^{2-} alors qu'un printemps froid limitera la minéralisation de S. Actuellement un apport systématique de S sous forme de SO_4^{2-}, est réalisé pour éviter les carences et améliorer la qualité des produits récoltés. Cet apport est effectué à la sortie de l'hiver, juste avant la période de forts besoins des cultures d'automne ou lors des semis pour les cultures de printemps. En France, des recommandations concernant le colza et les céréales sont proposées par les Instituts Techniques. Ainsi, pour le colza, le CETIOM préconise un apport systématique en début montaison, de 75 kg de SO_3 ha^{-1} (soit 30 kg équivalent S). Pour cet institut, cet apport constitue un « bon compromis pour satisfaire les besoins de la culture et limiter le risque d'augmentation de la teneur en glucosinolates dans les graines récoltées». Pour les céréales, ARVALIS Institut du Végétal a développé une grille de décision, afin d'évaluer la nécessité ou non d'un apport, au stade fin tallage, selon quatre critères : 1/ le type de sol, 2/ la

pluviométrie automnale et hivernale, 3/ les apports organiques et 4/ l'apport de S sur le précédent (Tableau 3).

Tableau 3 : Grille de décision d'un apport de soufre sur céréales d'hiver et de printemps (cas des situations sans apports réguliers de fumier), selon ARVALIS Institut du végétal

		Apport en S (kg ha^{-1})	
Sols	***Pluie (01/10 à 01/03) en mm***	***Avec apport sur précédent***	***Sans apport sur précédent***
Superficiels, filtrants	>300	16	20
Argilo-calcaires superficiels, sableux	>300	8	12
Caillouteux, limons caillouteux superficiels	>500	12	16
Argilo-calcaires	>500	12	16
Limons battants	300 à 500	8	12
Limons argileux profonds	300 à 500	0	8
Profonds	> 300	8	12

En ***orange*** : sols à risque élevé de carences en S ; en ***jaune*** : sols à risque moyen de carences en S ; en ***vert*** : sols à risque faible de carences en S

Les principaux engrais soufrés utilisables sont les engrais azotés soufrés, du superphosphate et du sulfate de potassium. Il faut remarquer que les engrais azotés soufrés constituent la forme d'apport la plus commune, en raison de l'interaction des éléments N et S dans la nutrition des plantes. En effet, les limitations en S sont susceptibles d'occasionner des diminutions de l'assimilation de N par la plante. Outre les conséquences en terme de rendement, cette non valorisation de N peut avoir un impact environnemental, non seulement sur le compartiment atmosphérique suite à l'émission de N_2O mais aussi sur les ressources en eau suite à la lixiviation des nitrates. Or, dans un contexte de durabilité environnementale et de limitation des intrants, un ajustement de la fertilisation soufrée aura pour but d'adapter les apports en S aux besoins réels des cultures en tenant compte du S présent dans le sol et du rendement potentiel de la plante.

Ainsi un meilleur pilotage de la fertilisation S nécessite de mieux comprendre la dynamique de cet élément dans les sols et en particulier, de comprendre le rôle de la microflore dans la dynamique de cet élément.

3. Les transformations de soufre dans le sol

3.1. Le soufre dans le sol

La teneur en S total des sols varie de moins de 20 mg S kg^{-1} de sol pour les sols sableux à plus de 600 mg S kg^{-1} dans les sols argileux. Dans les sols cultivés, Stevenson et Cole (2005) rapportent des teneurs moyennes se situant entre 224 et 1120 kg de S ha^{-1}. La plupart des sols contiennent cependant une moyenne de 100 à 600 mg de S kg^{-1} de sol (Tabatabai et Bremner, 1972). Concernant les sols français, ceux-ci sont classés en trois catégories selon leur teneur en S total (Simon-Sylvestre, 1969) :

i) Les sols pauvres en S total (< 100 mg de S kg^{-1} de sol) : ce sont les sols acides, sableux et les alluvions, pauvres en matières organiques,

ii) Les sols à teneur moyenne en S total (de 100 à 250 mg de S kg^{-1} de sol) : ce sont surtout les sols limoneux à pH proche de la neutralité,

iii) Les sols riches en S total (de 250 à plus de 400 mg de S kg^{-1} de sol) : ce sont des sols argilo-calcaire riches en matières organiques.

Le S total d'un sol est constitué de formes organiques et minérales.

3.1.1. Le soufre minéral

Le S minéral représente moins de 10% de S total d'un sol. Le S minéral se présente sous forme de SO_4^{-2} et de composés à niveau d'oxydation plus faible tels les sulfures (S^2), les sulfites (SO_3^{2-}), le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), le tétrathionate ($S_4O_6^{2-}$) et le S élémentaire (S^0), non assimilables directement par les plantes (Germida *et al*., 1992).

Dans les sols bien aérés et bien drainés, le S minéral comprend presque uniquement des SO_4^{-2}, provenant soit d'apports par les fertilisants minéraux et par les retombées atmosphériques, soit de l'oxydation biologique de S (Sylvestre, 1960). Ces SO_4^{-2} sont présents : ***i)*** sous forme de sels solubles dans la solution de sol, ***ii)*** adsorbés au complexe argilo-humique (Scherer, 2001) et ***iii)*** complexés sur certains hydroxydes métalliques (Maynard *et al*., 1984). Plusieurs facteurs influencent notamment l'adsorption des SO_4^{-2} sur les colloïdes du sol (Hue et Cope,

1987). L'adsorption est en effet négligeable pour des valeurs de pH supérieures à 6,5 et augmente quand le pH décroît. Elle est favorisée par des températures élevées, une humidité faible et également par de fortes teneurs en oxydes d'aluminium et de fer, ainsi que par la présence de kaolinites (Zhao et McGrath, 1994).

Les teneurs en SO_4^{-2} des sols varient de 2 à 100 kg ha^{-1}. De plus, en raison de l'effet saisonnier sur la minéralisation de S organique, du lessivage des SO_4^{-2} en solution (Ballif et Muller, 1985) et du prélèvement de SO_4^{-2} par les plantes, les teneurs en SO_4^{-2} du sol fluctuent considérablement dans les horizons superficiels pour un même type de sol (Frossard *et al*., 1994 ; Tan *et al*., 1994). Généralement, la quantité de SO_4^{-2} est faible en hiver et au printemps car le lessivage est important et la minéralisation du S organique est faible.

3.1.2. Le soufre organique

Le S organique représente de 90 à 95% du S total du sol. Cette forme prédominante reste indisponible aux organismes supérieurs. Historiquement, ce S organique est réparti en deux fractions (Freney, 1971) :

i) Le S organique non directement liés à un atome de C : ce groupe comprend principalement, les esters de sulfate pour lesquels S est lié au C par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène (C-O-S) et les sulfamates, où S est lié au C par un atome d'azote (C-N-S). Cette fraction représente de 27 à 78% de S organique (Bettany et Stewart, 1983) et est considérée comme la fraction la plus labile et la plus active dans les processus biologiques (Freney *et al*., 1975). Les esters de sulfate représenteraient une source de S rapidement disponible pour la plante, après transformation, du fait de leur forte labilité. Dans les sols, les esters de sulfate et les sulfamates comprendraient des molécules de structures chimiques différentes et non encore parfaitement définies : des formes aromatiques tels que les arylsulfates, des formes linéaires appelées alkylsulfates parmi lesquelles des glycosaminoglucanes (chondroïtine sulfate, kératane sulfate) et des acides aminés modifiés (choline-O-sulfate) (Scherer, 2001),

ii) Le S organique directement lié à un atome de C : cette fraction représenterait environ 26% de S organique total du sol dont 10% constitués par la cystéine et la méthionine. Outre ces acides aminés soufrés, cette fraction comprendrait également des peptides et des

protéines, des acides sulfoniques et des composés hétérocycliques (dont les sulfonates) (Bettany *et* Stewart, 1983 ; Jacquin *et al*., 1992).

Mirleau *et al*. (2005) ont caractérisé et quantifié, en utilisant la méthode XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure), les différentes formes de S présentes dans des sols agricoles, forestiers ou sous prairie (Figure 5). Ces différents sols contiennent tous un faible pourcentage de S minéral (de 0,4 à 2% du S total). Concernant les formes organiques de S, leurs proportions varient selon le sol considéré. Ainsi, dans les sols forestiers, les esters de sulfate (C-O-S) constituent la forme majeure du S organique (36,5% du S total) devant les sulfonates (23,4% du S total). A l'opposé, dans les sols prairiaux, le S organique se présente majoritairement sous forme de sulfonates (48,7% du S total) devant les esters de sulfate (21,9% du S total). Enfin, dans les sols agricoles, le S organique est représenté, en pourcentage quasi équivalent, par les sulfonates (34,9% du S total) et les esters de sulfate (31,5% du S total).

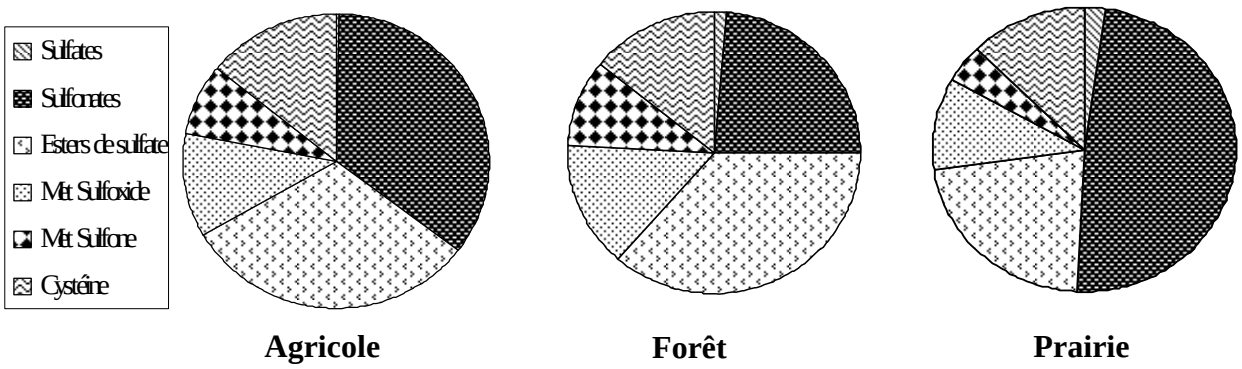


Figure 5 : Différentes formes de S dans trois types de sol (d'après Mirleau *et al*., 2005)

3.2. Transformations du soufre dans le sol

Les microorganismes du sol, qui jouent un rôle fondamental dans les cycles des éléments nutritifs, sont considérés comme les principaux catalyseurs des transformations du S (Banerjee et Chapman, 1996) même si des processus strictement chimiques soient possibles (Bloomfield et Coulter, 1973 ; Bettany et Stewart, 1984). Ces transformations microbiennes correspondent aux deux « grands » processus d'immobilisation et de minéralisation de S. La minéralisation est un processus au cours duquel le S organique est transformé en S minéral. A

l'inverse, suite à l'immobilisation, le S minéral est converti en S organique (Figure 6). Ces processus, qui se produisent de façon simultanée et continue, régulent en conséquence la disponibilité en S minéral dans les sols. Seule une faible fraction de S organique (3-6%) est soumise aux réactions de minéralisation et d'immobilisation (Maynard *et al.*, 1984). L'intensité des processus d'immobilisation et de minéralisation de S est pondérée par les conditions physico-chimiques du milieu et les conditions environnementales, mais aussi par la demande en d'autres éléments, comme en particulier en C (Bettany et Stewart, 1982 ; Mc Laren *et al.*, 1985 ; Mc Donald *et al.*, 1995). L'orientation de ces processus, soit vers l'immobilisation, soit vers la minéralisation est, en effet, fonction du rapport C/S de la matière organique (Scherer, 2001). Dans les sols, le ratio C/S moyen est estimé entre 85 et 250. Lorsque ce ratio est en dessous, le processus de minéralisation prédomine. A l'inverse, le processus d'immobilisation est plus important lorsque le ratio est supérieur à ces valeurs (Stevenson et Cole, 1999). En ce qui concerne les microorganismes, leur ratio C/S est estimé entre 57 et 85 pour les bactéries et 180 à 230 pour les champignons (Saggar *et al.*, 1981 ; Wu *et al.*, 1994).

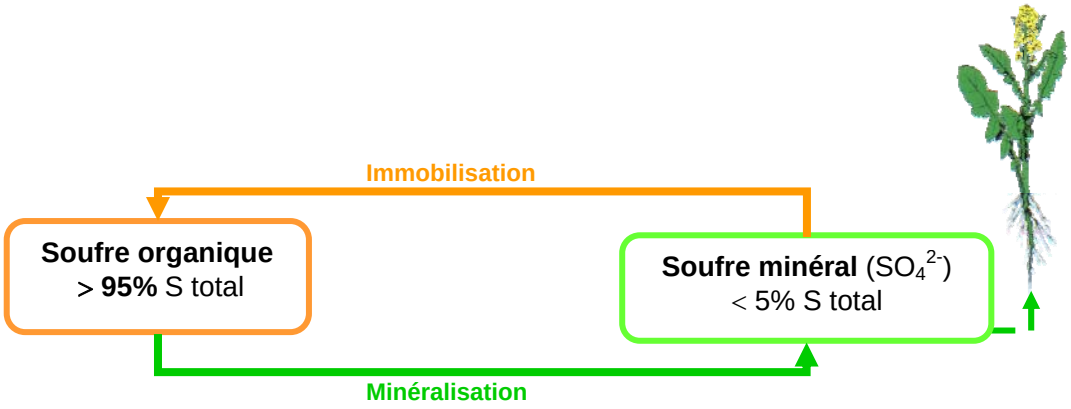


Figure 6 : Transformations du soufre dans les sols

3.2.1. Immobilisation (organisation) du soufre par la microflore

L'immobilisation des SO_4^{-2} par les microorganismes est la conversion de S minéral en S organique. Elle correspond à l'assimilation de S par les microorganismes, sachant que le S minéral est la forme préférentielle de S pour les microorganismes. La première molécule organique formée est généralement la cystéine. Cet acide aminé fera ensuite l'objet de transformations aboutissant à la synthèse d'autres composés soufrés comme la méthionine, des vitamines... (Germida *et al.*, 1992). Environ 25% du S assimilé par les microorganismes sont contenus dans des composés possédant des liaisons C-S, comme les acides aminés et le

glutathion. Les acides aminés constituent la forme majeure de S organique chez les bactéries et les champignons (Bettany et Stewart, 1983). S est également présent dans des composés possédant des liaisons N-S ou C-O-S. Les champignons, en particulier, possèdent la capacité de stocker, dans les parties végétatives (mycélium) ou les organes de reproduction, du S sous forme de choline sulfate (Harada et Spencer, 1960, 1961 ; Spencer et Harada, 1960 ; Fitzgerald, 1976). L'immobilisation du S par les microorganismes est stimulée par la présence de source d'énergie facilement utilisables comme le glucose (Mc Larent *et al*., 1985 ; Schindler et Mitchel, 1987 ; Dedourge *et al*., 2004).

Des études suggèrent que globalement la biomasse microbienne soufrée représente de 1,5 à 5% du S organique du sol (Banerjee *et al*., 1993 ; Wu *et al*., 1994). Malgré ce faible pourcentage de S organique contenu dans les microorganismes, cette fraction est très labile et est une composante importante des transformations du S dans les sols. Ainsi, plus la teneur en S organique présente dans la biomasse microbienne est importante, plus la disponibilité en S pour les plantes est élevée (Kertesz, 1999), ceci du fait du turn-over (phénomènes de re-minéralisation) de la biomasse microbienne.

3.3.2. La minéralisation du soufre

3.2.2.1. Le modèle de McGill et Cole (1980)

La minéralisation du S organique est considérée comme la source principale de SO_4^{-2} pour les plantes (Suhardi, 1992). La plupart des études dédiées à la quantification de la minéralisation du S organique dans les sols ont été réalisées en conditions contrôlées. Les taux de minéralisation du S organique varient considérablement (Zhao *et al*., 1996). Tabatabai et Al-Khafaji (1980) ont montré que le taux de minéralisation du S organique est très variable selon la température mais était souvent beaucoup plus élevé que celui de N. Ainsi, alors que le taux de minéralisation de N varie entre 4 et 17% de N total, le taux de minéralisation de S peut atteindre de 20 à 30% du S total d'un sol. Le taux annuel de minéralisation de la réserve organique est compris entre 1,7 à 3,1% (Eriksen, 1994), ce qui représente entre 10 et 40 kg S ha^{-1} an^{-1}, à même de couvrir une grande partie des besoins des cultures. Cependant ce taux de minéralisation est très variable selon les conditions du milieu.

La minéralisation se décline en deux processus distincts, selon le modèle conceptuel proposé par Mc Gill et Cole (1981). Il s'agit de la minéralisation biologique et de la minéralisation biochimique, deux voies qui co-existent dans le sol :

i) La minéralisation biologique : elle concernerait les formes organiques de S directement liées au C (composés C-S). Cette minéralisation répondrait à un besoin en C de la biomasse microbienne. Le SO_4^{-2} libéré serait, en conséquence, un co-produit de l'oxydation des formes C-S du sol (Ganeshamurthy *et al*. 1990 ; Eriksen, 1995),

***ii) La minéralisation biochimique* :** elle correspondrait à l'hydrolyse des esters de sulfate (C-O-S) par l'intermédiaire d'enzymes d'origine microbienne appartenant à la famille des Sulfatases (EC.3.1.6.) (Eriksen, 1995 ; Dierks *et al*., 1999 ; Knauff *et al*., 2003) et résulterait d'une demande en SO_4^{2-} de la microflore.

3.2.2.2. Enzymes microbiennes impliquées dans la minéralisation

3.2.2.2.1. Enzymes de la voie de minéralisation biologique

L'utilisation de sulfonates (C-S) est bien connue concernant les communautés bactériennes du sol. En effet, ces composés sont généralement des xénobiotiques (Kertesz *et al*., 1994 ; Kim *et al*., 1994), produits industriellement (surfactants, additifs, colorants…) et présents dans l'environnement. Ces composés sont alors minéralisés afin de pourvoir à la demande en C de la microflore. Par exemple, la souche S-313 de *Pseudomonas putida* est capable d'utiliser des esters de sulfonates aliphatiques (taurine) et aromatiques (Zürrer *et al*., 1987 ; Kertesz, 1999 ; Vermeij *et al*., 1999 ; Kahnert *et al*., 2002).

L'enzyme clé impliquée dans le processus de désulfonatation est une mono-oxygénase FMN dépendante (Valton *et al*., 2006). Un exemple de réaction est proposé à la Figure 7 :

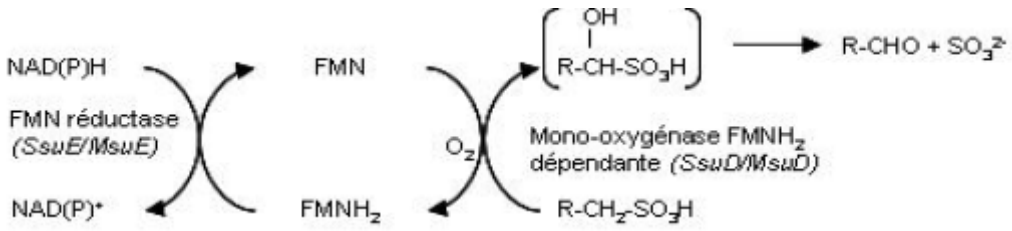


Figure 7 : Mécanisme de désulfonatation des sulfonates aliphatiques (d'après Kertesz, 1999)

3.2.2.2.2. Enzymes de la voie de minéralisation biochimique

L'hydrolyse des esters de sulfate (C-O-S) est catalysée par des enzymes appartenant à la famille des Sulfatases (EC 3.1.6.1). Ces enzymes ont été caractérisées chez différents microorganismes, bactériens et fongiques (Kertesz, 1993 ; Marzluf, 1994 ; Biel *et al*., 1995).

Les Sulfatases sont des petites protéines solubles de 500 à 600 acides aminés, qui possèdent un motif conservé (C/S-X-P-X-R). Elles présentent aussi une modification post-traductionnelle en N-terminal sur une sérine (pour les Procaryotes) ou une cystéine (pour les Eucaryotes). Cette modification correspond à une formylation qui assure la fonctionnalité de l'enzyme. Plusieurs classes de sulfatases ont pu être définies selon le type de substrat hydrolysé (Tableau 4) :

Tableau 4 : Exemples de sulfatases caractérisées chez des Eucaryotes inférieurs et des Procaryotes (d'après Hanson *et al*., 2004 ; Hagelueken *et al*., 2006)

Organisme	**Sulfatase**	**Substrat**	**Localisation**
Chlamydomonas reinhardtii	Arylsulfatase	Glucosinolates	Périplasme
Neurospora crassa	Arylsulfatase	Tyrosine-O-sulfate	Extra-/intracellulaire
Volvox cateri	Arylsulfatase	Non connu	Périplasme
Flavobacterium	Héparane Sulfatase	Héparane sulfate	Périplasme
Pseudomonas aeruginosa	Arylsulfatase	Non connu	Intracellulaire
	Alkylsulfatase	SDS	Périplasme
Sinorhizobium meliloti	Choline Sulfatase	Choline sulfate	Cytoplasme

Nous pouvons distinguer au moins deux types de sulfatases :

i) Les alkylsulfatases : ces enzymes hydrolysent les esters de sulfate aliphatiques (Figure 8), (Bartholomew *et al*., 1977 ; Cloves *et al*., 1977 ; Barett *et al*., 1980a,b ; Cloves *et al*., 1980 ; Crescenzi *et al*., 1984 ; Kahnert et Kertesz, 2000 ; Hagelueken *et al*., 2006 ; Gadler et Faber, 2007).



Figure 8 : Exemple d'un ester de sulfate aliphatique

L'action des alkylsulfatases conduit au clivage de la liaison O-S de l'ester de sulfate et permet ainsi la libération de SO_4^{-2} et d'un résidu alcool. Les travaux menés par Kahnert et Kertesz (2000) révèlent l'existence, chez *Pseudomonas putida* S-313, d'une alkylsulfatase (AtsK) minéralisant les esters de sulfate aliphatiques selon la réaction suivante :

$$\alpha\text{-cétoglutarate} + O_2 + \text{ester de sulfate} \xrightarrow{\textbf{AtsK}} \text{succinate} + \mathbf{SO_4^{2-}} + CO_2 + \text{aldéhyde aliphatique}$$

L'existence de plusieurs alkylsulfatases au sein d'un même organisme suggère par ailleurs une localisation et une fonction spécifique de ces différentes enzymes. Ainsi, l'étude menée par Davison *et al*. (1992) a permis la caractérisation de gènes codant des alkylsulfatases chez *Pseudomonas sp*. ATCC19151, qui est capable d'utiliser le SDS comme seule source de C et de S. L'une des alkylsulfatases synthétisées, SdsA, est capable de dégrader les esters de sulfate aliphatiques à longue chaîne carbonée tel que le SDS, dans le périplasme. Chez cette même souche bactérienne, Hagelueken *et al*. (2006) ont caractérisé d'autres alkylsulfatases susceptibles de dégrader des esters de sulfate aliphatiques à courte chaîne carbonée (3 à 5 C) dans le cytoplasme. Par ailleurs, chez *P. aeruginosa*, Hagelueken *et al*. (2006) ont montré que l'alkylsulfatase SdsA1 qui dégrade des esters de sulfate aliphatiques ne semble pas capable d'hydrolyser des esters de sulfate aromatiques tels que le *p*-nitrophénylsulfate.

ii) Les arylsulfatases : L'arylsulfatase (ARS) est l'enzyme majoritairement étudiée dans la dynamique du S dans les sols. Elle catalyse l'hydrolyse des esters de sulfate aromatiques (Figure 9) :

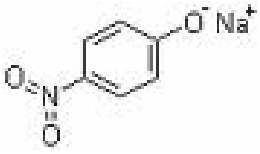


Figure 9 : Exemple d'un ester de sulfate aromatique, le *p*-nitrophényl sulfate

La réaction d'hydrolyse est la suivante :



L'ARS a été caractérisée chez différents microorganismes comme les bactéries (Harada et Spencer, 1964 ; Murooka *et al*., 1977 ; Dodgson *et al*., 1982 ; Beil *et al*., 1995) et les champignons filamenteux (Harada et Spencer, 1962 ; Marzluf, 1994, 1997). Cette enzyme microbienne, largement présente dans les sols, est utilisée comme marqueur de la dynamique de S (Klose *et al*., 1999) mais aussi comme indicateur de la qualité biologique des sols (Ndiaye *et al*., 2000 ; De la Paz-Jimenez *et al*., 2002). Cette activité, qui se répartie dans les sols entre un pool extracellulaire (45% de l'activité ARS totale) et un pool intracellulaire (55% de l'activité totale) (Klose et Tabatabai, 1999), est corrélée avec la biomasse microbienne et avec le taux d'immobilisation du S (Vong *et al*., 2003). Cette activité est par ailleurs modulée par les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (Tabatabai et Bremner, 1970 ; Zwikel *et al*., 2007). De par l'origine microbienne de l'activité ARS, les facteurs abiotiques influençant l'activité microbienne, tels que la température, le pH, l'humidité, la teneur en C organique, modulent le niveau d'activité ARS d'un sol. Ainsi, Castellano et Dick (1990) ont observé une diminution de l'activité ARS dans des sols agricoles pendant l'été (humidité faible et températures élevées). De plus, Niemi et Vepsäläinen (2005) ont mis en évidence pour des sols présentant des valeurs de pH allant de 4 à 7,5, un optimum d'activité ARS pour des valeurs de pH acide (pH 4 à 4,5). L'activité ARS semble également corrélée négativement avec la concentration en SO_4^{-2} dans la solution de sol (Castellano et Dick, 1990). Ceci suggère en conséquence, que des conditions limitantes en S pour la microflore tellurique, stimulerait cette activité (Speir, 1980). La mise en évidence d'une corrélation entre l'activité ARS et la concentration en esters de sulfate suggère également que le niveau d'activité pourrait dépendre de la disponibilité en substrats de l'enzyme dans le sol (Prietzel, 2001).

L'activité ARS est également modulée par des facteurs biotiques. La plante, en prélevant des SO_4^{-2} pour sa nutrition, entraîne en effet une diminution des SO_4^{-2} en solution dans l'environnement racinaire, pouvant conduire à une augmentation de l'activité ARS. L'activité ARS peut en conséquence être modifiée par le type de couvert végétal et les besoins en S minéral des végétaux. Ainsi, Knauff *et al*. (2003) ont montré que l'activité ARS est supérieure

sous couvert de colza en comparaison à un couvert de moutarde. De même, l'activité ARS spécifique est plus élevée sous couvert de colza que sous couvert d'orge (Dedourge *et al*., 2003 ; Vong *et al*., 2004). A une échelle temporelle plus importante, la rotation influence l'activité ARS. Deng et Tabatabai (1997) ainsi que Klose *et al*. (1999) ont montré, par exemple, que l'activité ARS est plus importante dans les sols sous rotation céréales-prairie temporaire en comparaison d'une monoculture de maïs.

Les ARS sont donc considérées actuellement comme des enzymes clés du cycle de S. Une activité ARS potentielle peut être facilement mesurée dans les sols en utilisant comme substrat, des esters de sulfate aromatiques tels que le *p*-nitrophényl sulfate (PNS) ou le *p*-nitrocatéchol sulfate (Tabatabai, 1970 ; Nicholls et Roy, 1971). L'utilisation de ces substrats synthétiques permet ainsi de rendre compte de l'évolution de l'activité ARS, selon les conditions étudiées. Ces substrats constituent également les substrats de référence pour la caractérisation de cette activité (Hanson *et al*., 2004). Il faut noter cependant que des études portant sur la caractérisation *in vitro* d'enzymes définies comme étant des ARS, sur la base de leur aptitude à hydrolyser un substrat aromatique comme le PNS, ont montré que les substrats naturels de ces enzymes étaient préférentiellement des alkylsulfates (stéroïdes sulfatés, monosaccharides et oligosaccharides sulfatés…) (Hanson *et al*., 2004). De la même façon, dans les sols, Kertesz (1999) suggèrent que les substrats des ARS pourraient être plutôt des polysaccharides sulfatés. Il apparaît donc assez difficile actuellement de définir la nature des pools de S organique du sol minéralisés *via* une activité ARS. Ceci résulte notamment du fait des connaissances limitées concernant l'écologie des microorganismes du sol impliqués dans la dynamique de S et notamment des microorganismes possédant une activité ARS.

4. Rôle des communautés fongiques dans la dynamique du soufre

4.1. Quelques éléments de l'écologie des champignons dans les sols

Le sol constitue un écosystème complexe qui présente une biodiversité importante. Concernant la diversité microbienne, les champignons constituent avec les bactéries, les groupes microbiens les plus importants (Kjoller *et al*., 1982 ; Pankhurst *et al*., 1997 ; Thorn *et al*., 1997). Au sein des communautés fongiques du sol, nous pouvons distinguer, selon le type d'interaction établie avec les plantes :

***i) Des champignons symbiotiques* :** il s'agit des champignons mycorhiziens, qui établissent des interactions à bénéfices réciproques avec les racines des plantes (Van der Heijden *et al*., 1998),

ii) Des champignons phytopathogènes : ils établissent des interactions antagonistes avec les plantes (Van der Putten, 2003),

iii) Des champignons saprophytes « libres » : ils participent notamment aux processus de décomposition des matières organiques, d'immobilisation des éléments minéraux (Klein et Paschke, 2004) et établissent des interactions neutres avec la plante.

Les champignons du sol apparaissent donc comme des acteurs majeurs des agrosystèmes, au travers de leur contribution à la dynamique des éléments nutritifs et à la croissance et au développement des plantes (Bardgett et Chan, 1999 ; Brussaard *et al*., 2007). Ces microorganismes participent également à structurer le sol, les réseaux d'hyphes fongiques stabilisant les aggrégats (Beare *et al*., 1997). Cependant, les champignons restent largement négligés d'un point de vue de la caractérisation de leur diversité spécifique mais aussi de leur rôle fonctionnel, notamment dans les sols agricoles (Deacon, 2006). En effet, les approches d'écologie microbienne actuelles sont majoritairement centrées sur les communautés bactériennes, si sont exclus les travaux portant sur les relations entre plante et agents pathogènes du sol ou encore les travaux s'adressant aux communautés de champignons mycorhiziens.

4.1.1. Biomasse fongique et diversité spécifique dans les sols

L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des bactéries (streptomycine) ou des champignons (cycloheximide) a permis d'évaluer la contribution de ces deux groupes microbiens à la biomasse microbienne totale du sol (Anderson et Domsch, 1973 ; Landi *et al*., 1993). Il a ainsi été estimé que les champignons représentent de 11 à 90% de cette biomasse microbienne (Kjoller *et al*., 1982), soit de 37 à 184 g de mycélium par m^2 (Thorn *et al*., 1997). Les champignons sont donc, d'un point de vue biomasse, souvent considérés comme dominants dans les sols. Cependant, en plus du mode d'occupation des sols, les pratiques agricoles influencent significativement la biomasse fongique comparativement à la biomasse bactérienne (Bardgett *et al*., 1996). Ainsi, le travail du sol et en particulier le labour conduit à détruire les réseaux d'hyphes fongiques (Helgason *et al*., 1998). En conséquence, les ratio

champignons / bactéries sont généralement plus faibles dans les sols agricoles comparativement à des sols plus faiblement anthropisés (Bailey *et al*., 2002).

D'un point de vue diversité spécifique, le nombre d'espèces fongiques à l'échelle terrestre est estimé à 1,5 millions (Hawksworth et Rossman, 1997 ; Bridge et Spooner, 2001 ; Hawksworth, 2001). Cette diversité spécifique reste très mal décrite dans la mesure ou seulement 5% de ces espèces ont été caractérisées à ce jour. Dans les sols, la plupart des groupes taxonomiques fongiques ont été mis en évidence et en particulier, les champignons « vrais » (Figure 10). Les Ascomycètes sont considérés comme l'un des groupes prédominants notamment dans les sols agricoles (Viebahn *et al*., 2005).



Figure 10 : phylogénique des champignons (d'après Seif *et al*., 2005 ; James *et al*., 2006a,b ; Liu *et al*., 2006 ; Steenkamp *et al*., 2006)

Domsh *et al*. (1980), sur la base d'isolements, ont estimé que la richesse spécifique d'un sol était approximativement de 450 espèces. Cependant, cela semble largement sous-estimé, notamment parce que certains groupes taxonomiques restent difficiles à isoler et à dénombrer (Ludley et Robinson, 2007). Des études plus récentes, basées sur des approches moléculaires, ont permis de mieux décrire les espèces fongiques présentes dans les sols (Elmhote et Labouriau, 2004 ; Viebahn *et al*., 2005 ; Vujavonic *et al*., 2007). Ces travaux ont montré que les espèces dominantes, en particulier dans le compartiment rhizosphérique, appartiennent principalement aux genres *Fusarium, Nectria, Trichoderma, Penicillium, Paecilomyces, Chaetomium et Verticillium*. Certains de ces genres sont connus pour être impliqués dans la décomposition des matières organiques (Deacon *et al*., 2005 ; Viebahn *et al*., 2005).

4.1.2. Fonctions remplies par les champignons saprophytes dans les agrosystèmes

Comme cela a été décrit en introduction à ce chapitre, les champignons saprophytes libres du sol ont été largement négligés d'un point de vue de la caractérisation de leur diversité spécifique mais aussi de leur rôle fonctionnel. Cependant ces communautés microbiennes jouent un rôle majeur dans les sols, notamment dans les sols agricoles en contribuant à la productivité primaire des agrosystèmes. Les principales fonctions écologiques impliquant ces communautés sont répertoriées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Fonctions écologiques remplies par les communautés microbiennes du sol (d'après Giller *et al*., 1997)

	Fonction écologique	**Groupes microbiens impliqués**
Sol global	Séquestration du C	Biomasse microbienne (principalement biomasse fongique)
	Aggrégation du sol	Champignons (saprophytes, mycorhiziens)
	Décomposition des matières organiques	Champignons (saprophytes) et Bactéries
	Minéralisation et immobilisation des éléments nutritifs	Champignons (saprophytes, mycorhiziens) et Bactéries
Interface sol - plante	Transfert d'éléments nutritifs	Champignons (mycorhiziens)
	Parasitisme	Champignons (pathogènes)

Les communautés de champignons saprophytes interviennent donc dans différentes fonctions écologiques telles que l'aggrégation et la stabilisation des particules de sol (Beare *et al*., 1997), la séquestration du C (Stromberger, 2005) mais surtout la dynamique des éléments nutritifs.

Les champignons saprophytes du sol sont en effet des décomposeurs importants des matières organiques du sol, notamment des matières organiques récalcitrantes présentant un C/N élevé

telles que les celluloses ou les lignines. Des successions populationnelles ont par ailleurs pu être mises en évidence dans la décomposition des litières (Poll *et al*., 2010), selon l'aptitude de ces décomposeurs à utiliser des composés organiques simples et solubles ou des composés complexes. Ces microorganismes interviennent également dans la dynamique des éléments nutritifs au travers des processus de minéralisation / immobilisation d'éléments tel que N (Laughlin et Stevens, 2002). Les travaux récents de Laughlin *et al*. (2008) suggèrent d'ailleurs que les champignons sont plus fortement impliqués que les bactéries dans les processus de minéralisation de N alors que les communautés bactériennes étaient jusqu'alors considérées comme des acteurs majeurs de la dynamique de cet élément (Paul et Clark, 1996).

Le rôle prépondérant des champignons dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques résulte de l'aptitude de ces microorganismes à produire un ensemble d'enzymes extracellulaires (Sinsabaugh, 2005 ; Treseder, 2005). Il s'agit par exemple de protéases et des chitinases impliquées dans la décomposition des protéines et des chitines qui sont les principaux réservoirs de N organique dans les sols ou encore des phosphatases qui interviennent dans la minéralisation des acides nucléiques ou des phospholipides (Sinsabaugh *et al*., 2008). Un ensemble de travaux a par ailleurs mis en évidence que la régulation de ces enzymes à l'échelle de la communauté était complexe et fonction de la disponibilité en substrats et de la limitation du milieu en un élément nutritif donné (Allison et Vitousek, 2005 ; Wallenstein et Weintraub, 2008).

Concernant S, aucune étude, à notre connaissance, n'a jusqu'alors, porté sur le rôle de la communauté fongique du sol dans la dynamique de cet élément et en particulier dans les processus de minéralisation.

4.2. Métabolisme soufré chez les champignons filamenteux

4.2.1. Les différentes formes de S assimilables par les champignons

Les champignons filamenteux assimilent le S principalement sous forme inorganique, même si certains de ces microorganismes peuvent utiliser d'autres sources de S pour leur croissance, tels que la méthionine (Marzluf, 1994), l'acide cystique et la taurine chez *Neurospora crassa* (Borkovich *et al*., 2004) ou la cystéine, dans le cas d'*Aspergillus terreus* et *Penicillium notatum* (Spencer et Harada, 1960).

La voie d'assimilation du S a été caractérisée chez le champignon filamenteux modèle, *Neurospora crassa* (Borkovich *et al.*, 2004) (Figure 11). Les SO_4^{-2} sont absorbés par l'intermédiaire de transporteurs membranaires. La réduction assimilatrice des SO_4^{-2} s'effectue alors en plusieurs étapes : l'ATP sulfurylase catalyse la formation de l'adénosine phosphosulfate (APS) puis une APS kinase phosphoryle l'APS pour donner du phosphoadénosine-phosphosulfate (PAPS). Ces deux étapes d'activation s'effectuent en présence d'adénosine triphosphate (ATP). L'atome de S est alors réduit en sulfite par une PAPS réductase. Puis, la réduction du sulfite en sulfide est catalysée par un sulfite réductase, en présence de $NADPH_2$. Le S est alors incorporé pour la synthèse de la cystéine, le premier acide aminé chez les microorganismes. Cet acide aminé est le précurseur de synthèse de la méthionine. Il faut remarquer que la méthionine peut être également utilisée comme source de S. Cet acide aminé est alors absorbé *via* des perméases à méthionine (Marzluf, 1994 ; Borkovich *et al.*, 2004).

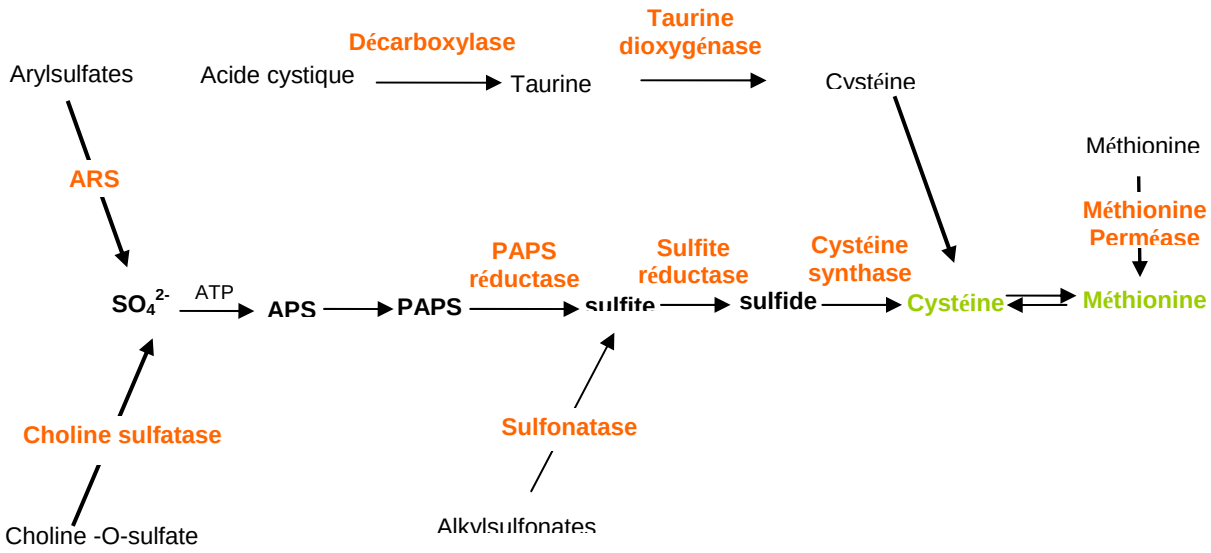


Figure 11 : Voie d'assimilation du soufre chez *Neurospora crassa* (d'après Borkovich *et al.*, 2004)

Dans des conditions de croissance limitantes pour la source préférentielle de S, les microorganismes fongiques peuvent utiliser des formes alternatives de cet élément. Un ensemble de protéines, caractérisées chez *Neurospora crassa*, sont impliquées dans l'utilisation de ces formes alternatives. Nous pouvons distinguer :

i) Des enzymes impliquées dans la dégradation de composés organiques S : les composés organiques utilisés peuvent être des arylsulfates, de la choline sulfate, des sulfonates…,

ii) Les protéines impliquées dans le transport de formes organiques S : il s'agit de perméases comme les perméases à méthionine,

iii) Les protéines impliquées dans la remobilisation de formes de réserve, dans les cellules fongiques (arylsulfates, choline sulfate, alkylsulfonates) (Marzluf, 1994).

4.2.2. Utilisation des esters de sulfate : rôle de l'arylsulfatase

Les esters de sulfate représentent un large pool de S organique dans les sols (paragraphe 3.1.2). Ces esters de S peuvent être potentiellement une forme alternative majeure de S pour les champignons, notamment dans la rhizosphère ou les sulfates peuvent être limitants en raison de la compétition avec la plante pour l'acquisition de cet élément. La dégradation de ces formes organiques fait intervenir des ARS, qui, comme cela a été décrit précédemment (paragraphe 3.2.2.2.2.), sont considérées comme une enzyme clé de la dynamique de S. L'activité ARS a été identifiée chez différents champignons filamenteux tels *Aspergillus oryzae* (Burns et Wynn, 1977), *Aspergillus nidulans* (Hussey et Spencer, 1967), *Neurospora crassa* (Marzluf, 1994) ou encore *Colletotrichum gloeosporoides* (Goodwin *et al*., 2000). Chez ces microorganismes, les ARS présentent une localisation cellulaire complexe. Ainsi, chez *Neurospora crassa*, des isoformes intracellulaires, extracellulaires ou associées aux membranes ont été caractérisées (Scott *et al*., 1970, 1971 ; Paietta, 1989). Pour l'ensemble des champignons filamenteux étudiés à ce jour et notamment *Neurospora crassa,* la régulation de l'activité ARS est aussi complexe. Il a été observé que ces enzymes sont réprimées en présence des sources préférentielles de S que constituent les SO_4^{-2} et la méthionine. Par contre, la synthèse de ces enzymes est induite en conditions de croissance limitantes en S ou en présence de sources alternatives de S tels que la choline sulfate, des arylsulfates, des oligosaccharides sulfatés ou encore l'acide cystéique. Ainsi, Metzenberg et Parson (1966) ont montré que l'activité ARS chez *Neurospora crassa* augmentait d'un facteur 1000 en réponse à des conditions de croissance limitantes en S minéral. Chez *Colletotrichum gloeosporioides*, Goodwin *et al*, (2000) ont montré que l'ARS était régulée positivement au niveau transcriptionnel par des conditions limitantes en S. Burns et Wynn (1977) ont par ailleurs mis en évidence que des isoformes de l'ARS, chez *Aspergillus oryzae,* pouvaient être

différentiellement régulées, pour un même niveau de disponibilité en S du milieu. Ainsi ces enzymes jouent un rôle important dans l'apport du S pour la microflore.

5. Objectifs de la thèse

Depuis trentaine d'années, S est devenu l'un des éléments les plus limitants pour la croissance et le développement des plantes. Ces limitations ont conduit à l'apparition de carences, principalement sur les cultures ayant de forts besoins en S, comme les crucifères. Différents facteurs et notamment la réduction des émissions soufrées (SO_2) dans l'atmosphère, sont à l'origine de ces limitations. En effet, cela a conduit à une réduction de l'entrée du S dans les sols. Ainsi, les plantes dépendent plus étroitement pour leur nutrition, des processus de transformation du S dans les sols.

Tout comme pour N, les formes majoritaires de S dans le sol sont des formes organiques, non disponibles directement pour la nutrition soufrée des plantes. Les microorganismes du sol vont jouer un rôle majeur dans la dynamique de cet élément et en particulier, dans la disponibilité en S minéral (sulfates) pour la plante. En effet, les microorganismes sont susceptibles de produire un ensemble d'enzymes telles que des sulfatases ou des sulfonatases qui sont les effecteurs de la minéralisation du S organique. Par ailleurs, ces microorganismes peuvent également entrer en compétition avec la plante pour l'acquisition des sulfates disponibles dans la solution de sol (processus d'immobilisation). En conséquence, les microorganismes du sol et leurs activités conditionnent fortement la disponibilité en sulfates pour la plante. Dans ce contexte, il apparaît important de mieux comprendre le rôle des communautés microbiennes du sol dans les processus de minéralisation, d'immobilisation et de turn-over du S.

Récemment, les travaux de Schmalenberger *et al*. (2008) ont décrit la contribution de bactéries appartenant aux *Comamonadaceae* et en particulier affiliées au genre *Variovorax*, à la minéralisation des sulfonates (C-S), dans la rhizosphère du blé. Les travaux de Cregut *et al*. (2009), menés au sein de l'équipe Rhizosphère de Nancy, ont quant à eux décrit différents genres bactériens affiliés aux Actinobactéries, Firmicutes et , , et Protéobactéries impliqués dans la minéralisation des esters de sulfates (C-O-S), dans les rhizosphères d'orge et de colza. Cependant, jusqu'alors, le rôle des communautés fongiques dans la minéralisation du S organique n'a pas été abordé, en dépit de l'importance de ces communautés microbiennes dans la décomposition des matières organiques et la dynamique des éléments nutritifs.

Ces travaux de thèse se sont donc concentrés sur la caractérisation de la communauté fongique impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate, dans la rhizosphère de deux plantes ayant des exigences en S contrastées. Trois objectifs majeurs ont été dégagés (Schéma 1) :

1. Identifier, au sein de la communauté fongique totale cultivable, les membres participant à la minéralisation des esters de sulfate, en utilisant comme marqueur fonctionnel, l'activité ARS qui est une enzyme clé de la minéralisation du S organique dans les sols,
2. Caractériser fonctionnellement les souches fongiques possédant l'activité ARS, en analysant l'expression de l'activité ARS dans des conditions de croissance limitantes en S minéral ou en présence d'une forme de S organique,
3. Préciser l'influence de l'espèce végétale (colza *vs* orge) sur l'activité et/ou la taille des communautés fongiques possédant l'activité ARS et les communautés fongiques cultivables totales.

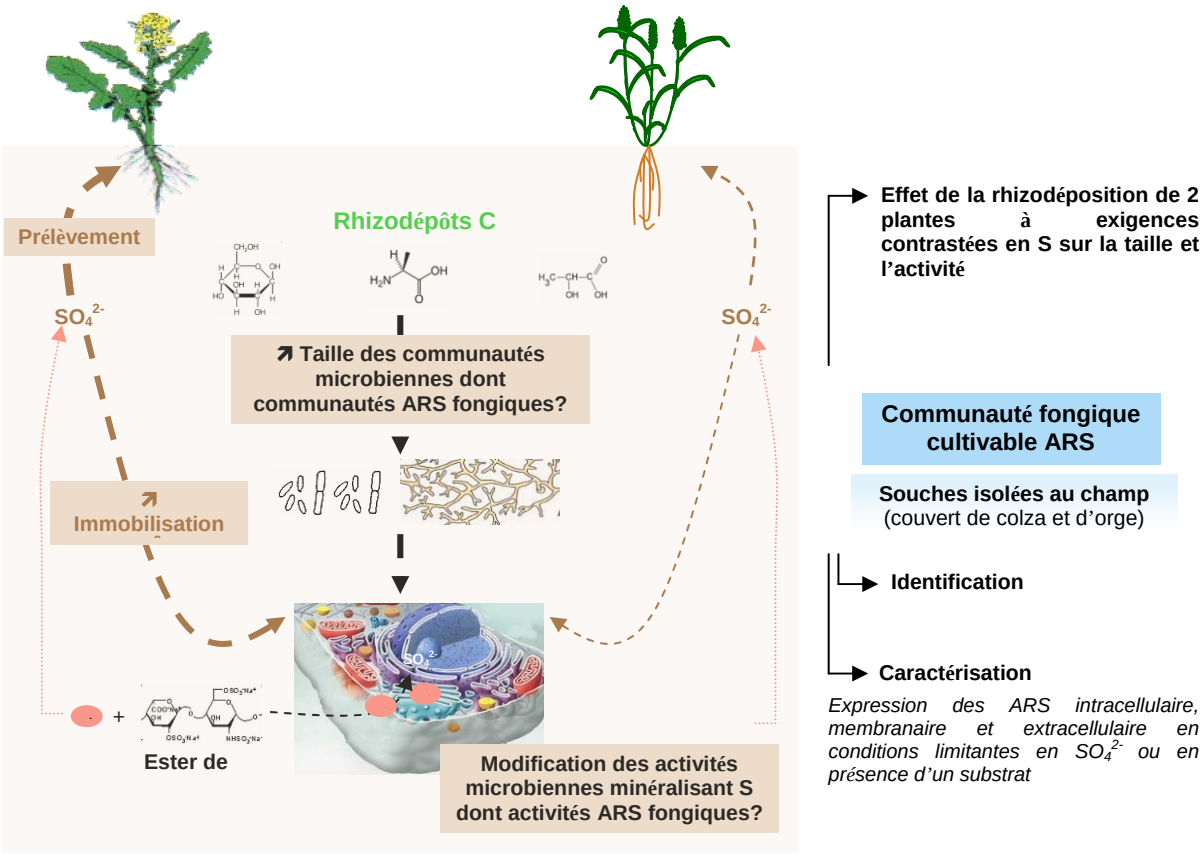


Schéma 1. Contribution des communautés fongiques possédant l'activité ARS à la minéralisation du S et à la nutrition soufrée de la plante

Globalement, ces travaux doivent permettre de cerner l'importance de la communauté fongique possédant l'activité ARS dans la dynamique de S dans les sols et son influence potentielle sur la nutrition soufrée des plantes dans les agrosystèmes.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Caractéristiques des plantes étudiées

Les expérimentations, au champ et en conditions contrôlées, ont été conduites en considérant deux espèces cultivées différant vis-à-vis de leurs exigences en S : le colza (*Brassica napus* L.) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.), qui nécessitent respectivement 80 et 30 unités de S par cycle de culture.

Pour l'essai au champ, des variétés d'hiver ont été utilisées : la variété Twister pour le colza et la variété Nikel pour l'orge. Concernant l'expérimentation en conditions contrôlées, nous avons travaillé avec des variétés de printemps pour des raisons de durée du cycle de culture : pour le colza, nous avons utilisé la variété Fantasia et pour l'orge, la variété Scarlett.

2. Caractéristiques du sol étudié

Les expérimentations au champ et en conditions contrôlées ont été conduites sur le même sol, prélevé sur la commune de Martincourt (54). Le sol est de type argilo calcaire (rendzine) et est représentatif des sols lorrains. Les principales caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras et sont présentées dans le Tableau 6. Il s'agit d'un sol superficiel homogène, de pH basique (8,2), bien pourvu en matières organiques (MO).

Tableau 6 : Analyse physico-chimique du sol de Martincourt réalisée par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras

Argile	**Limon**	**Sable**	**MO**	**C**	**S**	**N**	**C/S**	**C/N**
g kg^{-1} de sol								
357	301	309	38,8	28,8	0,59	3,1	48,8	9,29

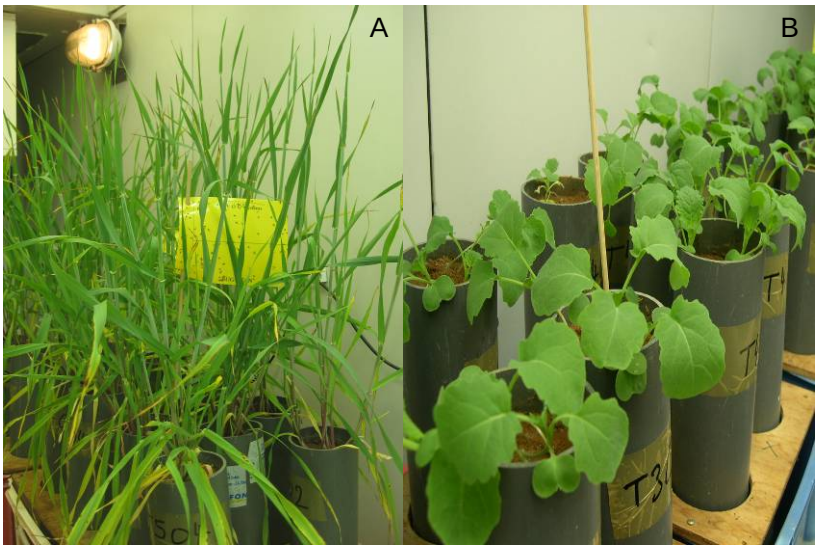
Pour les essais en conditions contrôlées, l'horizon (0-20 cm : horizon humifère labouré, homogénéisé) a été collecté en hiver puis séché à l'air et tamisé à 5 mm, avant utilisation.

3. Protocoles expérimentaux

3.1. Expérimentation en phytotron

Cette expérimentation a été mise en place pour évaluer l'influence de l'espèce végétale (colza *vs* orge) sur l'activité et/ou la taille des communautés fongiques possédant l'activité ARS et les communautés fongiques cultivables totales. Elle permettra de cerner plus précisément l'influence de la plante (espèce végétale et stade de développement) sur la taille et/ou l'activité des communautés fongiques totales et fonctionnelles.

Le dispositif expérimental est illustré par la Photographie 3.



Photographie 3 : Dispositif expérimental des essais réalisés en phytotron (A : orge, B : colza)

Le sol utilisé pour cette expérimentation a été prélevé au champ, en hiver. Il a été mis à sécher à l'air libre, pendant 15 jours et ensuite tamisé à 5 mm. Le sol a été mélangé avec du sable d'aquarium (2/3 sol – 1/3 sable). Préalablement, le sable a été lavé à l'acide sulfurique 10% puis rincé abondamment à l'eau distillée. Deux kg équivalent sec du mélange sol-sable ont été ensuite introduits dans des tubes en PVC de 40 cm de long et 7,3 cm de diamètre intérieur. L'humidité du sol a été ramenée et maintenue à 80% de la capacité de rétention en eau du sol.

L'expérience a consisté en 3 traitements différents, avec 4 répétitions par traitement :

i) le sol nu constituant le témoin, ***ii)*** le sol sous couvert de colza et ***iii)*** le sol sous couvert d'orge. Cinq temps de prélèvement ont été réalisés correspondant à différents stades phénologiques des plantes.

Les tubes de culture ont été disposés de façon aléatoire dans le phytotron et ont subi des rotations tous les 2 jours, afin de pondérer l'effet du gradient de température et de luminosité qui peut exister dans l'enceinte climatique. Cinq à 6 graines de colza ou d'orge ont été semées dans chaque tube, à environ 2 cm de profondeur. Le sol a été ré-humidifié légèrement au moment du semis pour assurer des conditions optimales de germination. Après levée des plantules, 3 plantules ont été conservées dans chaque tube. Les conditions des cultures sont présentées dans le Tableau 7. Pendant la croissance des plantes, le sol a été maintenu à une humidité équivalente à 80% de la capacité de rétention en eau du sol (pesée des tubes tous les 2 jours).

Tableau 7 : Conditions de culture en phytotron

Dates	**T°C Jour**	**T°C Nuit**	**Photopériode(h) Jour**	**Photopériode(h) Nuit**	**Intensité lumineuse**	**Hygrométrie**
18/01 – 01/05	21	16	16	8	250 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$	70 %

A partir du début de la montaison pour l'orge et du stade 4-5 feuilles pour le colza, chaque tube a reçu 15 ml de solution nutritive (Tableau 8) par semaine, soit un apport de 12,5 mg d'azote, 1,8 mg de phosphore et 13,8 mg de potassium par tube.

Tableau 8 : Composition de la solution nutritive (d'après Hoagland et Arnon, 1938 ; Streiff, 1997)

Macro éléments	**Solution mère 100 x (g l^{-1})**	**Concentration dans la solution finale (g l^{-1})**
KNO_3	240	2,4
$MgSO_4$, $7H_2O$	196	1,96
$Ca(NO_3)_2$	380	3,8
$NH_4H_2PO_4$	46	0,46
$FeSO_4$, $7H_2O$	30	0,3
Micro éléments		
H_3BO_3		0,09
$CuSO_4$, $5H_2O$		0,01
$FeCL_3$		1
$MnSO_4$, H_2O		0,27
$NaMoO_4$, $2H_2O$		0,01
$ZnSO_4$, $7H_2O$		0,09

Les tubes ont été échantillonnés 5 fois au cours du développement des deux plantes (Photographie 4) :

i) Pour le colza, aux stades : T0 : semis, T1: 4 à 5 feuilles, T2: floraison, T3 : 10 premières siliques bosselées, T4: 100% siliques, T5 : maturité des siliques,

ii) Pour l'orge, aux stades : T0 : semis, T1: montaison, T2: début épiaison, T3 : fin épiaison, T4 : grains pâteux, T5: maturité.

A



T1 : 4 à 5 feuilles



T2 : floraison



T3 : 10 premières siliques bosselées



T4 : 100% siliques



T5 : maturité des siliques

B



T1 : montaison



T2 : début Epiaison



T3 : fin Epiaison



T4 : grains pâteux



T5 : maturité

Photographie 4 : Les stades de développement du colza (A) et de l'orge (B)

A chaque temps de prélèvement, le sol global et le sol adhérant aux racines, défini comme le sol rhizosphérique, ont été collectés puis conservés à 4°C, en vue des analyses ultérieures. Les racines ont été également collectées et lavées à plusieurs reprises à l'eau distillée, puis congelées à -20°C jusqu'à lyophilisation.

Le schéma, présenté en Figure 12, résume l'ensemble des analyses effectuées dans le cadre de cette expérimentation

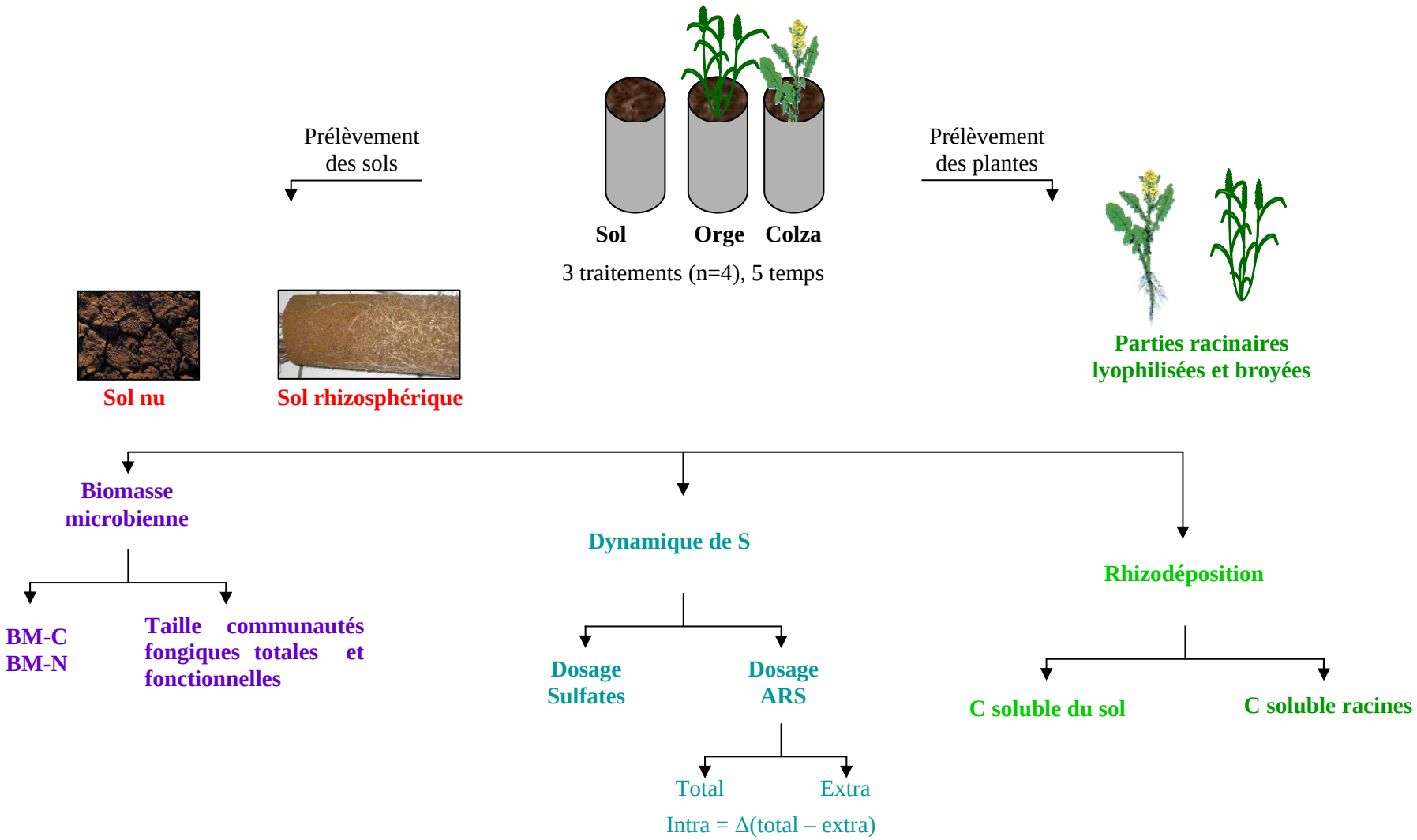


Figure 12 : Schéma récapitulatif des analyses réalisées pour l'expérimentation en phytotron

3.2. Expérimentation au champ

Cette expérimentation a pour but d'une part, de caractériser la structure génétique globale de la communauté fongique et d'autre part, de caractériser taxonomiquement et fonctionnellement des souches fongiques impliquées dans la minéralisation du S organique *in situ*. Le marqueur fonctionnel utilisé pour identifier ces souches est l'arylsulfatase (ARS), une enzyme d'origine microbienne facilement dosable dans les sols et considérée comme une enzyme clé de la minéralisation de S (Tabatabai et Bremner, 1970).

L'expérimentation au champ a été réalisée sur deux parcelles adjacentes présentant un couvert de colza d'hiver (*Brassica napus* var. Twister) et un couvert d'orge d'hiver (*Hordeum vulgare* var. Nikel), durant une saison de culture. La rotation sur les parcelles est une rotation sur 3 ans : colza-blé-orge dans le cas du colza et colza-orge de printemps-orge d'hiver dans le cas de l'orge. Le dispositif expérimental de l'essai au champ est présenté à la Figure 13.

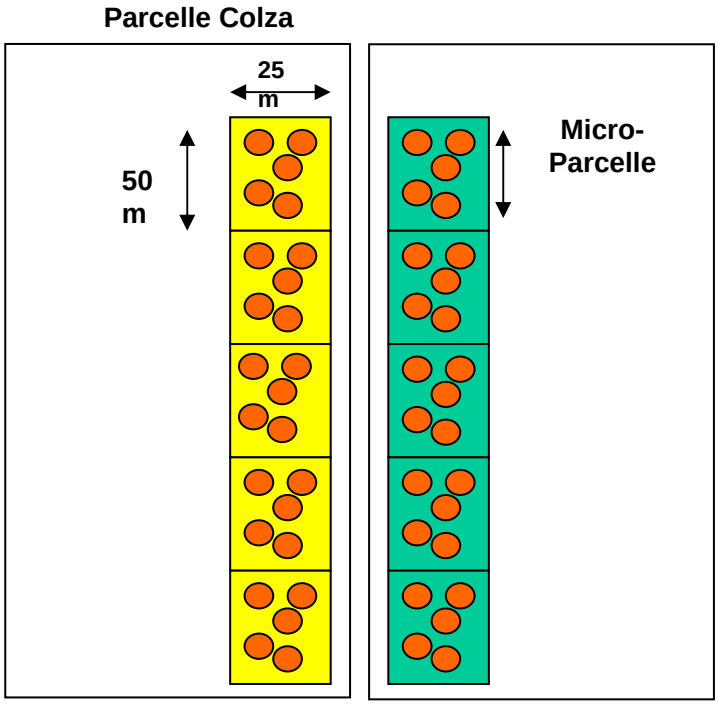


Figure 13 : Représentation du dispositif et des prélèvements réalisés pour l'expérimentation au champ

Chaque parcelle représente une aire de 6250 m^2 (25 × 250 m) qui est divisée en 5 sous parcelles de 1250 m^2 (25 × 50 m) dans lesquelles des prélèvements sont réalisés, à partir de la mi-Mars jusqu'au début de Juin 2005, c'est-à-dire, du début de la reprise de la végétation

jusqu'à la maturité. Dans chacune des sous parcelles, 5 plants de colza et 5 plants d'orge sont prélevés avec le sol adhérant aux racines, ceci en 5 points différents, soit 25 plants pour chaque sous parcelle. Ainsi, 5 répétitions pour chaque parcelle sont réalisées à chaque date de prélèvement. Le sol adhérant aux racines, défini comme le sol rhizosphérique, a été directement prélevé au champ, puis tamisé au laboratoire à 5 mm. (Tableau 9).

Tableau 9 : Dates des prélèvements de sols rhizosphériques et stades de développement des plantes

Plantes	**SR1**	**SR2**	**SR3**	**SR4**	**SR5**
Colza	Rosette	Boutons accolés	Boutons séparés	Floraison	Fin Floraison
Orge	Fin de tallage	Début Montaison	Courant Montaison	Epiaison	Grains laiteux
		Stades végétatifs			Stades reproducteurs

Les cultures ont reçu d'une part, quelques jours avant le second prélèvement, en mars, un apport d'azote sous la forme d'urée et un apport de S sous la forme de sulfate d'ammonium, respectivement de 45 kg ha^{-1} et 18,8 kg ha^{-1} pour le colza et de 40 kg ha^{-1} et de 10 kg ha^{-1} pour l'orge. En avril, 135 kg ha^{-1} d'urée et 56,3 kg ha^{-1} de sulfate d'ammonium ont été appliqués sur le colza et 120 kg ha^{-1} d'urée et 30 kg ha^{-1} de sulfate d'ammonium sur l'orge. Les apports de phosphore, sous la forme de phosphate d'ammonium et de potassium, sous la forme de chlorure de potassium ont été respectivement de 35 kg ha^{-1} et 83 kg ha^{-1} pour le colza et de 35 kg ha^{-1} et 50 kg ha^{-1} pour l'orge. Enfin, les traitements phytosanitaires classiques, propres à chaque culture, ont été effectués.

Les schémas présentés en Figures 14 et 15 résument l'ensemble des analyses effectuées dans le cadre de cette expérimentation.

3.3 Expérimentation sur souches fongiques isolées

A partir du sol rhizosphérique collecté au champ, les souches fongiques possédant l'activité ARS (ARS^{+}) ont été isolées en utilisant un milieu différentiel Czapek modifié, contenant

comme seule source de S, un ester de sulfate couplé à un chromogène, le X-Sulf (5 bromo-4-chloro-3-indoyl sulfate, Sigma®).

Une collection de souches a ainsi été constituée. Ces souches ont été caractérisées génétiquement (PCR-RFLP sur l'ADNr 18S), (Figure 15). Par ailleurs, ces souches ont été caractérisées fonctionnellement. Nous avons en particulier analysé l'expression de l'activité ARS dans des conditions de croissance limitantes en S minéral (Figure 16).

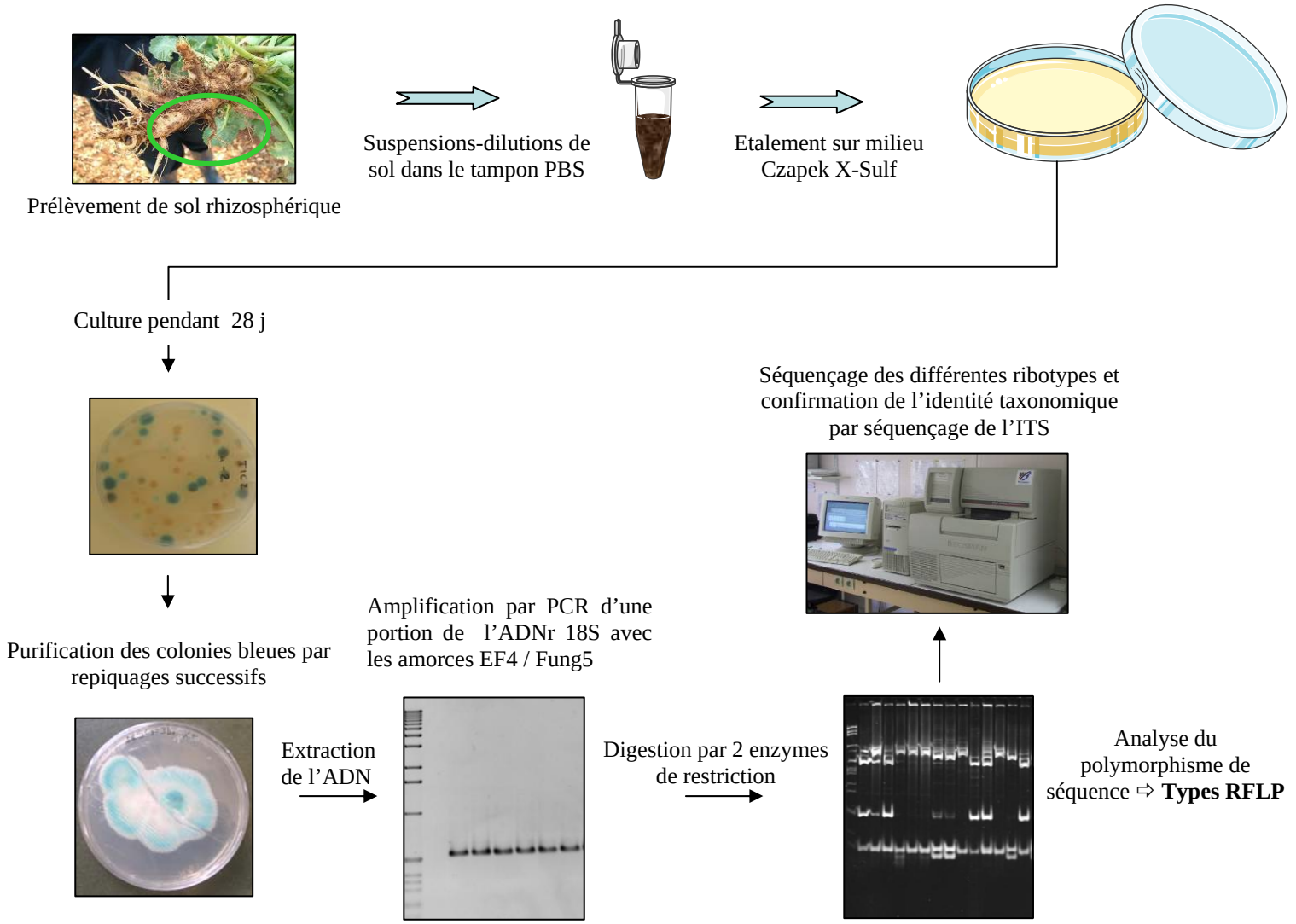


Figure 15 : Isolement et caractérisation taxonomique de la communauté fongique fonctionnelle possédant une activité ARS

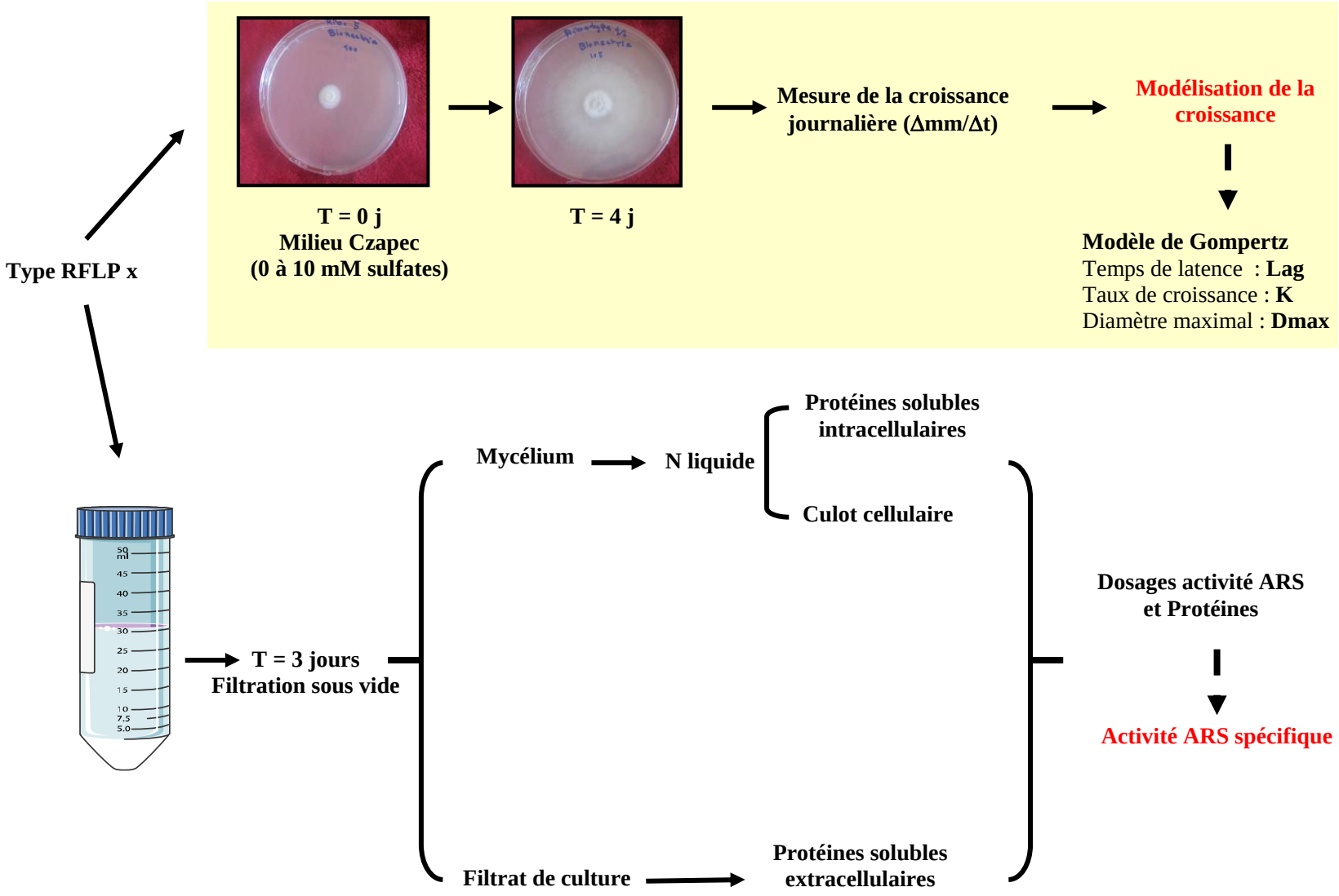


Figure 16 : Caractérisation fonctionnelle des souches fongiques possédant une activité ARS

4. Méthodes analytiques

4.1. Indicateurs de la dynamique du soufre

4.1.1. Dosage de l'activité arylsulfatase

4.1.1.1. Dosage de l'activité ARS sur sol

L'activité ARS potentielle du sol a été dosée, selon le protocole modifié de Tabatabai et Bremner (1970). Les manipulations ont été réalisées au pH optimal de 5,8 (*via* une incubation conduite dans un tampon acétate de sodium), à la température optimale de 37°C, et en présence d'un substrat synthétique, le *p*-nitrophényl sulfate (PNS), d'où la notion d'activité potentielle. Si de telles conditions ne sont pas précisément conformes aux conditions rencontrées *in situ*, elles autorisent néanmoins la comparaison entre les activités de différents sols (Taylor *et al*., 2002).

La méthode utilisée repose sur l'hydrolyse par les ARS présentes dans les échantillons de sol, du substrat synthétique, le PNS. Cette réaction libère du *p*-nitrophénol (*p*-NP), caractérisé par une couleur jaune à pH basique (Tabatabai et Bremner, 1970). Selon Klose et Tabatabai (1999), l'activité ARS du sol est composée de deux fractions : une fraction intracellulaire et une fraction extracellulaire. L'activité ARS extracellulaire correspond à l'activité décelée, sans lyse des cellules microbiennes du sol avant dosage. L'activité ARS totale (intracellulaire + extracellulaire) représente l'activité mesurée, après lyse des cellules microbiennes. L'activité ARS intracellulaire est obtenue par différence entre l'activité ARS totale et l'activité ARS extracellulaire.

Dans notre cas, l'activité ARS totale a été mesurée après lyse des cellules microbiennes du sol à l'aide du chloroforme. Pour ce faire, 1 ml de chloroforme a été ajouté à chaque échantillon de sol puis incubé pendant 2 h. Le chloroforme a été évaporé pendant 18 h sous sorbonne, puis le dosage a été réalisé, selon le protocole défini par Tabatabai et Bremner (1970).
Ainsi, 1 g de sol fumigé ou non à l'aide du chloroforme, a été incubé pendant 1 h à 37°C dans 4 ml de tampon acétate de sodium à 0,5 M (pH 5,8) et 1 ml de PNS à 25 mM. Après incubation, 1 ml de $CaCl_2$ à 0,5 M et 4 ml de NaOH à 0,5 M ont été ajoutés. La solution a été

alors filtrée sur filtre Whatman 2V. L'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde de 400 nm, correspondant à la longueur d'onde à laquelle absorbe le *p*-NP. Pour chacun des échantillons, des « blancs réactionnels » ont été réalisés, afin de soustraire l'absorbance parasite (ne résultant pas du *p*-NP). En d'autres termes, cela annule «le bruit de fond» dû aux composés contenus dans la matière organique du sol et susceptibles d'absorber à la même longueur d'onde que le *p*-NP. La concentration en *p*-NP des échantillons a été estimée à l'aide d'une gamme de *p*-NP, de concentrations définies. L'activité ARS est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité ARS} = \frac{[\text{Concentration en } p\text{-nitrophénol } (\mu g.mL^{-1}) \text{ x volume réactionnel (mL)}]}{[\text{Poids sec de 1g de sol x temps d'incubation (h) x 1g de sol frais}]}$$

L'activité ARS est exprimée en µg *p*-NP g^{-1} sol sec h^{-1}.

4.1.1.2. Dosage de l'activité ARS sur des souches fongiques ARS$^+$

A partir de chaque souche isolée, 8 rondelles de mycélium ont été mises en culture dans le milieu Czapek non limitant en S (Tableau 10) pendant 4 jours, afin de permettre un développement fongique important.

Tableau 10 : Composition du milieu Czapek modifié

Composants	Quantité (l^{-1})
NH_4NO_3	2 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeCl_3$	0,01 g
Solution de Heller (Tableau 11)	1 ml
Glucose	20 g
Néomycine	100 mg

Tableau 11 : Composition de la solution de Heller

Composants de la solution de Heller	**Quantité (l^{-1})**
$ZnCl_2$	0,5 mg
$MnCl_2$	0,1 mg
$CuCl_2$	0,025 mg
$AlCl_2$	0,03 mg
$NiCl_2$	0,03 mg
KI	0,01mg
Acide Borique	1 mg

Une filtration à vide a été réalisée afin de récupérer l'inoculum. Puis, celui-ci a été lavé dans un tampon salin Tris-HCl à 50 mM (pH 7) et a été ensuite inoculé dans un milieu Czapek sans S pendant 48 h, afin d'épuiser les réserves en S des champignons. Après cette étape d'épuisement, les champignons ont été cultivés sur un milieu Czapek. Les cultures fongiques ont alors été placées à 28°C sous agitation (100 rpm) à l'obscurité et les mesures d'activité ARS sont réalisées à 96h après mise en culture.

Après croissance, le mycélium et le surnageant de culture ont été recueillis, par filtration sous vide. Le surnageant de culture contenant les protéines extracellulaires a alors été filtré (0,22 µm), afin d'éliminer les cellules et débris cellulaires qu'il pourrait contenir. Les protéines extracellulaires ont été concentrées par précipitation à l'acétone. Pour cela, un volume d'acétone a été ajouté à chaque échantillon qui a ensuite été incubé pendant 18 h, à -20°C. Après centrifugation à 16 000 g pendant 30 min à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec un volume d'acétone. Après centrifugation pendant 20 min à 4°C, le surnageant a été éliminé. Le culot de centrifugation, considéré comme la fraction de protéines extracellulaires, a été séché et repris dans 1,2 ml de tampon acétate de sodium à 0,5 M à pH 5,8.

Le mycélium a été lavé à 3 reprises dans un milieu Czapek sans S puis broyé en présence d'azote liquide, à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat a été repris dans le tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7), à raison de 100 µl de tampon / 100 mg de mycélium frais. Puis l'ensemble a été centrifugé à 16 000 g pendant 30 min à 4°C. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et défini comme la fraction de protéines intracellulaires solubles. Le

culot de centrifugation a été lavé avec le tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7) et centrifugé pendant 30 min à 16 000 g, à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans 1 ml de tampon acétate de sodium à 0,5 M à pH 5,8. Cette fraction est définie comme la fraction de protéines associées aux membranes.

Les activités ARS des fractions extracellulaire, intracellulaire et membranaire ont été mesurées selon le protocole adapté de Tabatabai et Bremner (1970) (Tableau 12)

Tableau 12 : Volumes des réactifs et conditions d'incubation pour le dosage des activités ARS intracellulaire, extracellulaire et membranaire

Fraction protéique	**Substrat (PNS 25mM)**	**Incubation**	**NaOH (0,5 M)**
500 µl de fraction extracellulaire	1 ml	2h à 37°C	1 ml
500 µl de fraction intracellulaire			
500 µl de fraction membranaire			

L'activité ARS est mesurée par une lecture de l'absorbance à la longueur d'onde de 400 nm. Les activités ARS spécifiques sont calculées après dosage des protéines intracellulaires, extracellulaires et membranaires en utilisant le kit Q-bit (Sigma®), selon les recommandations du fournisseur. L'activité ARS est exprimée en µg de *p*-NP libéré h^{-1} mg^{-1} de protéines. Trois répétitions sont réalisées par traitement.

4.1.2. Dosage des sulfates

Trente grammes de sol sec ont été mis en suspension dans 150 ml de $Ca(H_2PO_4)_2$ à 9 mM. L'extractant retenu permet la désorption des ions SO_4^{2-} et d'une fraction du S organique labile (C-O-S, C-N-S), adsorbés sur les colloïdes du sol. Après agitation pendant 30 min, grâce à un agitateur révolutionnaire orbital (17 rpm), la suspension de sol a été filtrée sur filtre Whatman 42. Dix ml du filtrat ont été prélevés afin de réaliser un dosage des SO_4^{2-} par turbidimétrie (Singh, 1984 ; Tabatabai, 1986). Deux ml de réactif de dosage (10g de $BaCl_2$ et 2g de polyvinylpyrrolidone, dissous dans 100 ml d'eau distillée) et 0,1 ml d'HCl, 2M ont été

ajoutés. Après 1 min d'agitation au vortex, un trouble plus ou moins intense est observé suivant la quantité de SO_4^{2-} présents dans les échantillons, et selon la réaction :

$$SO4^{2-} + BaCl_2 => 2Cl^- + BaSO_4$$

Ce trouble a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 460 nm. La concentration en SO_4^{2-} dans chaque échantillon, a été déterminée grâce à une gamme étalon (0 à 8 mg l^{-1}de sulfate de potassium), réalisée à partir d'une solution mère de sulfate de potassium (1g équivalent S par litre).

Les résidus de filtration ont été séchés à 37°C en vue d'une extraction à l'eau chaude du carbone (paragraphe 4.2.2).

4.2. Indicateurs de la rhizodéposition

4.2.1. Dosage du carbone soluble racinaire

Les racines recueillies à chaque prélèvement de l'expérimentation en phytotron sont congelées puis lyophilisées sous vide. Après broyage pendant 1 min à 30 coups/s, à l'aide d'un broyeur à billes ((Mixer Mills MM 200, Retsch), en présence de 2 billes de 3 mm de diamètre et d'une bille de 5 mm de diamètre, 0,5g de poudre de racines lyophilisées sont incubés dans 15 ml d'eau distillée dans une étuve à 60°C pendant 1 h (Nelson et Lym, 2003). Après incubation, les échantillons sont filtrés sur filtre Whatman 42. Le volume est ajusté à 100 ml. Les concentrations en C soluble sont estimées par un dosage au TOC (Total Organic Carbon CSH Shimadzu), après combustion totale des échantillons. Le C soluble racinaire est exprimé en mg ml^{-1} et sera ramené par g de masse sèche racinaire.

4.2.2. Dosage du carbone labile du sol

Les résidus de filtration, obtenus après dosage des sulfates (paragraphe 4.1.2), ont été séchés à 37°C en vue d'une extraction à l'eau chaude du C labile (Vong *et al.,* 2007). Douze g de sol ont alors été incubés dans 60 ml d'eau distillée, dans une étuve, à 70°C pendant 18 h (Sparling *et al.,* 1998). Après incubation, les échantillons ont été filtrés sur filtre Whatman 42 et les quantités de carbone soluble ont été estimées par un dosage au TOC (Total Organic

Carbon CSH Shimadzu). Le carbone labile du sol est exprimé en mg ml^{-1} et sera ramené par g de sol sec.

4.3. Caractérisation de la biomasse microbienne

4.3.1. Mesure de la biomasse carbonée et azotée

Cette méthode nous permet, à partir d'une étape de fumigation au chloroforme et d'extraction au K_2SO_4, de pouvoir estimer la biomasse microbienne du sol. Deux échantillons (un noté F : « fumigé » et un autre noté NF : « non fumigé ») de 10 g de sol frais d'un même prélèvement ont été constitués. Une première étape de pré-extraction a été réalisée pour les échantillons F et NF : 20 ml de K_2SO_4 à 0,05 M sont ajoutés au sol avant agitation sur un agitateur révolutionnaire à 17 rpm. Après 45 min, la suspension de sol a été tamisée à 2 mm afin d'éliminer les fragments de racines et le tamis a été rincé avec 20 ml de K_2SO_4 à 0,05 M. L'ensemble (sol tamisé et solution) a été filtré sur filtre Whatman 42. Le filtre et le sol ont été placés dans un pilulier en verre et les échantillons NF ont été fermés et stockés à 4°C. Les échantillons F ont été fumigés comme décrit ci-après. Ils ont été placés dans un incubateur en verre après ajout de 4 gouttes de chloroforme. Un flacon contenant quelques billes de verre et 50 ml de chloroforme, un flacon de chaux sodée ont également été disposés dans l'incubateur. L'incubateur a ensuite été fermé hermétiquement. Le vide a été fait jusqu'à ce que le chloroforme soit en forte ébullition pendant 5 min. L'incubateur a ensuite été placé à 25°C dans le noir pendant 24 h. Après fumigation, les vapeurs de chloroforme ont été éliminées.

Les échantillons F et NF ont alors été extraits avec 40 ml de K_2SO_4 à 0,05 M après agitation sur un agitateur à révolution (17 rpm) pendant 45 min. Le mélange a ensuite été filtré sur filtre Whatman 42. Le carbone soluble des solutions de K_2SO_4 a été dosé au TOC (Total Organic Carbon CSH Shimadzu). Le blanc correspondait à la solution de K_2SO_4 à 0,05 M filtrée seule. La biomasse microbienne carbonée (BM-C) a alors été calculée à partir de l'équation (d'après Jenkinson et Ladd, 1981) :

$$BM\text{-}C = EC / 0{,}45$$

Où EC est la différence entre le carbone organique soluble des échantillons F et celui des échantillons NF et 0,45 le coefficient d'extraction correspondant au sol utilisé (Vance *et al.*, 1987).

De la même façon, la biomasse microbienne azotée a été calculée selon la formule :

$$BM\text{-}N = EN / 0{,}54$$

Où EN est la différence entre l'azote organique soluble des échantillons fumigés et celui des échantillons non fumigés (Brookes *et al*., 1985).

4.3.2. Caractérisation de la microflore fongique

4.3.2.1. Estimation de la taille de la communauté fongique totale cultivable et de la communauté fongique fonctionnelle (ARS^+) cultivable

4.3.2.1.1. Préparation des suspensions-dilutions de sol

Les échantillons de sol rhizosphérique ont été tamisés à 5 mm puis agités dans un tampon phosphate (PBS : 7,2 g l^{-1} de NaCl, 2,8 g l^{-1} de Na_2HPO_4, 5,6 g l^{-1} de KH_2PO_4 à pH 7,2) à raison de 10 g de sol dans 100 ml de PBS, pendant 30 min, avec un agitateur orbital à 100 rpm, à température ambiante. Une série de dilutions au dixième (10^{-1} à 10^{-4}) a été réalisée dans le tampon PBS.

4.3.2.1.2. Estimation de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable

Les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ont été utilisées pour réaliser des étalements sur milieu Czapek modifié (composition identique à celle des Tableaux 10 et 11 avec remplacement du $MgSO_4^{2-}$ par du $MgCl_2$ et ajout de 100 mg l^{-1} de X-Sulf et de 20 g l^{-1} d'agar). Un ml de chaque suspension-dilution a été déposé dans une boîte de Pétri, puis 12 ml de milieu Czapek modifié en surfusion ont alors été ajoutés. L'homogénéisation a été réalisée en agitant manuellement les boîtes d'un mouvement circulaire dans le plan horizontal.

Le milieu Czapek modifié est un milieu différentiel permettant d'estimer la taille de la communauté fongique fonctionnelle possédant l'activité ARS. En effet, dans ce milieu la seule source de soufre est un ester de sulfate lié à un chromogène, le 5 bromo-4-chloro-3-indoyl sulfate (Sigma®), (Figure 17).

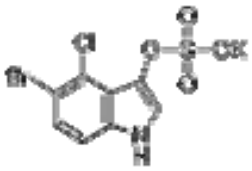


Figure 17 : Formule chimique du 5 bromo-4-chloro-3-indoyl sulfate (X-Sulf)

Les champignons possédant l'activité ARS, (minéralisant cet ester de sulfate pour se pouvoir en S) deviennent bleus suite à la libération du chromogène (Photographie 5). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution. Les comptages des Unités Formant Colonies (UFC) ont été effectués 28 jours après incubation à 28°C à l'obscurité. La taille de la communauté cultivable fonctionnelle est exprimée en UFC g^{-1} de sol sec.



Photographie 5 : Colonies fongiques après étalement sur milieu Czapek-X-Sulf. Les colonies bleues possèdent l'activité ARS

A partir de ces étalements, les colonies bleues ont été isolées et purifiées (Photographie 6).



Photographie 6 : Isolat fongique possédant l'activité ARS sur milieu Czapek-X-Sulf

4.3.2.1.3. Estimation de la taille de la communauté fongique totale cultivable

Des étalements ont été réalisés également sur un milieu PDA (39 g l^{-1}, néomycine 100 mg l^{-1}) afin d'estimer la taille de la communauté fongique totale cultivable. Les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont été retenues pour réaliser les étalements sur ce milieu. Le milieu PDA est un milieu non sélectif permettant d'estimer la densité de communauté fongique totale cultivable. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution. Les comptages des Unités Formant Colonies (UFC) ont été effectués 7 jours après incubation à 28°C à l'obscurité. La taille de la communauté cultivable totale est exprimée en UFC g^{-1} de sol sec.

4.3.2.2. Caractérisation taxonomique

4.3.2.2.1. Extraction de l'ADN des souches fongiques fonctionnelles

Les souches fongiques fonctionnelles ont été isolées par repiquages successifs sur milieu Czapek modifié. L'ADN a été extrait à partir du mycélium recueilli après croissance sur le milieu Czapek. Afin de faciliter la récupération du mycélium, un film de cellophane stérile est déposé en surface du milieu de culture avant ensemencement d'une rondelle de champignon de 9 mm de diamètre, au centre de la boîte (Lecellier *et al.*, 1994). Le mycélium a été prélevé à l'aide d'une spatule puis broyé pendant 1 min à 30 coups/s, à l'aide d'un broyeur à billes (Mixer Mills MM 200, Retsch) en présence de 0,5 g de billes de 106 µm de diamètre, dans un tampon d'extraction (Tris HCl 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 2%, pH 8). Le lysat a alors été placé pendant 30 min à 70°C, en vortexant régulièrement. Après centrifugation à 7 000 g pendant 5 min, le surnageant a été recueilli. Les protéines ont été précipitées par ajout d'1/10 V d'acétate de sodium 5 M, pH 5,5 pendant 18 heures à 4°C. Après centrifugation 5 min à 14 000 g, le surnageant a été recueilli. L'ADN a alors été précipité en présence d'1 V d'isopropanol pendant 18 h à –20°C. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation à 15 700 g pendant 30 min a été lavé à l'éthanol à 70%, séché 10 min à 37°C et repris dans un volume minimal d'H_2O stérile. L'ADN a été purifié à l'aide du kit Geneclean Turbo Nucleic Acid purification Kit (QBiogen MP Biomedical®), selon les recommandations du fournisseur. L'ADN est enfin conservé à –20°C jusqu'à son utilisation.

4.3.2.2.2. Conditions de PCR et analyse RFLP

Afin de réaliser le ribotypage des souches, nous avons tout d'abord défini le couple d'amorces à utiliser pour amplifier l'ADNr 18S. Trois couples d'amorces disponibles dans la littérature ont été testées (Tableau 13).

Tableau 13 : Couples d'amorces testées pour l'amplification de l'ADNr 18S

Couples d'amorces	**Séquences**	**Taille attendue (pbs)**	**Références**
EF4 **Fung5**	5' GGAAGGGRTGTATTTATTAG 3' 5' TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC3'	600	Van Elsas *et al*., 2000
NS1 **NS2**	5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3' 5' GGCTGCTGGCACCAGACTTGC 3'	550	Filion *et al*., 2004
EF4 **EF3**	5' GGAAGGGRTGTATTTATTAG 3' 5' TCCTCTAAATGACCAAGTTTG 3'	1600	Smit *et al*., 1999

La position de ces différents couples d'amorces au niveau de l'ADNr 18S est représentée à la Figure 18.

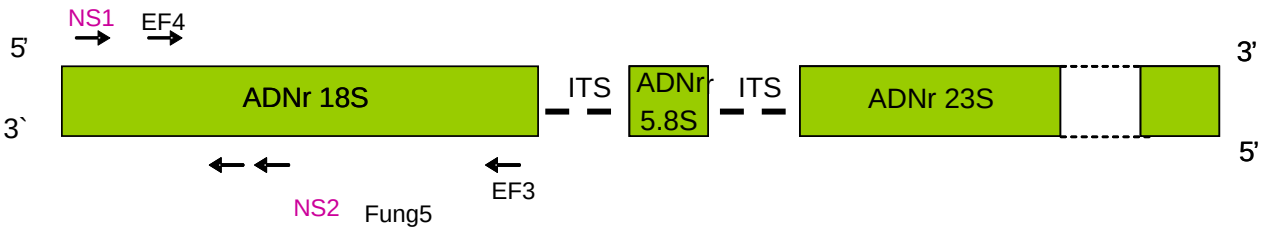


Figure 18: Organisation de l'unité ribosomique chez les champignons et position des amorces

Après plusieurs essais, nous avons choisi le couple d'amorces EF4/Fung5 car avec ce couple d'amorces, nous obtenions un produit d'amplification à la taille attendue pour la plupart des souches.

Le mélange réactionnel a été le suivant : 10 µM de chaque amorce, 2,5 mM de chaque dNTP, 2,5 µl de tampon, 1,5mM de $MgCl_2$, 1,5U de Taq polymérase (Qbiogen MP Biomedicals®), pour un volume final de 25 µL. Les conditions de PCR ont été les suivantes : 94°C pendant 4 min puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 2 min à 72°C et enfin une phase d'élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits d'amplification ont été analysés après séparation en gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE. Les produits d'amplification ont été digérés à l'aide respectivement de 5U des enzymes de restriction *Rsa*I et *Hinf* I, pendant 18 h à 37°C. Après une migration de 4 h à 30 mA, les gels de polyacrylamide à 6%ont été colorés au SYBR Green II (1/10000, Roche Molecular). Les profils de digestion ont été analysés. Les souches fongiques ont alors été regroupées en ribotypes, selon la similitude de leurs profils de digestion. Deux représentants de chaque ribotype ont été séquencés par GATC Biotech (Konstanz, France) puis les séquences obtenues ont été alignées sur BLASTn (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.3.2.3. Analyse de la structure génétique de la communauté fongique du sol

L'ADN a été extrait à partir d'1g de sol selon le protocole décrit par Ranjard *et al.* (200l). L'ADN extrait a ensuite été purifié en deux étapes successives. Dans une première étape, l'extrait d'ADN a été déposé sur une colonne de polyvinylpyrrolidone (PVPP) puis placé pendant 5 min à 4°C. L'ADN a alors été élué de la colonne par centrifugation pendant 2 min à 1 000 g à 10°C. L'extrait d'ADN de sol a été dans une seconde étape purifié à l'aide du kit Geneclean Turbo Nucleic Acid purification kit (Qbiogen MP Biomedicals®) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation. L'analyse de la structure de la communauté fongique a été réalisée par la méthode RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis). Cette technique exploite le polymorphisme de longueur des séquences intergéniques (ITS) de l'opéron ribosomique (Figure 19).

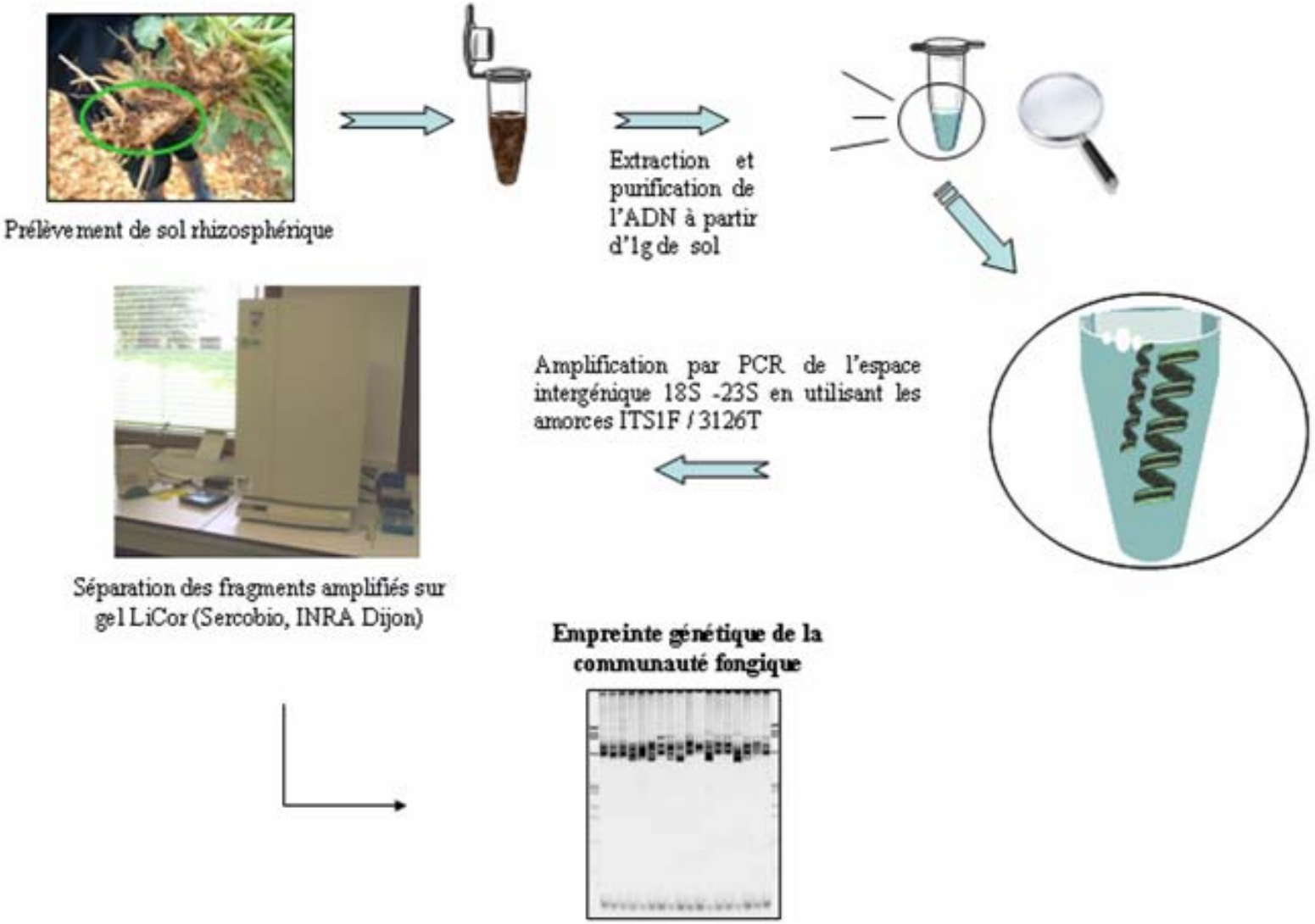


Figure 19 : Analyse de la structure génétique de la communauté fongique globale du sol

L’amplification de la région ITS de l’opéron ribosomique fongique a été réalisée à l’aide des amorces ITS1F et 3126T. La séquence des ces amorces est décrite dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Séquences des amorces ITS1F et 3126T

ITS1F	5’ GTTTCCGTAGGTGAACCTGC 3’
3126T	5’ ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT 3’

Les conditions de PCR utilisées correspondent à celles décrites par Ranjard *et al.* (2001). Les produits d’amplification ont ensuite été séparés sur un gel d’acrylamide à 6% pendant 12 h à 60V. Les données obtenues ont été analysées à l’aide du logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat). Ce logiciel permet d’analyser les profils obtenus selon la taille des bandes.

4.4. Identification des séquences ARS

4.4.1. Amorces dégénérées utilisées

Afin d’identifier les séquences ARS présentes dans le génome des souches fongiques fonctionnelles, des amorces dégénérées ont été dessinées à partir d’alignement de séquences ARS de champignons présentes dans les bases de données. Huit couples d’amorces dégénérées ont ainsi été dessinées (Tableau 15).

Tableau 15 : Séquences, températures d'hybridation des différentes amorces dégénérées et taille des fragments attendus pour les différentes combinaisons d'amorces

Amorces	Séquences (5'→ 3')	Tm potentiel (°C)	Taille des fragments attendus (pbs)
DIR 1	GGN-AAR-TGG-CAY-YTN-GG	50	680
DIR 2	GGN-AAR-TGG-CAY-ATG-GG	50	
REV 1	NCC-CCA-RTC-NSW-CAT-GAA	52	680
REV 2	CCR-TTR-TCN-GCN-GTR-TA	46	
DIR 3	GGC-TAY-AAY-ACN-TAY-TA	42	700
DIR 4	GGG-TAC-AAY-ACN-TAC-TAC-RC	56	
ARF 4	AAY-GTN-ACN-GAY-GT	40	800
ARF 6	RTG-YTG-NCC-DAT-RTG	44	

4.4.2. Amplification et clonage des séquences ARS

Une PCR «Touch-Down» a été réalisée à l'aide des amorces dégénérées décrites précédemment. Le mélange réactionnel a été effectué pour un volume final de 25 µL avec 4 µM de chaque amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 2,5 µL de tampon, 1,5mM de $MgCl_2$ et 2,5U de Taq polymérase (Qbiogen MP Biomedicals®).

Les différentes conditions PCR « Touch-Down » utilisées pour optimiser les conditions d'amplification des séquences cibles sont décrites dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Conditions de PCR utilisées

Etape	Temps	Température (°C)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	4 min	94	1
Dénaturation	30 s	94	18 à 20
Hybridation	45 s	65 à 60 puis diminuer de 1°C par cycle	
Elongation	45 s	72	
Dénaturation	30 s	94	25 à 30
Hybridation	45 s	55 à 42 selon le couple d'amorces	
Elongation	45 s	72	
Elongation finale	10 min	72	1

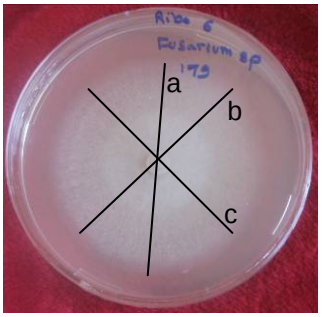
Les produits d'amplification ont été analysés après séparation sur gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE. Les amplimères à la taille attendue ont alors été excisés du gel. L'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®) selon les recommandations du fournisseur. Les produits d'amplification ont alors été clonés dans le vecteur pCR®8/GW/TOPO portant un gène de résistance à la spectinomycine (Invitrogen®). La souche Mach1™ T1 Phage-Resistant ($T1^R$) d'*Escherichia coli* a été transformée avec le plasmide pCR®8/GW/TOPO par choc thermique selon le protocole décrit par le fournisseur (Invitrogen®). Les transformants ont été isolés sur un milieu LB agar contenant 0,1% de spectinomycine. Un transformant a été mis en culture dans 2,5 ml de milieu LB contenant 0,1 % de spectinomycine, à 37°C pendant 18 h. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®), selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides présentant un insert à la taille attendue ont été séquencés par GATC Biotech. Les séquences obtenues ont été alignées sur nBLASTx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.5. Induction de l'activité ARS chez différentes souches en conditions de croissance limitantes en $SO4^{-2}$

4.5.1. Etude de la croissance des souches en conditions limitantes en SO_4^{-2}

Un représentant de chaque ribotype identifié a été mis en culture sur des milieux synthétiques Czapek contenant des concentrations croissantes en SO_4^{-2} (0 – 0,005 – 0,25 –

1,25 – 5 et 10 mM). Une mesure journalière du diamètre des colonies fongiques (3 mesures par colonie), (Photographie 7) sur un pas de temps de 0 à 4 jours a été réalisée. Trois répétitions sont réalisées par traitement.



Photographie 7 : Estimation de la croissance journalière d'une colonie fongique par mesure du diamètre

Les courbes de croissance des cultures fongiques ont été modélisées à partir du modèle de Gompertz (Jiang *et al*., 1994), en utilisant le logiciel SAS (www.SAS.com/France) :

$$D_t = D_{max} * \exp(-\exp((K * 2{,}7182 / D_{max}) * (lag - Temps) + 1))$$

D_t : le diamètre de croissance (cm) à un temps donné
D_{max} : le diamètre maximal (cm)
K : la vitesse maximale de croissance (cm/jour)
lag : la phase du latence (jours).

Ces paramètres ont été comparés par le test de Tukey en utilisant le logiciel SAS.

4.5.2. Conditions d'induction de l'activité ARS selon la disponibilité en SO_4^{-2} dans le milieu

Nous avons précisé les conditions d'induction des activités ARS intracellulaire, extracellulaire et membranaire pour des représentants de chaque ribotype, en réponse à la disponibilité en SO_4^{-2} du milieu de culture. Pour ce faire, les souches fongiques ont été cultivées en milieu liquide contenant différentes concentrations en sulfates : 0 µM, 100 µM, 250 µM, 500µM, 1mM, 2mM, 3mM et 5mM. A l'issue de l'incubation, nous avons mesuré les activités ARS des fractions extracellulaire, intracellulaire, et membranaire, selon le

protocole adapté de Tabatabai et Bremner (1970) détaillé au paragraphe 4.1.1.2. L'activité ARS est exprimée en μg de *p*-NP libéré h^{-1} mg^{-1} de protéines. Trois répétitions sont réalisées par traitement.

RESULTATS

Chapitre 1. Caractérisation de la communauté fongique cultivable minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 1 : Caractérisation de la communauté fongique cultivable minéralisant les esters de sulfate

1. Introduction

Les communautés fongiques sont impliquées dans plusieurs fonctions écologiques dans les sols et sont notamment considérées comme des acteurs majeurs de la décomposition des matières organiques (De Boer *et al*., 2005). Les champignons interviennent en particulier dans la décomposition des matières organiques complexes telles que les lignines et les celluloses *via* la production d'enzymes lytiques extracellulaires (Leonowicz *et al*., 1999 ; Mansfield et Meder, 2003). Cette décomposition est alors un processus « collectif» qui s'organise en successions de populations, entre lesquelles peuvent s'instaurer des relations de compétition, d'antagonisme (Mille-Libdlom et Tranvik, 2003 ; Thormann *et al*., 2003). Par ailleurs, le développement des réseaux d'hyphes dans les sols apparaît comme une stratégie importante pour favoriser « l'accès » à ces composés organiques et favoriser ainsi leur dégradation. Il faut remarquer que si l'aptitude à décomposer certains substrats comme les celluloses est largement répandue chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes, la décomposition des lignines est quant à elle restreinte à certains genres de Basidiomycètes (Rayner et Boddy, 1988).

Les champignons jouent également un rôle important dans la dynamique des éléments nutritifs *via* les processus de minéralisation / immobilisation (Frey *et al*., 2000, 2003) et peuvent donc moduler la biodisponibilité en éléments minéraux pour la plante (Boyle *et al*., 2008). Par ailleurs, les champignons (mycorhiziens) ont la capacité de contrôler le transfert des nutriments vers la plante, grâce au vaste réseau d'hyphes extra et intra-radiculaires (Tian *et al*., 2010). Ainsi, les champignons jouent un rôle important dans la dynamique des matières organiques des sols et dans les cycles biogéochimiques des éléments minéraux (Smith et Read, 1997). Malgré tout, la décomposition des matières organiques et les flux d'éléments nutritifs résultent de l'activité conjointe d'autres communautés microbiennes du sol et en particulier de l'activité des communautés bactériennes. Si nous considérons la minéralisation de N, différents travaux ont montré que les ratios Champignons : Bactéries variaient en réponse à un gradient de fertilité dans les sols et que l'abondance relative des bactéries augmentaient avec la disponibilité en N minéral dans les sols (Pennanen *et al*., 1999 ; Leckie *et al*., 2004 ; Högberg *et al*., 2007). Selon Wallenstein *et al.* (2006), la proportion de

champignons et l'activité de cette communauté microbienne pourraient donc être plus importante dans des sols limités en N minéral ou en d'autres éléments nutritifs.

Parmi ces éléments, le soufre (S), sous sa forme minérale, est indispensable pour la croissance et le développement des plantes, notamment des plantes exigeantes telles que des crucifères comme le colza. Cet élément favorise également l'assimilation et la remobilisation de N.
S est actuellement considéré parmi les plus limitants dans les agrosystèmes. Il est majoritairement présent dans les sols sous des formes organiques (> 95% S total) non directement utilisables par les plantes. Sa disponibilité va être conditionnée par l'intervention d'une microflore, hétérotrophe pour le C, qui assurera la minéralisation des fractions organiques. Ces phénomènes de minéralisation résultent pour partie de l'activité microbienne arylsulfatase (ARS). Cette activité est plus particulièrement impliquée dans l'hydrolyse des esters de SO_4^2 (Tabatabai et Bremner, 1970), formes majoritaires de S dans les sols agricoles et parmi les plus labiles (Bettany et Stewart, 1982 ; McLaren *et al*., 1985).

Dans le contexte actuel de durabilité, l'agriculture se doit de conjuguer productivité et préservation des ressources naturelles. Alors qu'actuellement, un apport systématique «d'assurance» de S, positionné en sortie d'hiver, est réalisé sur colza, une fertilisation S optimisée contribuerait à répondre à ce double enjeu. Un meilleur pilotage de la fertilisation S nécessite cependant de comprendre la dynamique de cet élément dans les sols et en particulier de mieux cerner le rôle des communautés microbiennes possédant l'activité ARS dans les flux de S. Jusqu'à récemment, la microflore impliquée dans la minéralisation du S *via* une activité ARS a été considérée comme une « boîte noire ». Les travaux de Cregut *et al*. (2009) ont permis pour la première fois de décrire les communautés bactériennes cultivables ARS, sous couvert de deux plantes ayant des exigences contrastées en S, le colza et l'orge. Ces travaux ont notamment mis en évidence une relation linéaire positive significative entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne ARS sous les deux couverts, suggérant que l'augmentation de l'activité ARS dans les sols peut être liée à l'augmentation de la taille des communautés bactériennes fonctionnelles. Cependant, les relations observées n'étant que partielles, ces travaux suggèrent également que d'autres communautés microbiennes, telles que les communautés fongiques, pourraient participer à l'activité ARS dans les sols. Dans la littérature, différentes souches fongiques ont été caractérisées pour leur capacité à produire une activité ARS. Il s'agit en particulier de souches de champignons filamenteux appartenant aux espèces *Neurospora crassa* (Marzluf, 1994), *Aspergillus oryzae* (Burns et Wynn, 1977) et

Aspergillus nidulans (Hussey et Spencer, 1967). Aujourd'hui, aucune étude de s'est intéressée à la caractérisation de la communauté fongique du sol possédant l'activité ARS.

L'objectif général de cette première partie de notre travail a donc été de caractériser cette communauté. Pour ce faire, un milieu de culture différentiel a été développé afin de dénombrer et d'isoler, à partir d'échantillons de sols, des champignons capables d'hydrolyser les esters de sulfate *via* une activité ARS. Nous avons suivi l'évolution de la densité de la communauté fongique ARS que nous avons mis en relation avec les évolutions d'activité ARS potentielle du sol. Enfin, nous avons caractérisé taxonomiquement les différents isolats fongiques.

Ce travail a été réalisé en considérant deux cultures qui présentent des besoins contrastés en S : le colza et l'orge et à partir d'échantillons de sols rhizosphériques collectés *in situ* durant le cycle de végétation de ces deux plantes. Le choix de considérer ces deux couverts résulte de travaux précédents réalisés au laboratoire qui ont mis en évidence une activité ARS spécifique supérieure sous couvert de colza comparativement à l'orge (Vong *et al*., 2004, 2007). Ces travaux suggèrent en conséquence l'existence d'une microflore différente en termes de taille, de diversité et/ou d'activité sous ces deux couverts.

2. Résultats et Discussion

2.1. Caractérisation de la structure génétique des communautés fongiques globales

Nous avons, dans un premier temps, comparé la structure génétique des communautés fongiques globales sous couvert de colza et d'orge, afin d'apprécier l'influence de ces deux plantes *via* leurs rhizodépôts, sur ces communautés microbiennes. Afin de tenir compte des variations temporelles de la rhizodéposition au cours de la phénologie des 2 plantes, un suivi de la dynamique de la structure des communautés fongiques telluriques, a également été réalisé. Cette étude a été réalisée en utilisant l'outil RISA. Les profils génétiques obtenus après amplification des séquences intergéniques des unités ribosomiques, diffèrent dans leur complexité. En effet, de 20 à 30 bandes étaient détectées selon les échantillons. De plus, la majorité des bandes détectées sont comprises entre 550 et 750 pb (données non montrées). D'après Ranjard *et al*. (2001), les tailles moyennes des séquences intergéniques chez les

Ascomycètes et les Basidiomycètes sont respectivement de 481 pb (390 à 766 pb) et 591 pb (434 à 882 pb). Ceci suggère en conséquence une bonne représentativité de ces groupes fongiques sous couverts de colza et d'orge, qui sont par ailleurs considérés comme des groupes prédominants dans les sols (Viebahn *et al.*, 2005). A partir des profils génétiques obtenus, une matrice a été construite sur la base de la présence / absence des bandes et de leur poids moléculaires. Cette matrice a ensuite été traitée par une Analyse en Composantes Principales (ACP).

Les premières ACP ont été réalisés afin de comparer la structure génétique des communautés fongiques globales sous les deux couverts (Figure 19).

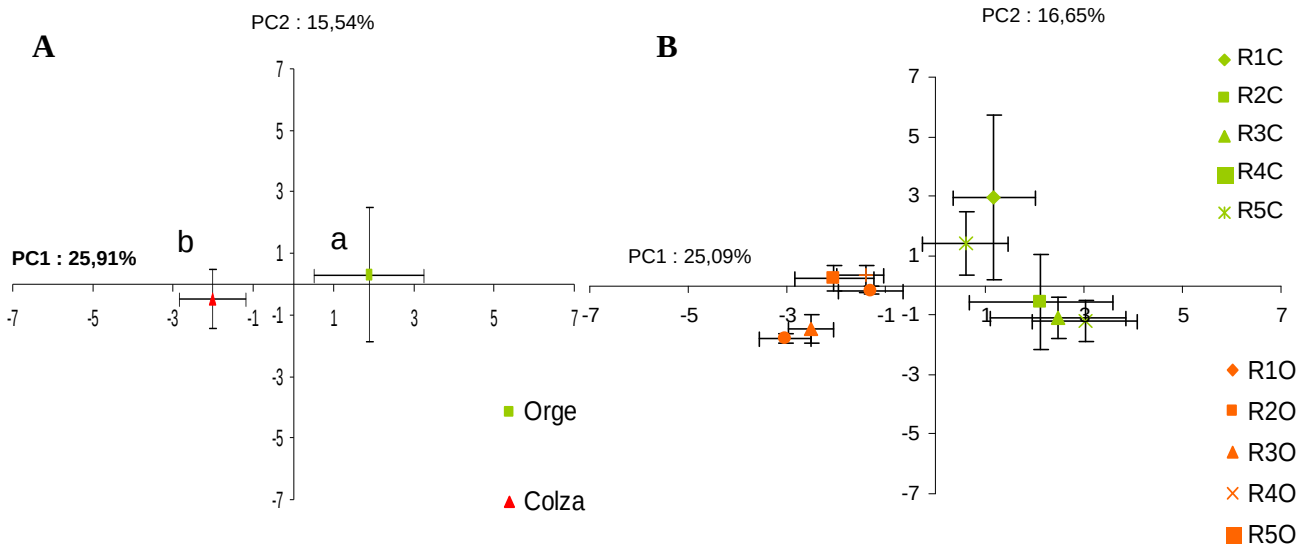


Figure 20 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés fongiques rhizosphériques sous couvert de colza et d'orge, tous temps confondus (A) et en considérant les 5 temps de prélèvements (B). Les coordonnées suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à $p<0,05$ (n = 4). Les prélèvements correspondent aux stades : R1O : fin tallage ; RIC : rosette ; R2O : début montaison ; R2C : boutons accolés ; R3O : courant montaison ; R3C : boutons séparés ; R4O : épiaison ; R4C : pleine floraison ; R5O : grain laiteux ; R5C : fin floraison avec O pour l'orge et C pour le colza

Nous avons tout d'abord comparé la structure génétique des communautés fongiques, tous temps confondus (Figure 20, A). Les axes PC 1 et PC 2 représentent respectivement 25,91% et 15,54% de la variabilité totale. Cette ACP révèle l'influence de l'environnement rhizosphérique sur la structuration de la communauté fongique globale. En effet, la structure

génétique de cette communauté sous couvert de colza (coordonnées négatives sur l'axe PC 1) est significativement différente de celle sous couvert d'orge (coordonnées positives sur l'axe PC 1). De nombreux travaux ont démontré l'influence de la plante (espèces végétales et cultivars d'une même espèce végétale) sur la composition des communautés microbiennes rhizosphériques (Olsson et Alström, 2000 ; Marcial Gomes *et al*., 2003 ; Viebahn *et al*., 2005 ; Wu *et al*., 2007 ; Berg et Smalla, 2009). La plante *via* sa rhizodéposition est d'ailleurs considérée comme l'un des déterminants majeurs de la structuration des communautés microbiennes rhizosphériques, même si d'autres facteurs biotiques et abiotiques peuvent également intervenir. Contrairement à l'orge, le colza qui est une Brassicacée, libère dans la rhizosphère des glucosinolates, métabolites secondaires connus pour leurs propriétés biocides. Les travaux récents de Bressan *et al*. (2009) ont montré l'influence majeure de ces composés sur la structure des communautés fongiques dans la rhizosphère d'*A. thaliana*, autre Brassicacée produisant des glucosinolates. Ces composés pourraient en conséquence expliquer partiellement les différences de structure observées entre l'orge et le colza.

Une seconde ACP a été réalisée afin de comparer la structure génétique des communautés fongiques sous les 2 couverts, en considérant chacun des temps de prélèvement (Figure 19, B). Qu'il s'agisse du couvert d'orge ou de colza, nous observons une évolution des structures génétiques au cours la phénologie suggérant une influence spécifique de chacune des plantes au cours du temps. Nous avons donc réalisé une ACP pour chaque couvert, afin de mieux caractériser l'évolution temporelle de la structure génétique des communautés fongiques (Figure 21, A et B).

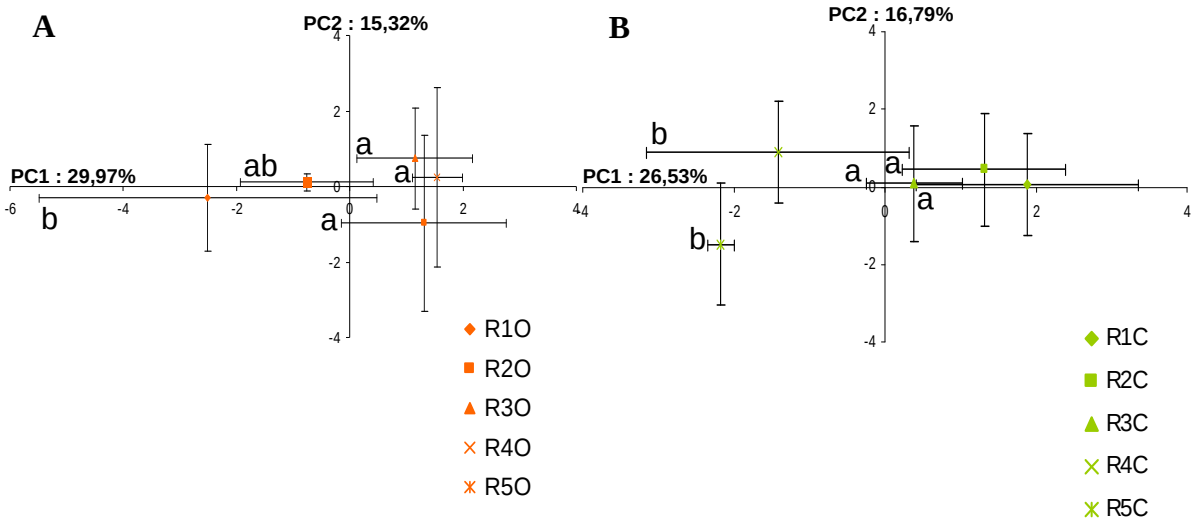


Figure 21 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés fongiques rhizosphériques sous couvert d'orge (A) et de colza (B). Les coordonnées suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à $p<0,05$ (n = 4). Les prélèvements correspondent aux stades : R1O : fin tallage ; RIC : rosette ; R2O : début montaison ; R2C : boutons accolés ; R3O : courant montaison ; R3C : boutons séparés ; R4O : épiaison ; R4C : pleine floraison ; R5O : grain laiteux ; R5C : fin floraison, avec O pour l'orge et C pour le colza

Les analyses ACP mettent en évidence une évolution temporelle des structures génétiques des communautés fongiques, observables, pour les deux couverts, sur l'axe PC 1.
Sous couvert d'orge (Figure 20, A), les axes PC 1 et PC 2 expliquent respectivement 29,97% et 15,32% de l'inertie totale. L'axe PC 1 discrimine significativement la structure génétique de la communauté fongique du stade fin tallage (R1, coordonnées négatives) et celles des stades début (R2) – courant (R3) montaison et floraison (R4) (coordonnées positives). Par contre, la structure génétique de la communauté fongique au stade grain laiteux (R5) présente une structuration intermédiaire à celle du stade fin tallage (R1) et des stades suivants la montaison.
Sous couvert de colza (Figure 20, B), les axes PC 1 et PC 2 expliquent respectivement 26,53% et 16,79% de l'inertie totale. Tout comme pour l'orge, l'axe PC 1 discrimine les communautés fongiques au cours du temps. Une évolution significative de la structure des communautés fongiques n'est observée qu'entre les stades début floraison (R3, coordonnées positives) et pleine floraison (R4, coordonnées négatives). La structure génétique des communautés fongiques au stade fin floraison (R5, coordonnées négatives) est proche de celle du stade pleine floraison et significativement différente de celles des stades rosette (R1), boutons accolés (R2) et boutons séparés (R3) (coordonnées positives).

L'ensemble de ces résultats suggère donc une évolution temporelle des structures génétiques des communautés fongiques, différente selon le couvert considéré. Il faut remarquer que dans les deux cas, une variabilité importante des répétitions d'un même traitement sont observées, qui traduit sans doute l'hétérogénéité du sol à la parcelle (Wu *et al*., 2007). Cette variabilité est susceptible de masquer partiellement certains effets liés à la phénologie des plantes. Cependant, les évolutions observées pourraient résulter des modifications des profils d'exsudation des plantes au cours de leur croissance (Kuzyakov et Domanski, 2000 ; Baudoin *et al.,* 2002). Il a en effet été montré d'une part, que d'un point de vue quantitatif, l'allocation

des photosynthétats aux racines, diminue avec l'âge de la plante et notamment à partir des stades reproducteurs et, d'autre part, que la composition des rhizodépôts est altérée par la physiologie de la plante lors de son développement (Gransee et Wittenmayer, 2000). Nous avons également observé, dans le cas de l'orge, que la structure de la communauté fongique, après épiaison (stade grain laiteux) montre une structure proche de celle observée à fin tallage. Ce stade correspond à notre premier temps de prélèvement, réalisé au début de la reprise de végétation au printemps. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'influence de la plante sur les communautés microbiennes lors de la reprise de végétation, est, tout comme aux stades reproducteurs, faible. En conséquence, les structures génétiques comparables entre le premier temps de prélèvement et le stade grain laiteux suggèreraient une résilience de l'effet rhizosphère sur les communautés fongiques, sous couvert d'orge. Ceci a précédemment été observé dans le cas des communautés bactériennes sous différents couverts (Mougel *et al*., 2005 ; Cregut, 2009). Ce phénomène n'a pas été, par contre, observé dans le cas des communautés fongiques sous couvert de colza. L'effet rhizosphère pourrait être en conséquence plus persistant sous couvert de colza vis-à-vis de cette communauté microbienne, comme cela a été observé dans la rhizosphère de *Medicago truncatula* (Mougel *et al*., 2005).

En conclusion de cette première partie, nous remarquons que l'orge et le colza influence différemment les communautés fongiques globales. Ces effets différentiels pourraient également concerner les communautés fongiques impliquées dans la minéralisation du S et influencer en conséquence, leur structure, leur taille et leur activité, sous les deux couverts. Nous avons donc entrepris, dans une deuxième partie de ce travail, de développer un milieu de culture nous permettant d'identifier certaines des communautés fongiques impliquées dans la minéralisation de S.

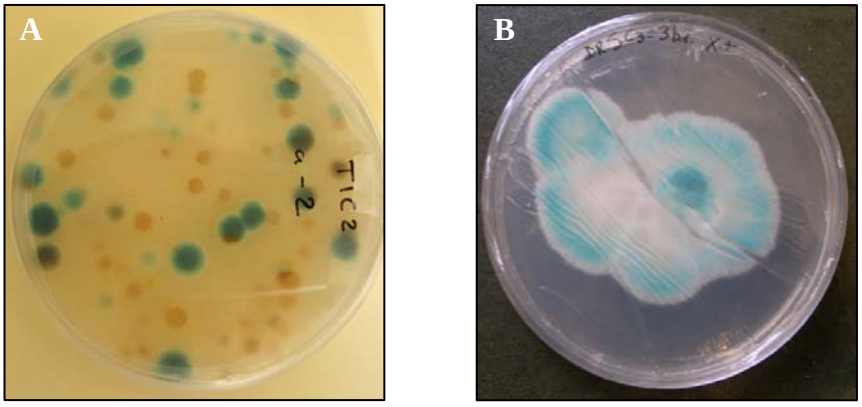
2.2. Mise au point d'un milieu de culture différentiel permettant de détecter les champignons du sol possédant l'activité arylsulfatase

2.2.1. Mise au point du milieu de culture

L'activité ARS est considérée comme une enzyme clé de la dynamique du S dans les sols. Cependant, à notre connaissance, l'identification de la communauté fongique possédant cette activité dans les sols agricoles n'a été que très peu abordée. Nous avons donc développé un

milieu de culture différentiel afin d'isoler, de dénombrer et de purifier, à partir d'échantillons de sol, des champignons possédant l'activité ARS et susceptibles de participer ainsi à la minéralisation du S organique. Bien que ces approches de « mise en culture » ne permettent d'accéder qu'à une fraction minoritaire des microorganismes du sol (Borneman et Hartin, 2000 ; Bridge et Spooner, 2001), elles permettent de constituer une collection de souches microbiennes qui peut alors être exploitée pour étudier les mécanismes régulant l'activité ARS mais aussi la compartimentation de cette activité, à l'échelle cellulaire. En effet, les connaissances disponibles actuellement sont relativement limitées et proviennent essentiellement d'études menées sur le champignon modèle *Neurospora crassa* (Paietta, 1989 ; Marzluf 1994, 1997), qui n'est pas présent dans les sols des régions tempérées.

Les milieux de culture traditionnellement utilisés en microbiologie Pasteurienne sont des milieux non limitants et contenant du S sous une forme minérale. Or, la majeure partie des ARS microbiennes sont réprimées sur des milieux de croissance contenant des SO_4^{2-} (Dodgson *et al*., 1982 ; Paietta, 1989 ; Kertesz *et al*., 1993). Nous avons donc adapté un milieu de culture Czapek (Vidal *et al*., 1999) afin, d'une part, d'exclure le S minéral et d'autre part, d'apporter comme seule source de S, un ester de sulfate. La forme de S organique retenue est le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate (X-Sulf), (Wyss, 1999). Il s'agit d'un substrat chromogène des ARS. L'hydrolyse enzymatique de ce composé conduit à la libération d'un groupement chromogène bleu. Les colonies fongiques possédant l'activité ARS sont donc révélées par leur coloration bleue (Photographie 8). Ces colonies sont identifiées après 28 jours d'incubation à 28°C.



Photographie 8 : Exemples d'un étalement (A) à partir d'une suspension-dilution de sol et d'une souche fongique isolée (B) sur le milieu Czapek modifié. Les colonies fongiques présentant une activité ARS présentent une coloration bleue

2.2.2. Validation de l'utilisation du milieu de culture

L'utilisation du milieu de culture Czapek modifié pour le dénombrement et l'isolement des champignons possédant l'activité ARS a été validée à partir d'échantillons de sol (site expérimental de Martincourt, 54) collectés d'avril à juin, sous couverts de colza et d'orge.

Nous avons tout d'abord estimé la densité des champignons possédant l'activité ARS. Les résultats mettent en évidence des densités comprises entre 10^4 et 10^5 UFC g^{-1} de sol sec, quelle que soit la date de prélèvement et quel que soit le couvert (Figure 21).

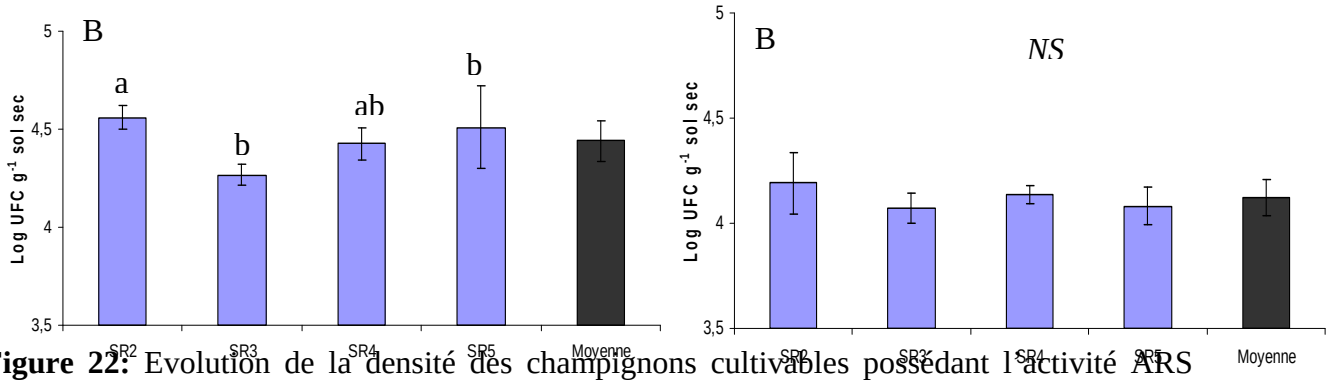


Figure 22: Evolution de la densité des champignons cultivables possédant l'activité ARS sous couvert de colza (A) et d'orge (B). Les valeurs moyennes (n=5) avec des lettres différentes sont significativement différentes à $p<0,05$; NS : non significatif à $p<0,05$

Ces données sont en accord avec celles obtenues sur le sol d'Epoisses (dispositif expérimental Micagro, INRA Dijon) qui présente des caractéristiques physico-chimiques différentes (Slezack-Deschaumes, communication personnelle).

Nous observons que les densités de champignons possédant l'activité ARS, tous temps confondus, sont significativement supérieures sous couvert de colza comparativement à l'orge. Ces densités sont de 4,4 log UFC g^{-1} de sol sec sous couvert de colza et de 4,1 log UFC g^{-1} de sol sec sous couvert d'orge (Figure 21). Par ailleurs, nous observons que ces densités restent relativement stables aux différentes dates de prélèvement, aussi bien sous couvert de colza que sous couvert d'orge. Seule une diminution significative de la densité de la communauté fongique possédant l'activité ARS est observée sous couvert de colza, à mi floraison (prélèvement SR3) comparativement à la densité estimée début floraison (prélèvement SR2).

Dans un second temps, nous avons mis en relation les densités de champignons cultivables possédant l'activité ARS et l'activité ARS totale mesurée au champ. Cette activité montre des valeurs variant de 62 à 108 µg p-nitrophénol g^{-1} sol sec h^{-1} sous couvert de colza et de 61 à 85 µg p-nitrophénol g^{-1} sol sec h^{-1} sous couvert d'orge. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues lors de précédentes études (Klose *et al*., 1999 ; Dedourge *et al*., 2003 ; Vong *et al*., 2004). Les régressions linéaires réalisées mettent en évidence une relation linéaire positive entre l'activité ARS totale et les densités de champignons fonctionnels, avec des coefficients de détermination significatifs, sous couvert de colza (R^2 = 0, 218, *P<0,05*) et sous couvert d'orge (R^2 = 0, 216, *P<0,05*) (Figure 22).

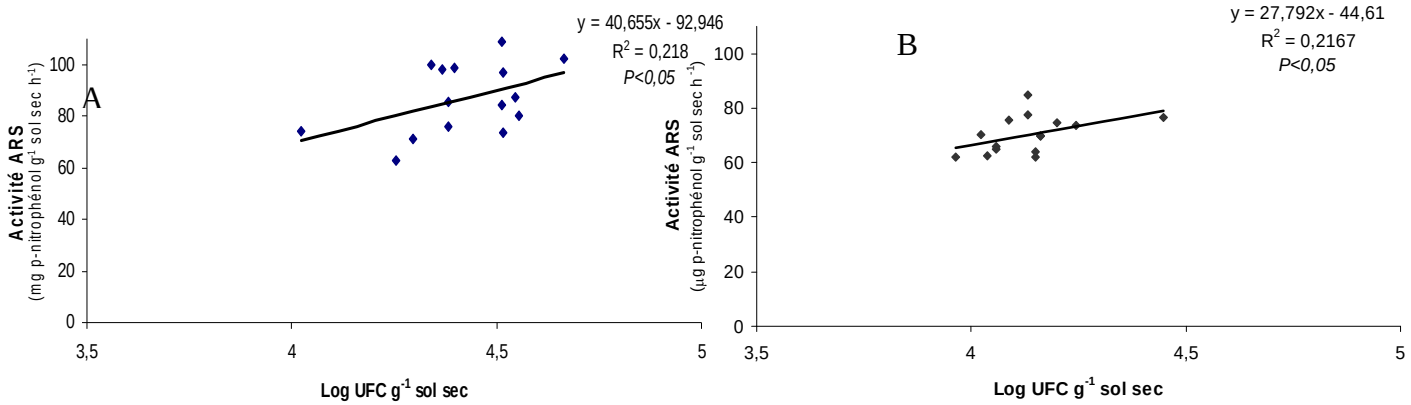


Figure 23 : Régression linéaire entre l'activité ARS totale et la densité de champignons cultivables possédant l'activité ARS, sous couvert de colza (A) et d'orge (B)

Ces résultats suggèrent en conséquence un lien entre la densité des champignons cultivables possédant l'activité ARS et l'ARS totale mesurée *in situ*. Ceci est à mettre en relation avec les résultats de Cregut *et al.* (2009) qui, sur le même dispositif expérimental, ont préalablement établi une relation entre la taille des communautés bactériennes fonctionnelles cultivables et l'activité ARS totale. La taille de ces deux communautés microbiennes cultivables et notamment de la communauté fongique contribue donc à expliquer les évolutions d'activité ARS totale du sol. Il faut remarquer cependant que les relations établies dans les deux cas ne sont que partielles. Ceci pourrait résulter du fait que les communautés microbiennes fonctionnelles ne représentent qu'une faible proportion des communautés fonctionnelles totales. Par ailleurs, comme pour d'autres enzymes du sol (Allison et Vitousek, 2005 ; Geisseler et Horwath, 2008), l'activité ARS totale du sol est composée par un ensemble de systèmes enzymatiques différentiellement régulés par les conditions environnementales mais

aussi par la disponibilité en SO_4^{2-} et/ou en substrats organiques dans le milieu. Ces systèmes enzymatiques pourraient donc être régulés indépendamment de la croissance microbienne.

Dans un troisième temps, nous avons donc engagé une démarche d'isolement des souches fongiques possédant l'activité ARS, afin de constituer une collection de souches nous permettant d'étudier ultérieurement les mécanismes régulant l'activité ARS. Nous avons ainsi pu obtenir une collection de 450 souches fongiques possédant l'activité ARS *via* leur aptitude à hydrolyser le X-Sulf, isolées à la fois des rhizosphères de colza et d'orge.

Il ressort ainsi que le milieu modifié Czapek-X-Sulf que nous avons développé est un milieu permettant d'une part, d'estimer la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable et d'autre part, d'isoler des souches fongiques possédant l'activité ARS, à partir d'échantillons de sol prélevés *in situ*.

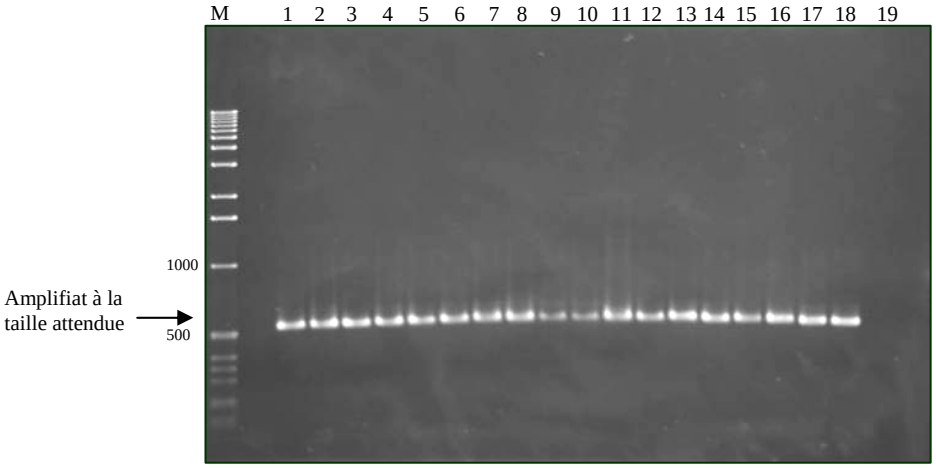
2.3. Caractérisation des souches fongiques isolées

2.3.1. Caractérisation taxonomique

Nous avons réalisé une caractérisation taxonomique de la collection de souches fongiques constituée après isolement sur le milieu Czapek-X-Sulf. Cette caractérisation a été effectuée par une approche moléculaire qui permet une identification plus aisée qu'avec une approche conventionnelle de morphotypage des colonies fongiques (Anderson et Carney, 2004). Nous avons donc tout d'abord engagé une analyse RFLP ciblant l'ADNr 18S afin d'identifier les différents type RFLP présents au sein de la collection de souches. L'identité taxonomique de chaque type RFLP a ensuite été établie par séquençage d'une portion de l'ADNr 18S et confirmée par séquençage de l'ITS.

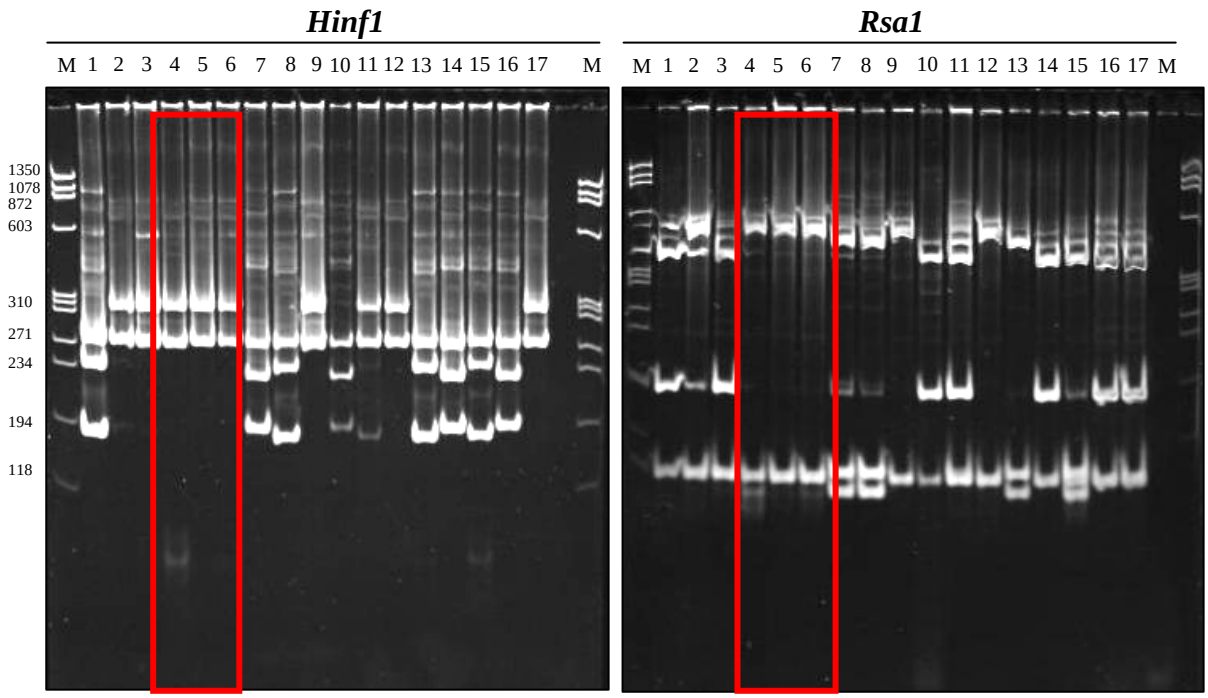
Concernant l'analyse RFLP, 3 couples d'amorces disponibles dans la littérature et permettant d'accéder aux principaux groupes de champignons présents dans les sols, ont été testés. Le premier couple d'amorce utilisé, EF3-EF4, permet l'amplification d'un fragment de l'ADNr 18S de 1500 pb (Smit *et al*., 1999). Les 2 autres couples d'amorces, NS1-NS2 (White *et al*., 2004) et EF4-Fung5 (Smit *et al*., 1999) permettent quant à eux d'amplifier un fragment de l'ADNr 18S d'environ 600 pb. Les couples d'amorces EF3-EF4 et NS1-NS2 ont permis d'obtenir un produit d'amplification à la taille attendue pour seulement, 20 et 80% des

échantillons, respectivement. Le couple d'amorces EF4-Fung5 a permis d'obtenir un produit d'amplification pour 95% des échantillons (Photographie 9).



Photographie 9 : Exemple d'analyse en gel d'électrophorèse des produits d'amplification obtenus en utilisant les amorces EF4-Fung5. M : marqueur de taille (pb) ; 1 à 19 : échantillons correspondant à 20 isolats fongiques

Le couple d'amorces EF4-Fung5 a donc été retenu pour l'analyse. Les produits d'amplification obtenus pour chacune des souches ont été digérés à l'aide des deux enzymes de restriction *Rsa1* et *Hinf1*. L'utilisation de 2 enzymes a été nécessaire en raison de la petite taille du produit d'amplification (environ 550 pb) et ce, afin d'augmenter le niveau de discrimination entre souches. Les souches présentant le même profil de restriction avec les 2 enzymes ont été regroupées au sein d'un même type RFLP (Photographie 10).



Photographie 10 : Profils de digestion du fragment d'ADNr 18S obtenu avec les enzymes de restriction *Hinf*1 et *Rsa*1. Les pistes 4 à 6, encadrées en rouge, correspondent à 3 isolats qui présentent les mêmes profils de digestion avec les deux enzymes de restriction et qui sont regroupés dans le même type RFLP

M : marqueur de taille (pb) ; Pistes 1 à 17 : échantillons correspondant à 17 isolats fongiques

Sur les 450 souches isolées, nous avons identifié 23 profils RFLP différents. Le nombre de types RFLP identifié est encore avec les données de la littérature. Ainsi, Filion *et al*. (2004), à partir d'une banque de clones 18S, ont identifiés 31 types RFLP différents dans la rhizosphère de *Picea mariana*.

Deux représentants de chaque type RFLP ont été séquencés. L'identité taxonomique de ces types RFLP a ensuite été confirmée par séquençage de l'ITS. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17: Affiliation taxonomique des 23 types RFLP identifiés (C : rhizosphère de colza ; O : rhizosphère d'orge)

En noir : types RFLP appartenant aux Ascomycètes, en Bleu : types RFLP appartenant aux Basidiomycètes

Type RFLP	Genre affilié	Séquence la plus proche	Longueur (pb)	% identité	Rhizosphère
R1	*Trichoderma*	*Trichoderma velutinum*	576	98	C/O
R2	*Thanatephorus*	*Thanatephorus cucumeris*	562	99	C
R3	*Bionectria*	*Bionectria ochroleuca*	503	100	C
R4	*Fusarium*	*Fusarium redolens*	488	100	O
R5	*Fusarium*	*Fusarium oxysporum*	487	98	C/O
R6	*Trichoderma*	*Trichoderma* sp. AH-Group-5	564	100	O
R7	*Trichoderma*	*Trichoderma* sp. A11	519	100	C/O
R8	*Nectria*	*Nectria gliocladioides*	518	99	C
R9	*Fusarium*	*Fusarium* sp. Dzf2	514	99	C/O
R10	*Fusarium*	*Fusarium sp. 427*	501	99	O
R11	*Trichoderma*	*Trichoderma viride*	509	99	C
R12	*Fusarium*	*Fusarium oxysporum*	505	98	C
R13	*Paecilomyces*	*Paecilomyces lilacinus*	474	99	O
R14	*Fusarium*	*Fusarium sp.*	509	99	C
R15	*Fusarium*	*Fusarium* sp.	509	99	C
R16	*Penicillium*	*Penicillium hordei*	521	99	C/O
R17	*Fusarium*	*Fusarium* sp.	514	99	O
R18	*Trichoderma*	*Trichoderma sp.*	526	99	O
R19	*Aspergillus*	*Aspergillus terreus*	477	99	O
R20	*Bionectria*	*Bionectria ochroleuca*	498	100	C
R21	*Fusarium*	*Fusarium sp.* WF150	489	100	C
R22	*Thielavia*	Uncultured *Thielavia* clone	510	99	C
R23	*Trichoderma*	*Trichoderma gamsii*	526	100	C

La majorité des types RFLP identifiés appartiennent aux Ascomycètes. En effet, sur les 23 types RFLP, un seul appartient aux Basidiomycètes et est affilié au genre *Tanatephorus*. Les Ascomycètes sont connus pour être largement répandus dans différents environnements tels que les milieux aquatiques (Rankovic, 2004) ou les sols, dans lesquels ces champignons sont considérés comme prépondérants (Viebahn *et al*., 2005), notamment dans le compartiment rhizosphérique (Vujanovic *et al*., 2007). De plus, ces champignons sont également connus pour se développer facilement sur milieu artificiel gélosé comparativement aux Basidiomycètes (Arnolds, 1995). Ceci peut donc expliquer également la forte représentativité des Ascomycètes que nous constatons parmi les isolats.

Concernant les Ascomycètes, la plupart des types RFLP sont affiliées à l'Ordre des Hypocreales, Familles des *Hypocreaceae* et des *Nectriaceae* aux genres *Trichoderma*, *Fusarium* et *Nectria* (anamorphe, *Gliocladium roseum*). Deux types RFLP sont affiliés à l'ordre des Eurotiales et aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Enfin, les types RFLP R13 et R22 sont affiliés à l'ordre des Sordariales et aux genres *Paecilomyces* et *Thielavia*. L'unique type RFLP appartenant aux Basidiomycètes est affilié à l'ordre des Cantharellales, famille des Ceratobasidiaceae et au genre *Thanatephorus* (type RFLP R2). La plupart de ces genres se répartissent indifféremment sous couvert de colza et d'orge. Même si les souches affiliées aux genres *Paecilomyces* et *Aspergillus* et les souches affiliées aux genres *Nectria*, *Tanatephorus* et *Thielavia* n'ont été identifiées respectivement que sous couvert d'orge et de colza, nous ne pouvons conclure quant à structuration génétique de la communauté fongique fonctionnelle sous ces deux couverts et/ou au cours de la phénologie des deux plantes. En effet, de par le faible nombre de souches isolées par temps de prélèvement et par couvert, nous n'avons pu calculer les fréquences relatives de chaque type RFLP.

La plupart des genres identifiés sont communs dans les sols agricoles (Domsch and Gams, 1970 ; Marcial Gomez *et al*., 2003 ; Deacon *et al*., 2006, Viebahn *et al*. 2005 ; Zhang *et al*., 2005). Certains des ces genres, tel que le genre *Fusarium*, possèdent des espèces susceptibles de se comporter comme des agents phytopathogènes vis-à-vis des plantes (Al-Abdalall, 2010). Lanoue *et al*. (2010) ont récemment mis en évidence que la colonisation des racines d'orge par *Fusarium graminearum* altérait la qualité des rhizodépôts, avec la synthèse de métabolites secondaires biocides. A l'inverse, d'autres genres identifiés comme les genres *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Paecilomyces* contiennent des espèces dont certaines souches sont utilisées comme agents de biocontrôle vis-à-vis de différents bio-agresseurs des plantes

(Sing *et al*., 2009 ; Vargas Gil *et al*., 2009). Enfin, la plupart de ces genres possèdent des souches susceptibles d'être impliquées dans la décomposition des matières organiques, carbonées et azotées (Chen et Ferris, 1999 ; Deacon *et al*., 2006 ; John et Cairney, 2005 ; Ludley et Robinson, 2007 ; Levasseur *et al*., 2010). Concernant S, Baum et Hrynkiewicz (2006) ont identifié, dans la rhizosphère de *Salix spp*, des souches affiliées aux genres *Penicillium* et *Paecilomyces* susceptibles de jouer un rôle dans la minéralisation du S organique. Des souches affiliées aux genres *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Gliocladium* possédant l'activité ARS ont également été caractérisées sous couvert de colza sur le dispositif expérimental Micagro (Slezack-Deschaumes, communication personnelle). En outre, l'activité ARS a été caractérisée *in vitro* chez différents champignons filamenteux dont *Aspergillus oryzae* (Burns et Wynn, 1977) et *Aspergillus nidulans* (Hussey et Spencer, 1967).

Ainsi, nos résultats suggèrent que les différents genres fongiques que nous avons caractérisés, pourraient jouer un rôle dans la minéralisation des esters de SO_4^{2-} *via* une activité ARS, dans les rhizosphères de colza et d'orge.

2.3.2. Confirmation de l'activité ARS

L'ester de SO_4^{2-} que nous avons incorporé dans le milieu Czapek-X-Sulf, afin de détecter et d'isoler les souches fongiques possédant une activité ARS, est différent de celui utilisé pour mesurer l'activité ARS potentielle sur des échantillons de sol (selon le protocole de Tabatabai et Bremner, 1970). Ce dernier ester de SO_4^{2-}, le PNS, est par ailleurs le substrat modèle pour définir qu'une enzyme présente une activité ARS (Hanson *et al*., 2004). Nous avons donc décidé de confirmer que les souches isolées étaient capables d'hydrolyser le PNS et possédaient bien une activité ARS.

Des souches de chaque type RFLP identifié ont été mises en culture sur un milieu minéral Czapek liquide contenant comme seule source de S, le PNS. Les activités ARS ont été mesurées 3 jours après la mise en culture, en adaptant le protocole de Tabatabai et Bremner (1970), utilisé pour le dosage de l'activité ARS du sol.

Toutes les souches, quels que soient d'une part, le genre auquel elles sont affiliées et d'autre part, leur origine (rhizosphère de colza ou d'orge), présentent une activité ARS après 3 jours de croissance (Tableau 18).

Tableau 18: Activité ARS de souches fongiques appartenant aux 23 types RFLP identifiés dans les rhizosphères de colza et d'orge

Type RFLP	Genre affilié	Rhizosphère	Activité ARS
R1	*Trichoderma*	C/O	+
R2	*Thanatephorus*	C	+
R3	*Bionectria*	C	+
R4	*Fusarium*	O	+
R5	*Fusarium*	C/O	+
R6	*Trichoderma*	O	+
R7	*Trichoderma*	C/O	+
R8	*Nectria*	C	+
R9	*Fusarium*	C/O	+
R10	*Fusarium*	O	+
R11	*Trichoderma*	C	+
R12	*Fusarium*	C	+
R13	*Paecilomyces*	O	+
R14	*Fusarium*	C	+
R15	*Fusarium*	C	+
R16	*Penicillium*	C/O	+
R17	*Fusarium*	O	+
R18	*Trichoderma*	O	+
R19	*Aspergillus*	O	+
R20	*Bionectria*	C	+
R21	*Fusarium*	C	+
R22	*Thielavia*	C	+
R23	*Trichoderma*	C	+

Ces résultats confirment donc que les souches fongiques, isolées sur le milieu Czapek modifié et capables d'hydrolyser le X-Sulf, sont des souches présentant bien une activité ARS. Ces résultats permettent, en conséquence, de valider le milieu gélosé mis au point pour

l’isolement et la caractérisation à partir d’échantillons de sol, de la microflore fongique cultivable impliquée dans la minéralisation de S organique.

En conclusion, nous disposons donc d’un milieu de culture différentiel qui permet d’estimer la taille de la communauté fongique cultivable impliquée dans la minéralisation du S organique des sols *via* une activité ARS mais aussi d’isoler et de caractériser d’un point de vue taxonomique et fonctionnel des souches fongiques impliquées dans ces processus. Nous avons montré que ce sont principalement les Ascomycètes qui interviennent dans la minéralisation des esters de sulfate *via* une activité ARS et que la taille de ces communautés fonctionnelles explique partiellement le niveau d’activité ARS potentielle du sol. La taille des communautés fonctionnelles est supérieure sous couvert de colza comparativement à l’orge, suggérant une influence de la plante sur ces communautés. Cette taille reste relativement stable au cours de la phénologie des plantes, suggérant par contre une influence limitée de la rhizodéposition sur la densité de ces communautés. Notre travail ne nous permet pas de conclure quant à l’influence des deux couverts végétaux sur la structure génétique de ces communautés fonctionnelles.

Chapitre 2. Etude de l'induction de l'activité arylsulfatase en réponse à la disponibilité en soufre du milieu chez différentes souches de champignons

Chapitre 2 : Etude de l'induction de l'activité arylsulfatase en réponse à la disponibilité en soufre du milieu chez différentes souches de champignons

1. Introduction

Le soufre (S) est un élément essentiel à la croissance des organismes vivants puisqu'il intervient dans la synthèse d'acides aminés constitutifs des protéines *i.e.* la cystéine et la méthionine. De plus, S est un constituant de biomolécules qui jouent un rôle dans les processus d'homéostasie cellulaire telles que les réactions d'oxydoréduction, de détoxification des métaux lourds, de synthèses de métabolites secondaires (Droux, 2004). Enfin, S intervient dans les processus de méthylation de l'ADN, en tant que constituant de la S-adénosylméthionine (Marzluf, 1994). De par le rôle central de S dans le métabolisme cellulaire, les organismes vivants ont donc développé des mécanismes de régulation complexes des voies d'absorption et d'assimilation de cet élément.

Chez la plupart des microorganismes fongiques, S est principalement absorbé sous forme de sulfates (SO_4^{2-}), qui constituent ainsi une source de S préférentielle (Mansouri-Bauly *et al*., 2006). Les SO_4^{2-}, absorbés par l'intermédiaire de perméases, sont alors réduits successivement en sulfites puis en sulfides et enfin assimilés sous forme de cystéine (Marzluf, 1994). En plus des SO_4^{2-}, les acides aminés soufrés et notamment la méthionine, peuvent constituer des sources préférentielles de S pour certains champignons comme *Aspergillus nidulans* (Natorff *et al*., 2003) ou *Penicillium chrysogenum* (van de Kamp *et al*., 1999, 2000). En l'absence de ces formes préférentielles de S ou dans des conditions limitantes en ces molécules, des formes alternatives de S peuvent être utilisées par les champignons pour assurer leur croissance. Ainsi, *Neurospora crassa* est susceptible d'utiliser différentes sources secondaires de S comme la choline- SO_4^{2-}, le glucose-6-SO_4^{2-}, des protéines ou encore des aryl-SO_4^{2-} (Marzluf, 1994). Les mécanismes régulant le métabolisme S chez ces microorganismes, selon la nature et la disponibilité en S de leur milieu, ont été largement décrits chez *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997) et chez des levures comme *Saccharomyces cerevisiae*. L'utilisation des formes alternatives de S requiert notamment la synthèse *de novo* d'un ensemble d'enzymes. Il s'agit d'une part, d'enzymes impliquées dans le transport de ces molécules telles que des perméases et d'autre part, d'enzymes catalytiques impliquées dans l'hydrolyse de ces molécules telles que des protéases, des choline-sulfatases et des arylsulfatases (ARS). La synthèse de ces enzymes est sous le

contrôle de gènes *scon* et *cys* qui régulent respectivement, négativement et positivement l'expression des gènes codant ces enzymes (Paietta *et al*., 1987 ; Marzluf, 1994 ; Kumar et Paietta, 1995). Concernant plus particulièrement les ARS, les travaux de Paietta (1989) chez *Neurospora crassa* ont décrit les conditions d'induction de cette enzyme. Chez ce champignon, l'activité ARS, détectée dans le mycélium, les conidies et le milieu de culture, est compartimentée en fractions extracellulaire, intracellulaire et membranaire (Scott et Metzenberg, 1970). La fraction intracellulaire est régulée positivement au niveau transcriptionnel, en conditions de croissance limitantes en S- SO_4^{2-} (100 μM) ou en présence de tyrosine-O- SO_4^{2-}, un ester de S aromatique. A l'inverse, la synthèse de l'ARS intracellulaire est fortement réprimée en conditions de croissance non limitantes en S- SO_4^{2-} (2 mM) ou en présence de méthionine.

Dans les sols et en particulier dans le compartiment rhizosphérique, S sous forme SO_4^{2-} est considéré comme un élément limitant, ceci pouvant conduire à une compétition forte entre la plante et les microorganismes pour l'acquisition de cet élément sous sa forme minérale (Kertesz *et al*., 2007). Cependant, S est très largement présent dans les sols sous des formes organiques (Tabatabai, 1984). Parmi ces formes, les esters de SO_4^{2-} représentent la fraction majoritaire et considérée comme parmi les plus labiles (McLaren *et al*., 1985). Ces formes organiques pourraient donc constituer une source importante de S pour les microorganismes du sol. Les travaux récents de Mirleau *et al*. (2005) sur la survie de l'espèce bactérienne *Pseudomonas putida* dans la rhizosphère de la tomate confortent d'ailleurs cette hypothèse. L'utilisation des esters de SO_4^{2-} comme source alternative de S par les microorganismes du sol requiert préalablement leur hydrolyse par des ARS. Mirleau *et al*. (2005) suggèrent que des ARS extracellulaires d'origine fongique contribueraient à l'hydrolyse de polymères complexes de S et libèreraient des formes simples d'esters de SO_4^{2-}, susceptibles d'être absorbés par les cellules microbiennes bactériennes ou fongiques et hydrolysés par des ARS intracellulaires. Cependant, ces fonctions restent incertaines dans la mesure où peu d'informations sont disponibles concernant les conditions d'induction (en fonction de la quantité et de la forme de S dans le milieu) de l'activité ARS chez des champignons isolés du sol. Par ailleurs, si certains travaux suggèrent que l'activité ARS est induite en conditions limitantes en SO_4^{2-} (Castellano et Dick, 1991), d'autres travaux mettent en évidence que cette activité pourrait être dépendante de la concentration en esters de SO_4^{2-} dans les sols (Prietzel, 2001).

Nos objectifs ont donc été de préciser, pour des souches affiliées aux genres identifiés précédemment (Chapitre 1), les conditions d'induction de l'activité ARS. Pour cela, les souches ont été mises en culture en conditions axéniques, soit dans des milieux limitants ou non en S minéral, soit en présence d'un ester de SO_4^{2-}. Nous avons déterminé *i)* la cinétique de croissance de ces microorganismes en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu, *ii)* la compartimentation cellulaire de l'ARS et *iii)* le profil d'activité de chacune des fractions identifiées en fonction de la nature de S dans le milieu.

2. Résultats et Discussion

2.1. Cinétiques de croissance de différentes souches fongiques en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu de culture

Nous avons étudié la croissance de 12 souches sur des milieux de culture Czapek solides contenant des concentrations en S minéral (sous forme SO_4^{2-}), allant de 0 à 10 mM. Ces souches sont affiliées aux principaux genres identifiés précédemment (Chapitre 1) à savoir les genres (*Bio*)*Nectria* (type RFLP R3), *Fusarium* (types RFLP R4, R10, R14, R15, R17), *Trichoderma* (type RFLP R6, R7, R18, R23), *Aspergillus* (type RFLP R19) et *Paecilomyces* (type RFLP R13). Pour les genres *Fusarium* et *Trichoderma*, 4 à 5 souches correspondant chacune à un type RFLP ont été utilisées. Ces souches ont été choisies en fonction du couvert sous lequel elles ont été isolées à savoir : *i)* sous couvert de colza, pour les souches R23 affiliée à *Trichoderma* et R14, R15 affiliées à *Fusarium*, *ii)* sous couvert d'orge, pour les souches R6, R18 affiliées à *Trichoderma* et R4, R10 affiliées à *Fusarium* et *iii)* sous les deux couverts, pour la souche R7 affiliée à *Trichoderma*. Les courbes de croissance obtenues ont ensuite été modélisées selon un modèle sigmoïdal (modèle de Gompertz, Valero *et al*., 2008) :

$$D_t = D_{max} * \exp(-\exp((K * 2.7182 / D_{max}) * (lag_{time} - Temps) + 1))$$

Nous avons ainsi pu définir différents paramètres de croissance : le temps de latence (Lag_{time}), le taux de croissance (K) et le diamètre maximal de croissance (Dmax).

A partir des données brutes de croissance radiale mycélienne et avant modélisation des courbes de croissance obtenues, nous avons pu identifier 3 types de comportement en réponse à la disponibilité en SO_4^{2-} dans le milieu de culture (Figure 23). Pour certaines souches tel que

le type RFLP R19 affilié à *Aspergillus*, quelle que soit la concentration en SO_4^{2-} du milieu, nous observons une première phase de latence (Figure 23, B).

Nous observons ensuite des réponses contrastées, selon les types RFLP, concernant la croissance radiale, en réponse à la concentration en SO_4^{2-} du milieu. Ainsi, la souche R18 affiliée à *Trichoderma* présente une croissance similaire, quelle que soit la concentration en SO_4^{2-} du milieu. A l'inverse, pour certaines souches telle que la souche R3 affiliée à *Bionectria* et R19 affiliée à *Aspergillus*, nous observons que la croissance augmente avec la présence de SO_4^{2-}. De plus, nous observons que la concentration en SO_4^{2-} du milieu, qui permet la croissance la plus importante, varie selon les types RFLP. A titre d'exemple, nous avons mis en évidence que la croissance maximale, pour *Bionectria* R3, est atteinte à une concentration en SO_4^{2-} dans le milieu de culture de 1,25mM (Figure 23, A) alors que pour *Aspergillus* R19, la croissance maximale est obtenue à une concentration en SO_4^{2-} de 5mM (Figure 23, B).

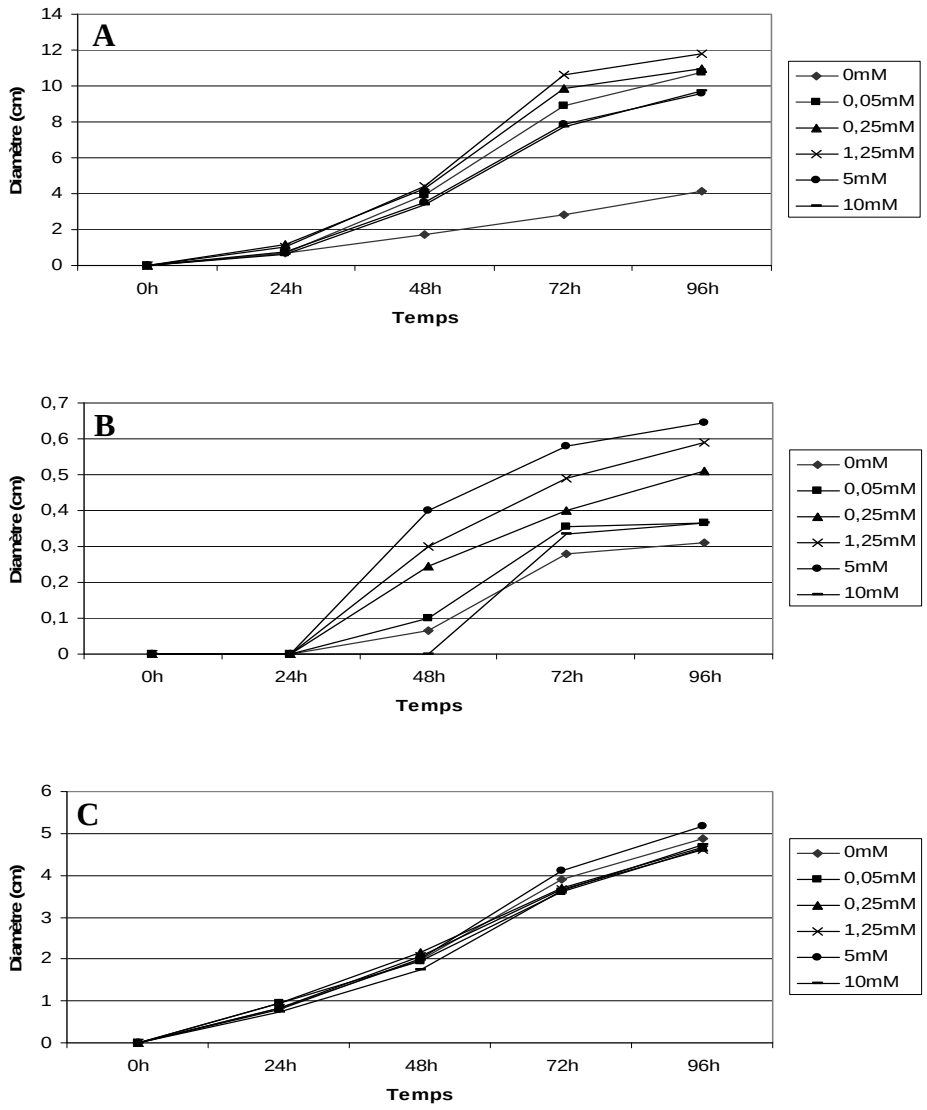


Figure 24 : Cinétique de croissance radiale des isolats affiliés aux genres : *Bionectria* R3 (A), *Aspergillus* R19 (B) et *Trichoderma* R18 (C), en présence de différentes concentrations en sulfates (0 à 10 mM)

Les données brutes de croissance radiale ont été modélisées en ajustant le modèle de Gompertz. La modélisation a permis de définir les paramètres de croissance cités précédemment : le temps de latence (Lag_{time}), le taux de croissance (K) et le diamètre maximal de croissance (Dmax). Ces valeurs, pour l'ensemble des souches, sont présentées aux Figures 24, 25 et 26.

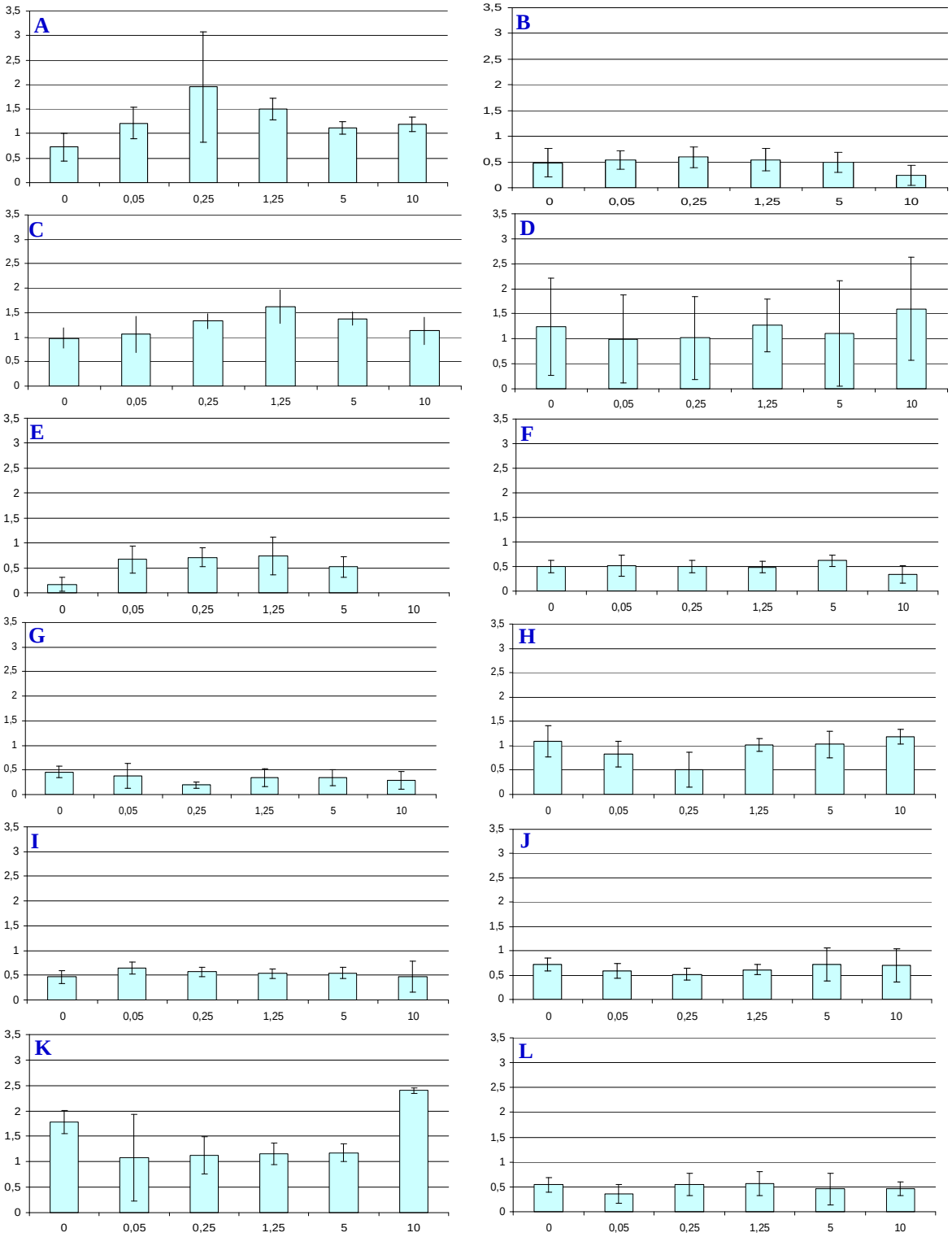


Figure 25 : Récapitulatif des temps de latence (Lag_{time}) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM). **A** : *Bionectria* R3 ; **B** : *Fusarium* R4 ; **C** : *Trichoderma* R6 ; **D** : *Trichoderma* R7 ; **E** : *Fusarium* R10 ; **F** : *Paecilomyces* R13 ; **G** : *Fusarium* R14 ; **H** : *Fusarium* R15 ; **I** : *Fusarium* R17 ; **J** : *Trichoderma* R18 ; **K** : *Aspergillus* R19 ; **L** : *Trichoderma* R23
Echelle des ordonnées : Temps de latence en jours

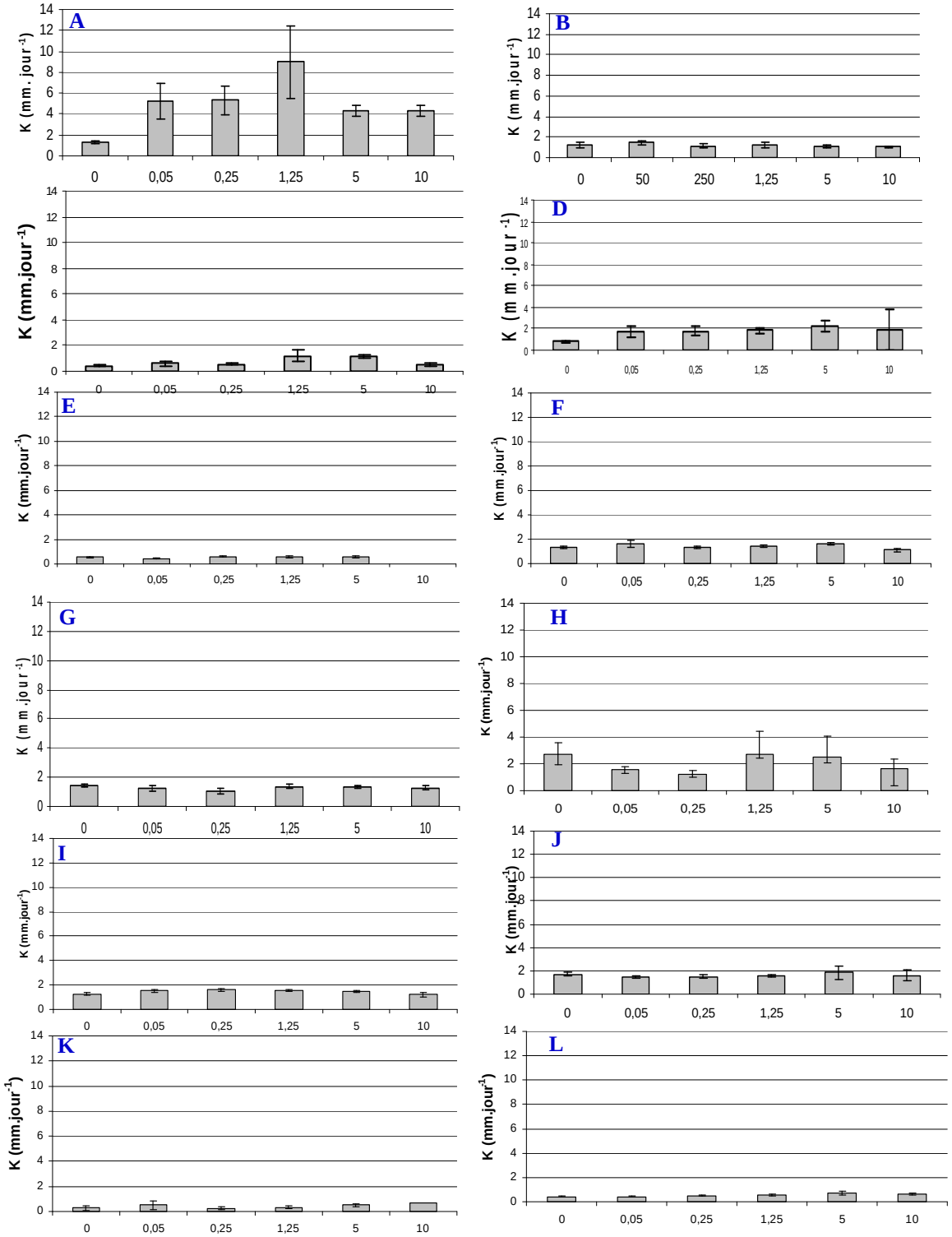


Figure 26 : Récapitulatif des taux de croissance (K) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM). **A** : *Bionectria* R3 ; **B** : *Fusarium* R4 ; **C** : *Trichoderma* R6 ; **D** : *Trichoderma* R7 ; **E** : *Fusarium* R10 ; **F** : *Paecilomyces* R13 ; **G** : *Fusarium* R14 ; **H** : *Fusarium* R15 ; **I** : *Fusarium* R17 ; **J** : *Trichoderma* R18 ; **K** : *Aspergillus* R19 ; **L** : *Trichoderma* R23

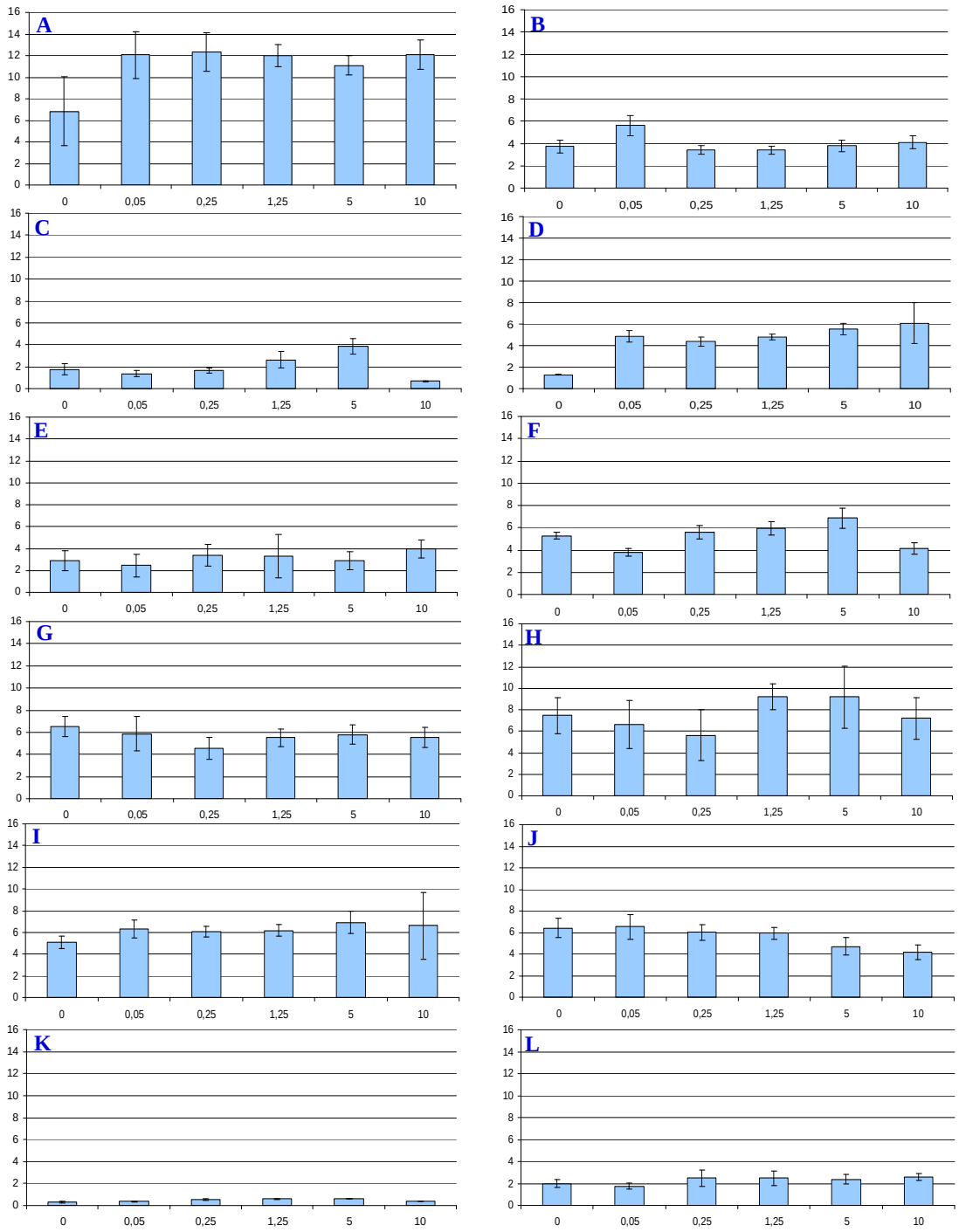


Figure 27 : Récapitulatif des diamètres maximaux (Dmax) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM). **A** : *Bionectria* R3 ; **B** : *Fusarium* R4 ; **C** : *Trichoderma* R6 ; **D** : *Trichoderma* R7 ; **E** : *Fusarium* R10 ; **F** : *Paecilomyces* R13 ; **G** : *Fusarium* R14 ; **H** : *Fusarium* R15 ; **I** : *Fusarium* R17 ; **J** : *Trichoderma* R18 ; **K** : *Aspergillus* R19 ; **L** : *Trichoderma* R23 Echelle des ordonnées : Dmax en cm

Après modélisation et pour l'ensemble des souches, nous observons une première phase de latence (Lag_{time}), quelle que soit la concentration en SO_4^{2-} dans le milieu de culture. Cette phase de latence varie de moins de 12h, chez *Fusarium* R4 à près de 48h chez *Aspergillus* R19 (Figure 24). Nous remarquons que la durée de la phase de latence varie pour les souches affiliées à un même genre mais appartenant à différents types RFLP (cas des souches R18 et R23 affiliées au genre *Trichoderma*). De plus, nous mettons en évidence que l'apport de SO_4^{2-} comparativement au témoin, augmente la durée de la phase de latence pour *Bionectria* R3, *Trichoderma* R6 et *Fusarium* R10. La durée de la phase de latence semble d'autant plus importante que la concentration en SO_4^{2-} dans le milieu de culture augmente, jusqu'à une certaine concentration. Ces phases de latence pourraient traduire des modifications morphologiques et/ou physiologiques des souches fongiques en réponse aux conditions de culture plus ou moins limitantes en S. De telles modifications ont été observées en réponse à des limitations en C et N (White *et al.*, 2002). Ces auteurs ont mis en évidence une fragmentation et une vacuolisation des hyphes ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'enzymes lytiques, permettant un recyclage du C et N endogène et un maintien *in fine* de la croissance, en dépit des conditions limitantes en éléments nutritifs. Concernant S, ces phases de latence pourraient permettre la synthèse de l'ensemble des protéines impliquées dans l'absorption des SO_4^{2-} mais aussi des enzymes lytiques impliquées dans la dégradation de composés organiques S dont, l'ARS mais aussi de choline sulfatases et de protéases, dans la mesure ou la choline-S et les acides aminés soufrés sont considérés comme des formes de S organiques assimilables par les champignons (Marzluf, 1994).

Concernant le taux de croissance (K, Figure 25) et le diamètre maximal de croissance (Dmax, Figure 26), nous observons deux grands types de réponse suite à l'apport de SO_4^{2-}.

- Pour les souches *Bionectria* R3, *Trichoderma* R6 et R7 et *Fusarium* R17, l'apport de SO_4^{2-} conduit à une augmentation concomitante de K et Dmax. Pour *Bionectria* R3, *Trichoderma* R7 et *Fusarium* R17, cet effet est observé dès l'apport de 50 µM de SO_4^{2-} dans le milieu de culture alors que pour *Trichoderma* R6, l'effet n'est visible qu'à partir d'une concentration de 1,25 mM de SO_4^{2-}. Il faut remarquer cependant qu'aucun effet « dose » de SO_4^{2-} n'est clairement visible. Ainsi, le S sous forme minérale apparaît comme un substrat préférentiel pour la croissance de ces microorganismes. Nos résultats suggèrent également que les exigences en S minéral varient selon les microorganismes considérés.

- Pour les autres souches de cette étude, aucun effet de l'apport de SO_4^{2-} n'est observé que ce soit sur K et/ou Dmax. Ces résultats suggèrent en conséquence que le S sous forme minéral ne constitue pas une source préférentielle pour la croissance de ces microorganismes. Des formes organiques de S tels que les acides aminés, méthionine et cystéine pourraient être préférées (Marzluf, 1997). Il faut cependant remarquer que la régulation de l'absorption des SO_4^{2-} est complexe. En effet, des travaux récents ont montré que certains paramètres environnementaux telle que la lumière semblent moduler l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des gènes de la voie de synthèse des SO_4^{2-} chez certains champignons (Schmoll *et al*., 2010).

Ces résultats mettent en évidence des différences de réponse à la disponibilité en S minéral entre souches affiliées à un même genre fongique et appartenant à différents type RFLP ainsi qu'entre souches appartenant à des genres différents. De telles différences ont déjà été observées concernant N, entre différents isolats d'une même espèce fongique et entre espèces (Safavi *et al*., 2007).

2.2. Induction de l'activité arylsulfatase en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu de culture

En parallèle aux cinétiques de croissance, nous avons suivi l'évolution de l'activité arylsulfatase (ARS). Les ARS fongiques sont soit des protéines solubles cytosoliques, soit des protéines solubles extracellulaires. De plus, certaines ARS, notamment chez *Neurospora crassa*, ont été identifiées comme étant associées aux membranes cellulaires. Afin d'une part, de pouvoir accéder à ces différentes fractions « potentielles » de l'activité ARS et d'autre part, de préciser la réponse de ces fractions à la disponibilité en S minéral du milieu, les souches fongiques ont été mises en culture dans un milieu de culture liquide contenant des concentrations croissantes en SO_4^{2-}.

Nous avons donc tout d'abord précisé la compartimentation cellulaire de l'activité ARS pour l'ensemble des souches étudiées (la souche R14 a été perdue ; cette approche ne portera que sur les 11 autres types RFLP). Après 48h de croissance dans le milieu Czapek liquide sans SO_4^{2-} (soit en conditions de carence), le mycélium a été recueilli par filtration sous vide. Le surnageant de culture constitue la fraction extracellulaire. Le mycélium a été broyé en présence d'azote liquide et repris dans le tampon Tris-HCl, pH 7. Après centrifugation, le

surnageant et le culot ont été recueillis pour constituer respectivement, la fraction intracellulaire et la fraction membranaire. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Compartimentation cellulaire de l'activité ARS après croissance en conditions limitantes en S *(où E : activité ARS extracellulaire ; I : activité ARS intracellulaire ; M : activité ARS membranaire)*

R3 : souche affiliée à *Bionectria* ; R4, R10, R15, R17 : souches affiliées à *Fusarium* ; R6, R7, R18, R23 : souches affiliées à *Trichoderma* ; R13 : souche affiliée à *Paecilomyces* ; R19 : souche affiliée à *Aspergillus*

	R3			**R4**			**R6**			**R7**			**R10**			**R13**			**R15**			**R17**			**R18**			**R19**			**R23**		
ARS	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M
sans SO_4^{2-}	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+

Nous observons que les souches fongiques présentent une compartimentation cellulaire de l'activité ARS plus ou moins complexe, dans les conditions de culture testées. Ainsi, pour 4 souches affiliées respectivement aux genres *Bionectria* R3, *Trichoderma* R7, *Paecilomyces* R13 et *Fusarium* R17, une activité ARS est détectée dans les 3 fractions, extracellulaire, intracellulaire et membranaire. Pour les autres souches, une activité ARS est détectée dans 2 des 3 fractions, soit dans les fractions intracellulaire et membranaire (*Fusarium* R4, *Trichoderma* R6, *Fusarium* R10, *Trichoderma* R18, *Aspergillus* R19 et *Trichoderma* R23), soit dans les fractions extracellulaire et intracellulaire (*Fusarium* R15). D'un point de vue quantitatif, nous remarquons, toutes fractions enzymatiques confondues, que le niveau d'activité ARS diffère fortement d'un type RFLP à un autre (Figure 27). En particulier, les souches *Bionectria* R3, *Fusarium* R4 et R17 et *Paecilomyces* R13 se distinguent avec des niveaux d'activités supérieurs à 40 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour l'un des compartiments cellulaires. Dans le cas des activités ARS intracellulaires, ces activités varient de 1,25 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour la souche *Fusarium* R10 à environ 111 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour une autre souche affiliée au genre *Fusarium*, R17. Pour les activités ARS membranaires, elles sont comprises entre 0,19 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour *Fusarium* R10 à 95 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour *Paecilomyces* R13. Enfin, pour les activités ARS extracellulaires, elles varient de 1,17 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour *Bionectria* R3 à 10,3 µg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1} pour *Trichoderma* R7. Globalement, les activités ARS extracellulaires sont significativement inférieures aux activités ARS intracellulaires et membranaires, quel que soit le type RFLP considéré. Les activités ARS des souches fongiques fonctionnelles se répartissent donc majoritairement dans les compartiments cytosoliques et membranaires. Les activités ARS intracellulaires sont significativement supérieures aux activités membranaires pour la majorité des souches de cette étude (*Fusarium* R10, R15 et R17 ; *Trichoderma* R18 et R23 et *Aspergillus* R19) alors que les activités ARS membranaires sont significativement supérieures aux activités intracellulaires dans le cas des souches *Bionectria* R3 et *Fusarium* R4. Enfin, un même niveau d'activité ARS intracellulaire et membranaire est observé pour les 3 dernières souches : *Trichoderma* R6 et R7 et *Paecilomyces* R13.

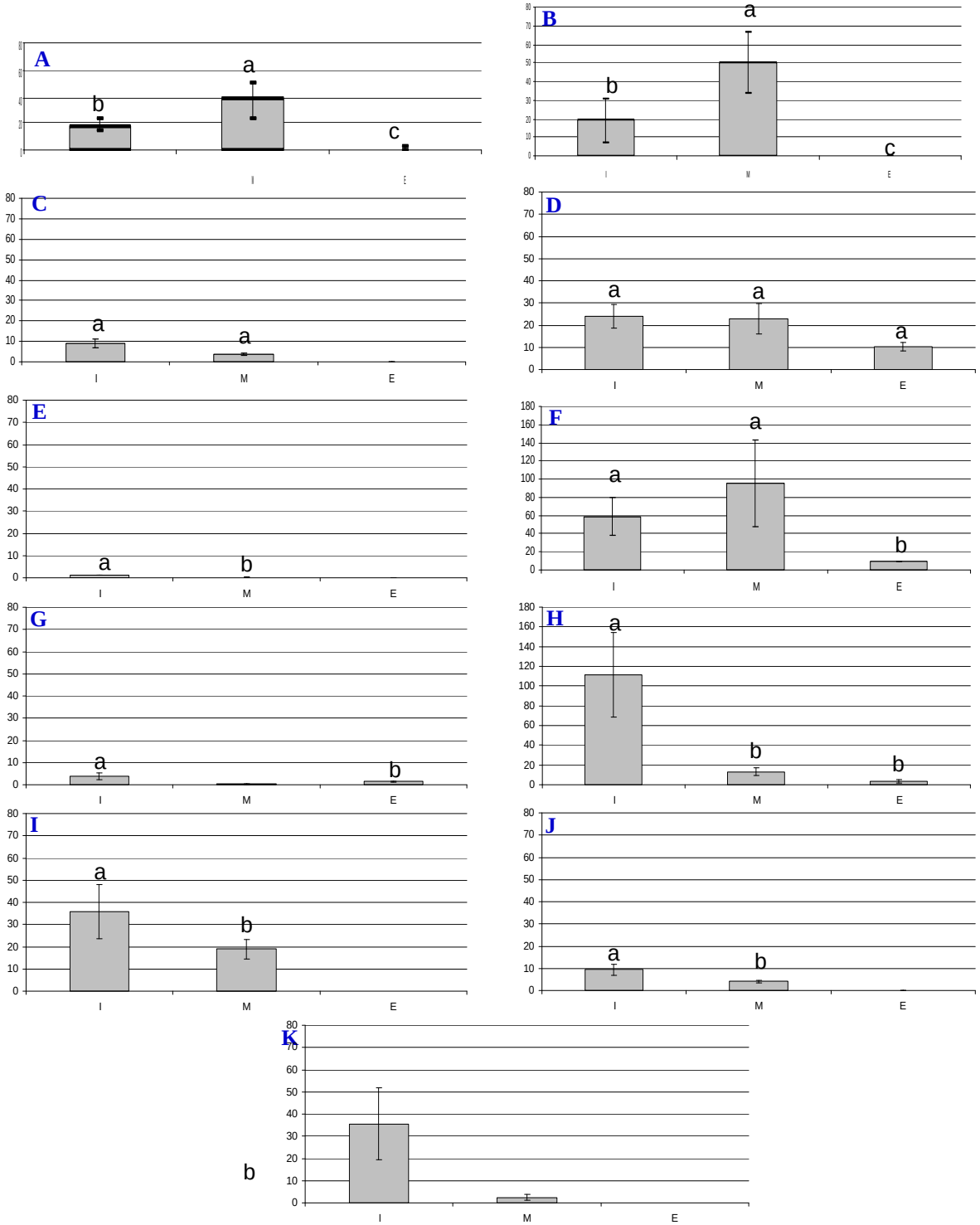


Figure 28 : Profils des activités ARS intracellulaire (I), membranaires (M) et extracellulaires (E), pour les différents types RFLP cultivés en conditions de carences en S
A : *Bionectria* R3 ; **B** : *Fusarium* R4 ; **C** : *Trichoderma* R6 ; **D** : *Trichoderma* R7 ; **E** : *Fusarium* R10 ; **F** : *Paecilomyces* R13 ; **G** : *Fusarium* R15 ; **H** : *Fusarium* R17 ; **I** : *Trichoderma* R18 ; **J** : *Aspergillus* R19 ; **K** : *Trichoderma* R23. Echelle des ordonnées : Activité ARS (µg p-NP 100 mg^{-1} protéines h^{-1})

Nous avons ensuite précisé les conditions d'induction de ces différentes activités ARS en fonction de la disponibilité en S minéral du milieu. Pour cela, les souches ont été mises en culture dans un milieu liquide Czapek contenant des concentrations en SO_4^{2-} allant de 0 à soit, la concentration assurant le taux de croissance (K) (souches pour lesquelles K est modulé par la concentration en SO_4^{2-}, K traduisant des conditions *a priori* non limitantes), soit 5 mM (souches pour lesquelles K n'est pas modulé par la concentration en SO_4^{2-}, 5mM étant considérée comme une concentration non limitantes). Les résultats sont présentés dans les Tableaux 20, 21 et 22.

Tableau 20 : Récapitulatif des activités ARS intracellulaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

R3 : souche affiliée à *Bionectria* ; R4, R10, R15, R17 : souches affiliées à *Fusarium* ; R6, R7, R18, R23 : souches affiliées à *Trichoderma* ; R13 : souche affiliée à *Paecilomyces* ; R19 : souche affiliée à *Aspergillus*

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p<0,05$

Activité ARS intracellulaire (µg p-nitrophénol 100 µg protéines^{-1} h^{-1})											
Concentration SO_4^{2-} (mM)	**R3**	**R4**	**R6**	**R7**	**R10**	**R13**	**R15**	**R17**	**R18**	**R19**	**R23**
0	18,58(a)	19,09(a)	9,04(a)	23,96(a)	1,26(a)	58,76(a)	3,92(a)	111,27(a)	35,77(a)	9,36(a)	35,56(a)
0,01	-	3,82(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	2,14(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	0,14(b)	2,90(b)	2,63(a)	2,94(b)	0,72(a)	26,23(b)	7,07(a)	32,02(b)	2,38(b)	10,19(a)	4,27(b)
0,1	0,41(b)	-	-	-	-	-	2,50(a)	26,62(b)	0,85(c)	-	-
0,25	0,21(b)	-	3,91(a)	5,42(b)	0,22(a)	15,04(b)	2,67(a)	46,54(b)	1,11(b)	0(b)	2,74(b)
0,5	0,12(b)	-	2,54(a)	6,12(b)	0,60(a)	19,65(b)	2,56(a)	-	-	11,78(a)	3,74(b)
1,25	0,22(b)	-	2,75(a)	2,58(b)	0,59(a)	10,05(b)	3,20(a)	-	-	8,63(a)	3,21(b)
2,5	-	-	2,88(a)	2,17(b)	0,10(a)	5,88(c)	-	-	-	12,34(a)	2,96(b)
5	-	-	2,52(a)	3,00(b)	0,17(a)	7,27(bc)	-	-	-	13,90(a)	2,82(b)

Tableau 21 : Récapitulatif des activités ARS membranaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

R3 : souche affiliée à *Bionectria* ; R4, R10, R15, R17 : souches affiliées à *Fusarium* ; R6, R7, R18, R23 : souches affiliées à *Trichoderma* ; R13 : souche affiliée à *Paecilomyces* ; R19 : souche affiliée à *Aspergillus*

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p<0,05$

Activité ARS membranaire (µg p-nitrophénol 100 µg protéines^{-1} h^{-1})											
Concentration SO_4^{2-} (mM)	**R3**	**R4**	**R6**	**R7**	**R10**	**R13**	**R15**	**R17**	**R18**	**R19**	**R23**
0	38,16(a)	50,60(a)	3,80(a)	22,70(a)	0,19(a)	95,31(a)	0,31(a)	13,23(a)	18,86(a)	4,07(a)	2,39(a)
0,01	-	52,91(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	5,78(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	0,73(b)	3,58(b)	0,42(a)	2,27(b)	0,083(a)	66,95(ab)	0,17(a)	11,20(a)	1,25(b)	2,59(a)	2,21(a)
0,1	0,70(b)	-	-	-	-	-	0,09(a)	11,94(a)	0(b)	-	-
0,25	0,43(b)	-	0,09(a)	1,96(b)	0(a)	29,54(bc)	0,21(a)	13,84(a)	0,15(b)	2,68(a)	2,36(a)
0,5	0,29(b)	-	0,12(a)	3,14(b)	0,37(a)	58,78(abc)	0,30(a)	-	-	3,83(a)	2,06(a)
1,25	0,50(b)	-	0,10(a)	0,78(b)	0,19(a)	16,81(c)	0,01(a)	-	-	2,48(a)	1,18(a)
2,5	-	-	0,18(a)	4,50(b)	0,15(a)	58,09(abc)	-	-	-	4,68(a)	4,47(a)
5	-	-	0,25(a)	1,78(b)	0,27(a)	26,82(bc)	-	-	-	4,09(a)	1,60(a)

Tableau 22 : Récapitulatif des activités ARS membranaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

R3 : souche affiliée à *Bionectria* ; R4, R10, R15, R17 : souches affiliées à *Fusarium* ; R6, R7, R18, R23 : souches affiliées à *Trichoderma* ; R13 : souche affiliée à *Paecilomyces* ; R19 : souche affiliée à *Aspergillus*

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $p<0,05$

Activité ARS extracellulaire (µg p-nitrophénol 100 µg protéines^{-1} h^{-1})											
Concentration SO_4^{2-} (mM)	**R3**	**R4**	**R6**	**R7**	**R10**	**R13**	**R15**	**R17**	**R18**	**R19**	**R23**
0	1,17(a)	0(c)	0(c)	10,29(a)	0(c)	9,16(a)	1,39(a)	3,26(a)	0(c)	0(c)	0(c)
0,01	-	0(c)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025	-	0(c)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	0(b)	0(c)	0(c)	0(b)	0(c)	0,20(a)	0(a)	0,57(a)	0(c)	0(c)	0(c)
0,1	0(b)	-	-	-	-	-	0(a)	0,36(a)	0(c)	-	-
0,25	0(b)	-	0(c)	0(b)	0(c)	0,02(a)	0(a)	0,39(a)	0(c)	0(c)	0(c)
0,5	0(b)	-	0(c)	0(b)	0(c)	0,08(a)	0(a)	-	-	0(c)	0(c)
1,25	0(b)	-	0(c)	0(b)	0(c)	0,01(a)	0(a)	-	-	0(c)	0(c)
2,5	-	-	0(c)	0(b)	0(c)	0(a)	-	-	-	0(c)	0(c)
5	-	-	0(c)	0(b)	0(c)	0,07(a)	-	-	-	0(c)	0(c)

Il ressort de notre étude que les activités ARS sont régulées différemment selon les types RFLP, en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu. Nous pouvons ainsi établir 3 types de profils de réponse à la présence de SO_4^{2-} dans le milieu de culture. Pour les souches *Bionectria* R3, *Trichoderma* R7 et R18, les activités ARS, quelle que soit leur compartimentation cellulaire, sont significativement réprimées dès l'apport de SO_4^{2-} à des concentrations supérieures ou égales à 50 μM. Ces activités sont alors détectées à un niveau résiduel (inférieur à 10 μg *p*-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1}). A l'inverse, pour les souches *Trichoderma* R6, *Fusarium* R10 et 15 et *Aspergillus* R19, qui présentent, tous compartiments cellulaires confondus, des niveaux d'activité ARS résiduels (entre 0,19 et 9,36 μg p-NP 100mg protéines^{-1} h^{-1}) en l'absence de SO_4^{2-}, aucun effet de l'apport de S minéral n'est observé. Enfin, concernant les souches *Fusarium* R4 et R17, *Paecilomyces* R13 et *Trichoderma* R23, une régulation différentielle des activités ARS, selon la compartimentation de ces enzymes, est mise en évidence. Ainsi, pour *Fusarium* R4 et *Paecilomyces* R13, nous observons que les activités ARS sont réprimées à des concentrations en SO_4^{2-} différentes, selon que l'on considère les activités intracellulaires ou membranaires. Les activités ARS intracellulaires sont réprimées significativement à la plus faible concentration en SO_4^{2-} du milieu (respectivement 10 μM et 50 μM) alors que les activités membranaires sont réprimées significativement à des concentrations en SO_4^{2-} plus importantes (respectivement 25 μM et 250 μM). Pour *Fusarium* R17 et *Trichoderma* R23, les activités ARS intracellulaires sont réprimées significativement dès la concentration en SO_4^{2-} de 50 μM alors que les activités membranaires sont indépendantes de la disponibilité en S du milieu.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que dans nos conditions expérimentales, les activités ARS des différentes souches possédant cette activité, présentent une compartimentation cellulaire complexe, comme cela a été observé précédemment observé chez *Neurospora crassa* (Scott et Metzenberg, 1970). Ces activités ARS se répartissent en effet dans les compartiments extracellulaires, intracellulaires et membranaires. Cependant, nous montrons que les activités ARS sont majoritairement sous des formes solubles dans le cytosol et sous des formes associées aux membranes cellulaires. Les travaux de Scott et Metzenberg (1970) et de Mitsunaga-Nakatsubo *et al*. (1998) avaient déjà mis en évidence la présence d'ARS associées à la membrane plasmique, respectivement chez *N. crassa* et *Hemicentrotus pulcherrimus*. Cependant ces enzymes étaient non fonctionnelles. Nos résultats suggèrent fortement que les ARS associées aux membranes cellulaires peuvent être

fonctionnelles. De telles observations ont été précédemment mises en évidence par Cregut (2009) chez des souches bactériennes affiliées aux Actinobactéries et impliquées dans la minéralisation du S organique dans les sols.

En outre, nos résultats montrent une régulation complexe de ces activités ARS en réponse à la présence de SO_4^{2-} dans le milieu de culture. Jusqu'alors, les travaux réalisés chez *Aspergillus nidulans* (Apte *et al*., 1974), *Neurospora crassa* (Paietta, 1989) et *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Goodwin *et al*., 2000) avaient montré que les ARS étaient induites en réponse à la limitation en S du milieu, afin de répondre aux besoins en cet élément des cellules fongiques. De plus, Cregut, (2009) a montré, chez différentes actinobactéries, que la régulation des activités ARS en réponse à la disponibilité en S du milieu, était plutôt fonction de la localisation cellulaire de ces enzymes que de l'organisme considéré. Nous montrons ici que la régulation des ARS fongiques semble tout d'abord dépendante du taxon microbien considéré. Nous distinguons en effet deux groupes de microorganismes chez lesquels les activités ARS sont soit, réprimées par la présence de SO_4^{2-}, soit, non modifiées par la présence de S minéral. Nous montrons en outre, pour certains microorganismes chez lesquels les activités ARS sont régulées par le S minéral, une « sensibilité » de réponse différente de ces enzymes à la limitation en S, selon qu'elles sont présentes dans le cytosol sous formes solubles ou associées aux membranes. Ces résultats suggèrent donc l'existence, au sein d'une communauté fongique possédant l'activité ARS, de différents pools enzymatiques intracellulaires et membranaires, susceptibles pour certains, de répondre à la limitation en S du milieu, et ce, selon les taxons présents. Par ailleurs, pour les microorganismes chez lesquels les activités ARS ne sont pas induites par la limitation en S, ces activités pourraient être dépendantes de la présence de substrats de ces enzymes. Scott et Metzenberg (1970) ont en effet montré que l'activité ARS intracellulaire chez *N. crassa* pouvait être induite par la présence d'un substrat de cette enzyme (tyrosine-O-S). Plus récemment, Galletti *et al*. (2008) ont montré que certaines ARS d'*A. flavus* pouvaient être induites par la présence de glucosinolates, métabolites secondaires libérés dans la rhizosphère, par les racines de Brassicacées. Ce pool enzymatique pourrait donc participer soit, à la minéralisation de composés organiques S présents dans les matières organiques solubles du sol, soit au recyclage de composés organiques dans les cellules fongiques dans des conditions de croissance limitantes en S, afin de permettre le maintien de la croissance.

2.3. Relations entre croissance et activités arylsulfatases, selon la disponibilité en S minéral du milieu

Nous avons donc tenté d'établir des relations entre les différents paramètres de croissance et les activités ARS, dans des conditions limitantes en SO_4^{2-}.

Nous avons tout d'abord considéré dans cette analyse les souches fongiques ayant montré des modifications de leurs paramètres de croissance (Lag_{time}, K et Dmax) et des activités ARS en réponse à la disponibilité en S minéral du milieu de culture (souches *Bionectria* R3, *Trichoderma* R6 et R7 et *Fusarium* R17). Aucune relation évidente n'a pu être établie entre ces différents paramètres de croissance et les activités ARS qu'elles soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (données non montrées). Ces résultats mettent en évidence un découplage entre la réponse des microorganismes en terme de maintien de la croissance en conditions plus ou moins limitantes en S et certaines adaptations physiologiques à ces conditions telle que l'induction des activités ARS. Concernant certaines souches fongiques pour lesquelles aucune modification des paramètres de croissance n'a été observée, comme les souches *Fusarium* R4, *Trichoderma* R18 et R23, nous avons cependant montré une diminution significative des activités ARS en réponse à l'apport de S minéral. Enfin, nous avons observé pour les autres souches (tels que *Fusarium* R15 ou *Aspergillus* R19), une absence de réponse et d'un point de vue des paramètres de croissance et des ARS, aux conditions limitantes en S.

L'ensemble de ces résultats suggère que les adaptations physiologiques de certains microorganismes fongiques à la limitation en S minéral, d'un point de vue induction des activités ARS, sont indépendantes ou éventuellement précèdent les réponses morphologiques (modifications des taux de croissance). De telles observations ont été établies chez différentes espèces d'*Aspergillus* en réponse à des conditions de croissance limitantes en C (Pollack *et al*., 2008). L'induction des activités ARS, principalement intracellulaires et membranaires, pourrait être favorable au maintien de la croissance de ces microorganismes, en permettant le recyclage de S endogène. Chez les microorganismes fongiques ne répondant pas aux conditions de croissance limitantes en S minéral, les ARS ne semblent pas participer à satisfaire les besoins en S de ces microorganismes *via* le recyclage de composés organiques endogènes. Elles pourraient alors intervenir plutôt dans la dégradation d'esters de S, s'ils sont

présents dans l'environnement. Des perméases impliquées dans le transport de ces composés ont été identifiés à la membrane plasmique de certains champignons (Marzluf, 1994).

2.4. Activités arylsulfatases et nature du S disponible

Nous avons enfin voulu préciser les profils d'induction des activités ARS en fonction de la présence d'un substrat de cette enzyme. Pour cela, les souches ont été mises en culture sur un milieu liquide Czapeck contenant 250 µM de *p*-NS, une concentration considérée comme limitante (Kertesz *et al*., 2004). Il ressort que la présence d'un substrat de l'ARS modifie le profil d'activité des souches *Fusarium* R4, R10, *Trichoderma* R6, R18, R23 et *Aspergillus* R23 (Tableau 23). En particulier, nous montrons que l'apport du substrat conduit à l'induction de l'activité ARS extracellulaire. Cette activité, comparativement aux fractions intracellulaire et membranaire semble donc régulée par la présence d'un substrat, chez ces souches. Une étude quantitative de l'activité ARS aurait permis, chez les souches exprimant l'activité ARS extracellulaire dans le milieu sans S minéral, de comparer le niveau d'induction de cette activité en fonction de la présence d'un substrat de l'enzyme ou en carence en S.

Tableau 23 : Induction de l'activité ARS dans différents compartiments cellulaires en réponse à la présence d'un ester de S. *En rouge, sont indiquées les modifications de profils d'activité observées.*

R3 : souche affiliée à *Bionectria* ; R4, R10, R15, R17 : souches affiliées à *Fusarium* ; R6, R7, R18, R23 : souches affiliées à *Trichoderma* ; R13 : souche affiliée à *Paecilomyces* ; R19 : souche affiliée à *Aspergillus*

	R3			**R4**			**R6**			**R7**			**R10**			**R13**			**R15**			**R17**			**R18**			**R19**			**R23**		
ARS	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M	E	I	M
sans SO_4^{2-}	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Sans SO_4^{2-} + PNS	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2.5. Identification de séquences ARS putatives

Enfin, dans une dernière partie de cette étude, nous avons engagé un travail de caractérisation des séquences ARS présentes chez les différentes souches fongiques possédant l'activité ARS. Pour cela, différents couples d'amorces dégénérées ont été dessinées, à partir des séquences de gènes ARS de champignons (Ascomycètes et Basidiomycètes) disponibles dans les bases de données. Au total, 8 amorces ont été dessinées, au niveau de séquences consensus identifiées dans les séquences protéiques de ces enzymes. Ces séquences consensus sont situées au niveau du site de fixation du substrat sur l'enzyme (Goodwin *et al.*, 2000, Figure 28).

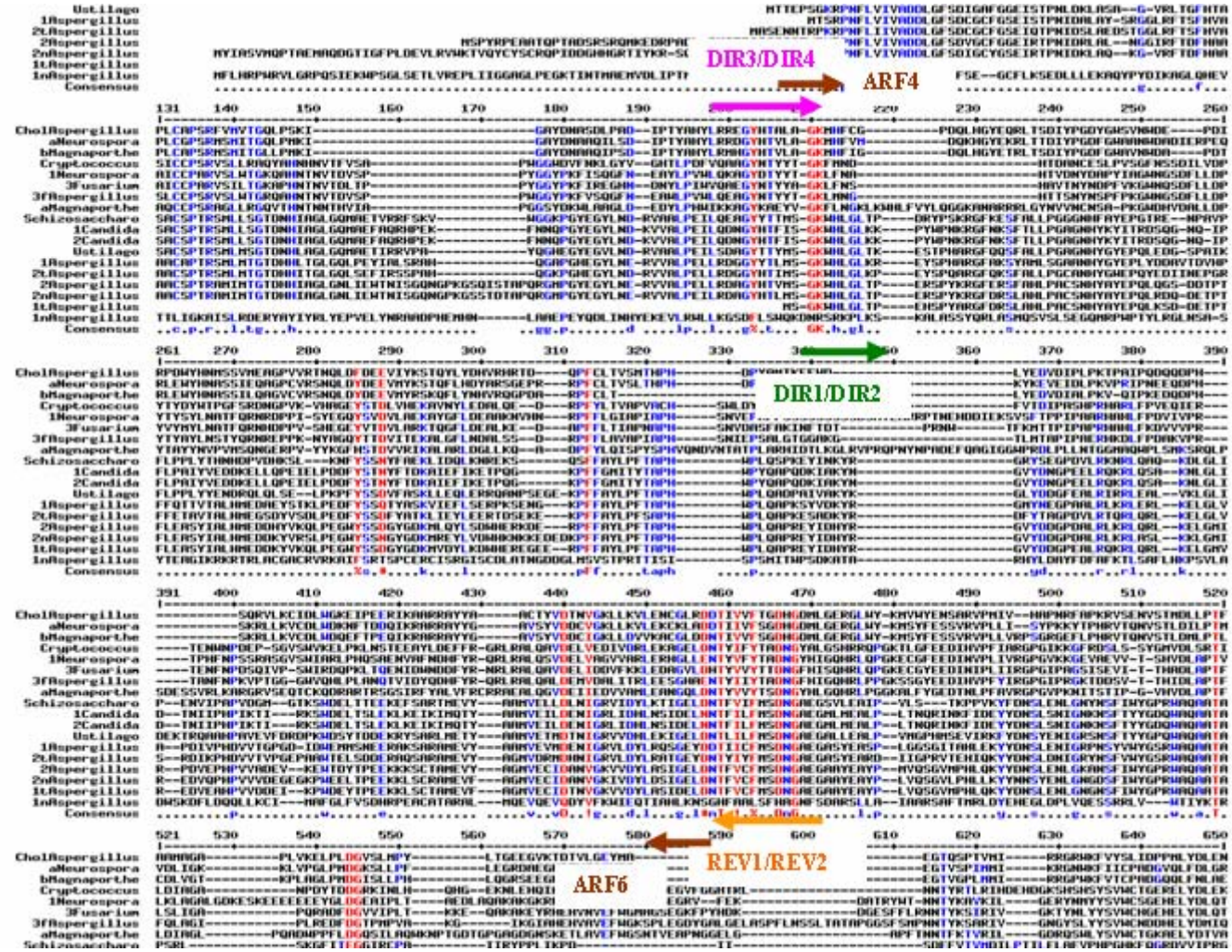


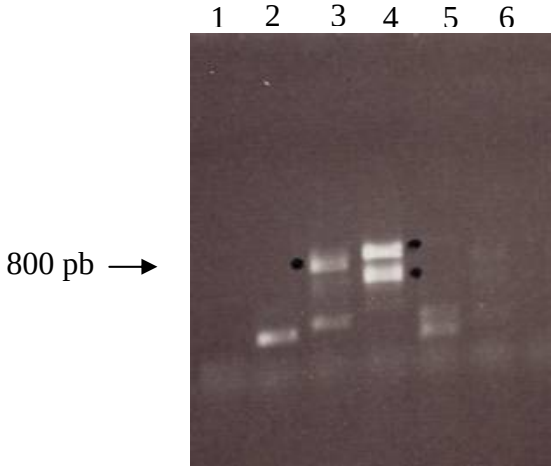
Figure 29 : Alignement à partir de *Multalin*, des séquences ARS de souches fongiques de référence, utilisées pour dessiner les amorces. Les différents couples d'amorces sont positionnés sur ces séquences

La taille attendue des produits d'amplification varie de 680 à 800 paires de bases, selon les couples d'amorces utilisés (Tableau 24).

Tableau 24 : Séquences, températures d'hybridation des différentes amorces dégénérées utilisées en PCR pour identifier des séquences ARS et taille des fragments attendus pour les différentes combinaisons d'amorces

Amorces	Séquences (5'→ 3')	Tm potentiel	sens	Taille des fragments attendus
DIR 1	GGN-AAR-TGG-CAY-YTN-GG	50°C	direct	680 pb
DIR 2	GGN-AAR-TGG-CAY-ATG-GG	50°C	direct	
REV 1	NCC-CCA-RTC-NSW-CAT-GAA	52°C	reverse	
REV 2	CCR-TTR-TCN-GCN-GTR-TA	46°C	reverse	
DIR 3	GGC-TAY-AAY-ACN-TAY-TA	42°C	direct	700 pb
DIR 4	GGC-TAC-AAY-ACN-TAC-TAC-RC	56°C	direct	
ARF 4	AAY-GTN-ACN-GAY-GT	40°C	direct	800 pb
ARF 6	RTG-YTG-NCC-DAT-RTG	44°C	reverse	

Quatre couples d'amorces ont permis d'obtenir une amplification d'un fragment à la taille attendue, pour 4 des 11 souches de cette étude (Tableau 25, Figure 29).



Photographe 11 : Exemple de gel d'électrophorèse obtenu après amplification d'un fragment ARS par PCR à partir d'ADN extrait de souches fongiques, à l'aide des amorces ARF4/ARF6.

1 : Trichoderma R7 *; 2 : Aspergillus* R19 *; 3 : Bionectria* R3 *; 4 : Paecilomyces* R13 *; 5 : Trichoderma* R18 *; 6 : Trichoderma* R23

Tableau 25 : Homologie des séquences ARS, en acides aminés, avec les séquences de référence

Type RFLP	Homologie sur la séquence protéique la plus proche	% d'identité	Couple d'amorces
Paecilomyces R13	*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*	**69**	**ARF4 / ARF6**
	Colletotrichum gloeosporioides f. sp. *malvae*	**64**	
	Neurospora crassa	**57**	
Fusarium R10	*Pseudomonas aeruginosa*	**48**	**DIR 1 / REV 1**
	Aspergillus terreus	**57**	
Fusarium R5	*Aspergillus oryzae*	**47**	**DIR2/REV1**
Fusarium R4	*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*	**66**	**ARF4 / ARF6**
	Sinorhizobium meliloti	**78**	**DIR2/REV2**

Ces résultats préliminaires montrent un polymorphisme des séquences codant des ARS putatives, chez la plupart des souches fongiques pour lesquelles des produits d'amplification à la taille attendue ont été obtenus. En effet, pour 3 des 4 souches (souches R4, R10 et R13), au moins deux séquences ARS ont pu être identifiées pour chaque souche. Il est rapporté dans la littérature que plusieurs copies de gènes codant des ARS peuvent être présentes dans les génomes fongiques, comme par exemple chez *Aspergillus oryzae* (Gary et Colin, 1977). Par ailleurs, Gary et Colin (1977) rapportent que ces gènes peuvent être régulés différentiellement en réponse à la disponibilité en S du milieu.

Les séquences identifiées montrent des homologies avec des gènes codant des ARS chez *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Goodwin *et al*., 2000), *Aspergillus oryzae*, *A. terreus* (Scott et Metzenberg, 1970) et *N. crassa* (Paietta, 1989). Par ailleurs, pour les souches *Fusarium* R4 et R10, des séquences homologues à des gènes codant des ARS bactériennes ont été identifiées. A ce jour, peu d'informations existent sur les homologies de séquences entre les ARS bactériennes et les ARS fongiques. Il est décrit dans la littérature que les ARS fongiques et bactériennes se distinguent notamment suite à des modifications post-traductionnelles, au niveau de la région N-terminal des protéines, avec la formylation d'une sérine pour les

procaryotes et d'une cystéine chez les eucaryotes essentiellement (Hanson *et al*., 2004). Ceci assure la fonctionnalité de l'enzyme. Au niveau des gènes, des alignements de séquences ARS que nous avons réalisés récemment et en ne considérant que des ARS microbiennes, suggèrent l'existence d'au moins deux « groupes ou classes » d'ARS microbiennes. Une première classe serait constituée de séquences bactériennes et fongiques alors que la seconde classe ne contiendrait que des séquences fongiques. Ces analyses *in silico* sont à poursuivre et devraient permettre de redéfinir de nouveaux jeux d'amorces afin d'identifier des séquences ARS pour l'ensemble des souches fongiques de cette étude.

En conclusion, au cours de ces expérimentations, nous avons mis en évidence, chez différentes souches fongiques, la présence d'activités ARS dans différents compartiments cellulaires, suggérant l'existence d'un pool enzymatique complexe chez les champignons. Ces résultats sont renforcés par l'identification préliminaire chez certaines souches fongiques, de plusieurs séquences d'ARS putatives qui présentent des homologies avec des ARS fongiques mais aussi bactériennes.
De plus, d'après nos résultats, la régulation des activités ARS intracellulaires, membranaires mais aussi extracellulaires semble plutôt dépendante du taxon microbien considéré que de la compartimentation de ces activités. La diversité des microorganismes fongiques possédant une activité ARS pourraient donc fortement influencer le niveau d'activité ARS dans les sols. Nous observons cependant que certaines activités ARS intracellulaires et membranaires sont susceptibles d'être régulées par la disponibilité en S minéral du milieu alors que les activités ARS extracellulaires pourraient, pour certaines, être dépendantes de la disponibilité en substrat dans l'environnement. Ces résultats suggèrent donc des mécanismes de régulation complexe des activités ARS fongiques. Enfin, aucune relation marquée n'a pu être mise en évidence entre la réponse à la limitation en S, en termes de croissance et d'induction des activités ARS. La diversité génétique de la communauté fongique fonctionnelle pourrait donc influencer l'activité ARS dans les sols.

Chapitre 3. Effets du couvert végétal sur la communauté fongique fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 3 : Effets du couvert végétal sur la communauté fongique fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate

1. Introduction

La rhizosphère correspond à la zone du sol soumise à l'influence directe des racines vivantes. Il s'agit donc d'une zone d'échange entre la plante, les microorganismes et le sol. Le volume de sol rhizosphérique est très variable selon les plantes, le type de sol et les conditions climatiques (Rinaudo *et al.,* 1978). En effet, la plante, selon le type de système racinaire, la bio-disponibilité en éléments nutritifs ou encore le statut hydrique du sol, explore un volume de sol plus ou moins important (Nye, 1986 ; Alloway, 1995). Ainsi, le sol compris entre 2 et 8 mm autour de la racine est généralement considéré comme étant du sol rhizosphérique (Semenov *et al*., 1999). Il faut noter cependant que d'autres estimations donnent des valeurs plus élevées, comme dans le cas du maïs pour lequel, Helal et Sauerbeck (1989) estiment cette distance à 20 mm. Le fonctionnement de la rhizosphère est déterminé par la plante qui libère, *via* les racines, des composés organiques, selon le processus de rhizodéposition. Des estimations, réalisées sur différentes cultures, rendent compte d'un enrichissement organique annuel compris entre 0,2 et 2,2 t C ha^{-1} (Kuzyakov et Domanski, 2000). La libération de rhizodépôts dans l'environnement racinaire crée en conséquence des conditions bio-physico-chimiques différentes de celles d'un sol global (Miah *et al*., 2000).

Concernant les conditions physiques dans la rhizosphère, elles diffèrent nettement de celles d'un sol non planté. En effet, les racines, lors de leur développement, modifient les propriétés structurales du sol, tel que son niveau de compaction (Young, 1998). Par ailleurs, les rhizodépôts favorisent l'agrégation du sol. Ainsi, les mucilages, de nature polysaccharidique et d'aspect gélatineux (Rovira, 1969), contribue à favoriser la formation des agrégats du sol et à augmenter la stabilité de ces agrégats (Traoré *et al*., 2000). Selon de récents travaux, les exsudats racinaires favoriseraient la cohésion des agrégats de sol adhérant aux racines (Czarnes, 1998). En outre, selon l'architecture du système racinaire, pivotant ou fasciculé, le volume de sol prospecté ne sera pas le même. L'architecture du système racinaire est un aspect fondamental de la productivité des cultures, car elle détermine l'efficacité de l'acquisition d'eau et d'éléments nutritifs, en conditions de concurrence souterraine et de compétition avec les microorganismes du sol (Lynch, 1995). Ainsi, le colza exerce un effet bénéfique sur la structure des sols qui s'explique du fait d'un enracinement profond. Cette

espèce présente une racine pivotante capable de s'enfoncer profondément dans le sol. Quand on sait qu'une racine de colza peut descendre jusqu'à une profondeur de plus d'un mètre, on comprend mieux les aspects très bénéfiques de cette espèce : 1/ il agit en profondeur et il est capable de remonter en surface des éléments minéraux tels que les nitrates. En effet, pendant l'automne, le colza d'hiver prélève les nitrates qui se trouvent en profondeur et qui risqueraient d'être entraînés vers les nappes phréatiques si le sol restait nu. C'est la raison pour laquelle les agronomes parlent du colza comme d'une « pompe à nitrates ». 2/ il a un fort pouvoir de récupération. Même si le climat est sec, il est capable de s'alimenter en eau en profondeur. Comparativement, l'orge présente des racines fines et fasciculées, bien adaptées pour retenir le sol en place et pour également en améliorer la structure.

En ce qui concerne les propriétés biologiques d'un sol rhizosphérique, un ensemble d'études ont montré une augmentation de la taille des communautés microbiennes comparativement à un sol global. A titre d'exemple, il a été montré grâce à l'utilisation de techniques de traçage isotopique au ^{14}C, que la présence d'un système racinaire induisait une augmentation de la biomasse microbienne de 197% (Helal et Sauerbeck, 1986). Ce phénomène, défini sous le terme « d'effet rhizosphère » (Merbach *et al*., 1999) résulte de la libération dans le sol rhizosphérique de C et N organique (Baudoin *et al*., 2003). La rhizodéposition et plus particulièrement l'exsudation de composés solubles tel que des sucres, acides aminés et acides organiques, constituent en effet une source de C, de N et d'énergie directement assimilables par les microorganismes présents à proximité des racines (Bowen et Rovira, 1999) et qui sont pour la plupart hétérotrophes. En plus de la quantité de rhizodépôts libérés par les racines vivantes, la qualité de ces composés influence le développement des microorganismes du sol (Farrar *et al*., 2003). Parmi les microorganismes telluriques, les champignons du sol, dont la teneur peut atteindre 1000 à 1500 kg par hectare, peuvent être des champignons supérieurs (Basidiomycètes et Ascomycètes), des levures ou des champignons inférieurs, souvent regroupés sous le vocable de moisissures (*Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Trichoderma, Mucor*, etc…). La grande majorité des champignons sont saprophytes. Ils sont généralement moins exigeants quant aux conditions de milieu que ne le sont d'autres organismes du sol, particulièrement les bactéries. La plupart des champignons s'accordent avec un pH acide et de conditions micro aérobies. Les champignons interviennent principalement dans la dégradation des polymères complexes (cellulose, lignine) et dans les processus d'ammonification (dégradation des matières azotées). Certains, par contre, comme les Ascomycètes, sont

appelés champignons "sucre" car ils utilisent les mêmes substrats simples comme le font de nombreuses bactéries (Ingham, 2000).

En plus du rôle trophique des rhizodépôts, ceux-ci et en particulier les exsudats racinaires peuvent contenir des composés susceptibles d'exercer des actions inhibitrices sur les microorganismes rhizosphériques. Parmi ces composés, les glucosinolates sont des métabolites secondaires soufrés produits par le colza. La dégradation des glucosinolates libère des composés biocides, principalement pour les insectes et les champignons (Fieldsend et Milford, 1994 ; Brown et Mora, 1997). Ces effets biocides sont probablement la cause d'une sélection de microorganismes adaptés à la rhizosphère des crucifères.

L'ensemble des composés exsudés contribue à influencer la structure et/ou les activités des communautés microbiennes (Hartmann *et al*., 2009). Marschner *et al*. (2002) ont ainsi étudié l'effet de l'exsudation de *Lupinus albus* L., sur la structure génétique des communautés microbiennes rhizosphériques. L'analyse des profils DGGE de l'ADNr 16S, pour les communautés bactériennes et de l'ADNr 18S rRNA, pour les communautés fongiques, met en évidence des différences de la structure génétique de ces communautés selon la présence ou non de racines protéoïdes. Les modifications de structure de la communauté fongique ont été attribuées à l'exsudation d'acide citrique et celles de la structure de la communauté bactérienne à l'acide cis-aconitique, citrique et malique (Newmann *et al.*, 1999). Dans une autre étude, Oger *et al*. (1997) ont démontré que des plantes génétiquement modifiées et aptes à produire des opines étaient colonisées à plus de 80% par des bactéries rhizosphériques capables d'utiliser les opines en comparaison avec les plantes n'en produisant pas. Les opines apparaissaient donc comme à l'origine de la modification de structure de la communauté bactérienne. D'autres études portant sur la relations entre une plante et la microflore rhizosphérique associée ont montré que les rhizodépôts libérés par les racines ont, en plus d'un effet structurant sur les structures génétiques des communautés bactériennes, également un effet sur la structure phénotypique de ces communautés (Benizri *et al*., 2002, 2007), et /ou les communautés fongiques (Smit *et al*., 2001 ; Ranjard *et al*., 2001 ; Marcial-Gomes *et al*., 2003). De récents travaux, reposant sur l'utilisation de techniques de marquage de l'ADN à l'aide d'un isotope stable du C (^{13}C-DNA-SIP), ont été engagés afin de déterminer plus précisément l'influence des rhizodépôts sur la structure génétique des communautés microbiennes rhizosphériques. Ainsi, Haichar *et al*., 2008 ont comparé l'impact de 4 espèces végétales (blé, maïs, colza et *Medicago*) cultivées sous atmosphère enrichie en ^{13}C sur la

structure des communautés bactériennes. Il ressort clairement de l'analyse des empreintes génétiques que la nature des exsudats, spécifiques à chaque espèce végétale, modifie différentiellement la structure de ces communautés bactériennes. D'autres travaux ont cerné l'impact des espèces végétales et du type de sol sur les deux communautés microbiennes (champignons et bactéries), (Mougel *et al*., 2006 ; Costa *et al*., 2006, Leake *et al.*, 2006). Ainsi, il est indéniable que les exsudats racinaires exercent une influence sélective sur la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Dennis *et al*., 2010).

Du fait de l'hétérotrophie des microorganismes, la nature du C et sa disponibilité sont des facteurs clefs régissant également les différentes fonctions remplies par les communautés microbiennes dans les sols et notamment, la décomposition des matières organiques et la dynamique des éléments nutritifs (Knights *et al.*, 2001). Ainsi, concernant l'influence des rhizodépôts sur les activités microbiennes impliquées dans la dynamique des éléments nutritifs, de nombreux travaux concernent l'activité des communautés bactériennes impliquées dans le cycle de N (Philippot, 2002). Philippot (2002) a ainsi montré que la rhizosphère est un environnement favorable à la dénitrification qui est un processus catabolique, dans lequel les formes oxydées de N (NO_3^- et NO_2^-) sont utilisées comme oxydants dans la respiration bactérienne anaérobie. De même, Mounier *et al*. (2004) ont montré que l'apport de mucilages de maïs à des sols nus a un impact sur l'activité des communautés bactériennes impliquées dans les processus de dénitrification alors même que ces mucilages influencent peu la diversité des communautés dénitrifiantes. Par rapport au cycle de P, Paterson *et al.* (2006) ont mis en évidence que l'activité phosphatase acide, d'origine microbienne, était significativement augmentée dans un sol amendé avec des rhizodépôts comparativement à un sol global non amendé. Concernant le cycle de S, plusieurs études ont mis en évidence que l'addition de sucres simples comme le glucose ou d'acides organiques, modifiait les flux de S en stimulant l'immobilisation des SO_4^{2-} (Ghani *et al*., 1993 ; Vong *et al.*, 2003 ; Dedourge *et al*., 2004). Vong *et al*. (2007) ont par ailleurs montré que l'activité arylsulfatase (ARS), enzyme microbienne clé de la dynamique du S, est stimulée dans l'environnement rhizosphérique comparativement à un sol nu. Dedourge *et al*. (2003) ont montré que l'activité ARS spécifique (activité ARS par unité de biomasse microbienne soufrée, marquée au ^{35}S) était plus importante sous couvert de colza que d'orge. Par conséquent, la rhizodéposition de la plante, selon l'espèce végétale considérée, stimulerait différemment les activités de la biomasse microbienne impliquée dans la dynamique du S (Vong *et al*., 2008).

Si les publications sont nombreuses concernant l'effet rhizosphère sur les communautés microbiennes impliquées dans le cycle de N et les conséquences de cet effet sur la dynamique de N, elles sont bien plus rares par rapport à la dynamique de S. La plupart de ces travaux n'ont concerné que les communautés fonctionnelles bactériennes impliquées dans la minéralisation soit, des sulfonates (Schmalenberger et Kertesz, 2007 ; Schmalenberger *et al.*, 2008), soit des esters de sulfate (Cregut *et al.*, 2009). Ainsi, la communauté fongique fonctionnelle du sol a été largement négligée, ceci malgré les rôles importants remplis par cette communauté dans la dynamique et le recyclage des éléments nutritifs ((Beare *et al.*, 1997 ; Stromberger, 2005). En particulier, certains champignons telluriques sont connus pour posséder des activités ARS (Scott *et al.*, 1970, 1971 ; Paietta, 1989), mais leur rôle dans la dynamique de S dans les sol en lien avec le couvert végétal, n'est pas à ce jour connu.

Dans ce contexte, il est primordial d'approfondir nos connaissances sur le lien qui s'établit entre la plante, *via* ses rhizodépôts, et la communauté fongique fonctionnelle tellurique impliquée dans la minéralisation du S organique. En effet, quelques travaux antérieurs ont montré que l'activité ARS, la biomasse microbienne soufrée et l'immobilisation du S semblent modulées par les rhizodépôts, qui constituent une source de C organique labile pour la microflore tellurique et qui, en outre, modifient les propriétés physico-chimiques du sol rhizosphérique (Dedourge *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent fortement que le cycle du S est donc modulé par la quantité et la qualité du C organique libéré par le processus de rhizodéposition plutôt que par le C organique total (DeLuca et Keeney, 1994). Par conséquent, le niveau d'activité ARS dans la rhizosphère diffèrerait en fonction du type de plante (Knauff *et al.*, 2003). De la même manière, l'activité ARS pourrait être modulée au cours des différents stades phénologiques des plantes, dans la mesure où la rhizodéposition est connue pour varier en qualité et en quantité, au cours du temps, en fonction des stades de développement des végétaux. Ces modifications pourraient résulter de changements dans la taille, la structure et/ou l'activité des communautés microbiennes possédant l'activité ARS (Swinnen *et al.*, 1994 ; Cheng *et al.*, 1996 ; Quian et Doran, 1996 ; Gransee et Wittenmeyer, 2000 ; Warembourg et Estelrich, 2001).

Dans le cadre de ce chapitre, notre objectif a donc été de suivre l'évolution de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable, impliquée dans la minéralisation du S organique du sol, ceci dans les rhizosphères de deux plantes ayant des besoins en S contrastés, le colza et l'orge. Il s'agira de cerner l'éventuel effet rhizosphère, en conditions contrôlées,

qu'exercent ces plantes sur la croissance de cette communauté particulière et sur son activité. Certaines variables indicatrices du processus de rhizodéposition, comme le C et N solubles du sol et le C et N racinaires (Vong *et al.,* 2007), ont été mesurées afin d'établir d'éventuelles relations entre l'évolution de la taille, de l'activité des communautés fongiques fonctionnelles et la rhizodéposition.

2. Résultats et discussion

2.1. Analyse des différentes variables indépendamment

2.1.1. Estimation de la rhizodéposition

La rhizodéposition a été évaluée au travers des indicateurs indirects suivants : la teneur en C soluble racinaire et la teneur en C soluble du sol. En effet, Dilkes *et al*. (2004) ont montré que la teneur en C soluble des racines était étroitement couplée au C exsudé. De plus, Vong *et al*. (2007) ont également mis en évidence que les teneurs en C soluble du sol étaient corrélées avec le C rhizodéposé.

Concernant les teneurs en carbone hydrosoluble des racines (Figure 30), tous temps confondus, ces teneurs sont significativement supérieures chez l'orge (54 mg C g^{-1} masse sèche de racines) par rapport au colza (33 mg C g^{-1} masse sèche de racines). En conséquence, ces résultats suggèrent une rhizodéposition plus importante sous couvert d'orge comparativement au colza.

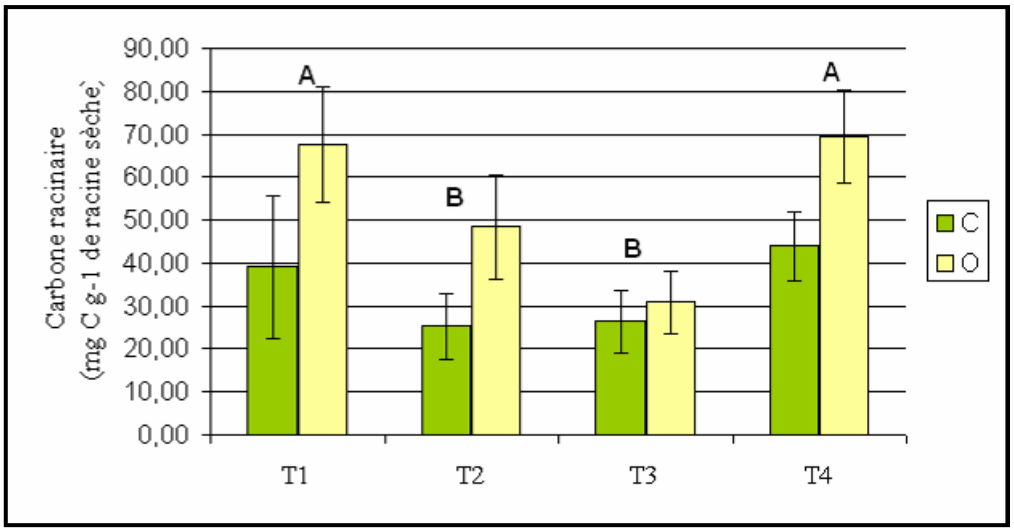


Figure 30 : Evolution des teneurs en carbone hydrosoluble des racines de colza et d'orge Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Cette variable, indicatrice de la rhizodéposition, évolue temporellement. En effet, pour le C soluble racinaire, toutes plantes confondues, les valeurs varient de 28,6 à 56,7 mg de C par gramme de racine sèche. Nous constatons un effet significatif de la date de prélèvement, pour les deux couverts. En effet, les teneurs en C soluble des racines diminuent entre T1 et T3, puis augmentent de nouveau. Cette diminution semble cohérente : il y a en effet une dilution du C soluble au cours de la croissance de la plante qui résulte de l'augmentation significative de la biomasse racinaire (Figure 31). Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents de Vong *et al.* (2007).

Ainsi, les diminutions observées concernant le C racinaire, outre le fait qu'elles s'expliquent par une augmentation du volume de racines liée au développement des plantes à ces stades, pourraient aussi résulter d'une exsudation accrue à ces stades végétatifs

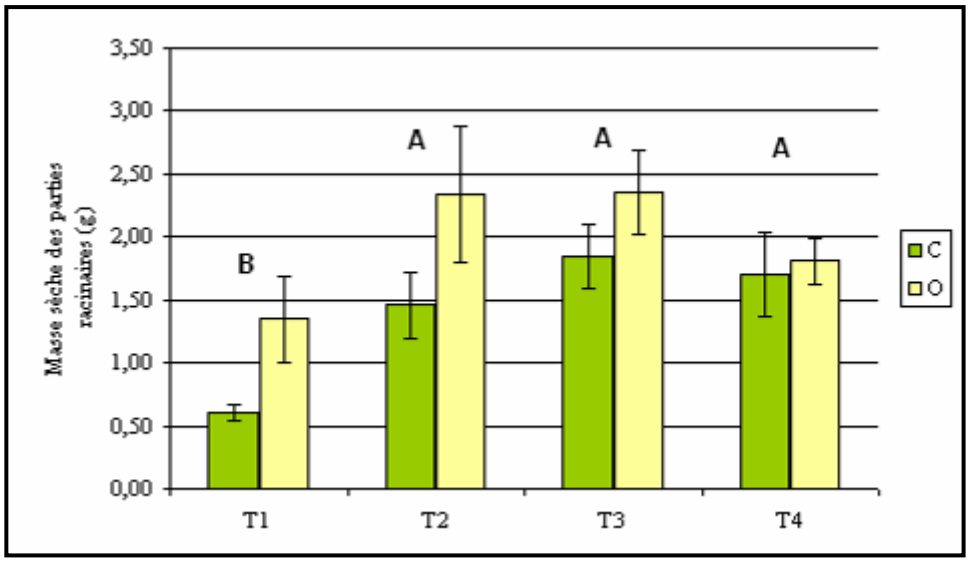


Figure 31 : Evolution des masses sèches des parties racinaires pour le colza et l'orge Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza (C) et l'orge (O), aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Le C du sol extrait à l'eau chaude est un indicateur permettant de cerner les changements de gestion des sols (Leinweber *et al.*, 1995 ; Gregorich *et al.*, 2003). Si nous nous intéressons donc maintenant à cette variable, en moyenne, tous temps confondus, cette teneur est plus élevée dans le sol prélevé sous orge (1064 mg C kg^{-1} de sol) que dans celui sous colza (892 mg C kg^{-1} de sol). Les teneurs en C sont également significativement supérieures, tous temps confondus, dans le sol sous orge par rapport à celles dans le sol nu (820 mg C kg^{-1} de sol) et légèrement supérieures dans le sol sous colza en comparaison du sol nu (Figure 32). Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse émise par Vong *et al.* (2007) selon laquelle, les teneurs en C soluble des racines et du sol sont liées. Ainsi, selon cette hypothèse, nos résultats suggèrent bien que dans la rhizosphère d'orge, et dans une moindre mesure dans celle du colza, nous trouvons davantage de C soluble, que dans le sol nu. Par ailleurs, l'orge libèrerait une quantité plus importante d'exsudats racinaires que le colza. Ceci apparaît néanmoins contradictoire avec les résultats de Lasserre-Joulin *et al.* (2001) et Vong *et al.* (2007) qui ont trouvé que les taux de carbone soluble sont supérieurs dans la rhizosphère de colza par comparaison à la rhizosphère d'orge. A noter que nos expérimentations ont été réalisées en

conditions contrôlées, alors que les études de Lasserre- Joulin *et al*. (2001) ainsi que celles de Vong *et al*. (2007), ont été effectuées au champ, ce qui pourrait expliquer les différences constatées.

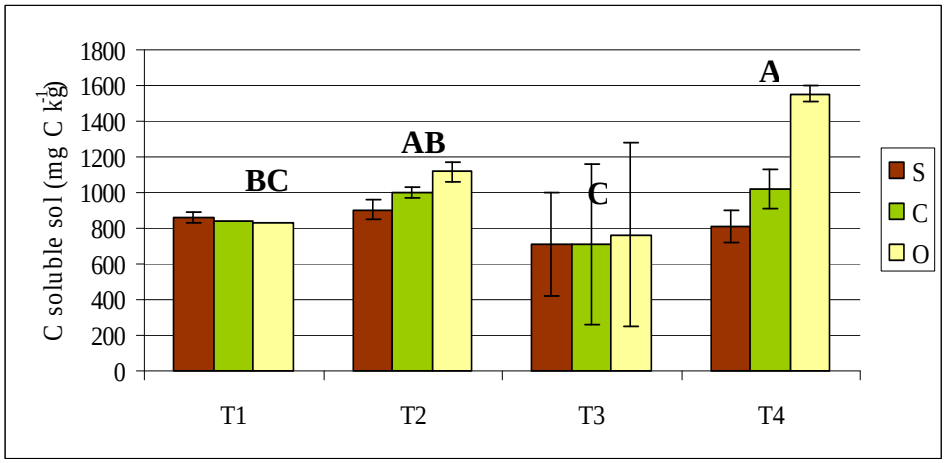


Figure 32 : Evolution des teneurs en carbone soluble des sols Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

2.1.2. Biomasse microbienne

Biomasses C et N microbiennes

Nous avons représenté sur la même figure, à la fois les biomasses C et N mais aussi le rapport des biomasses (Figure 33).

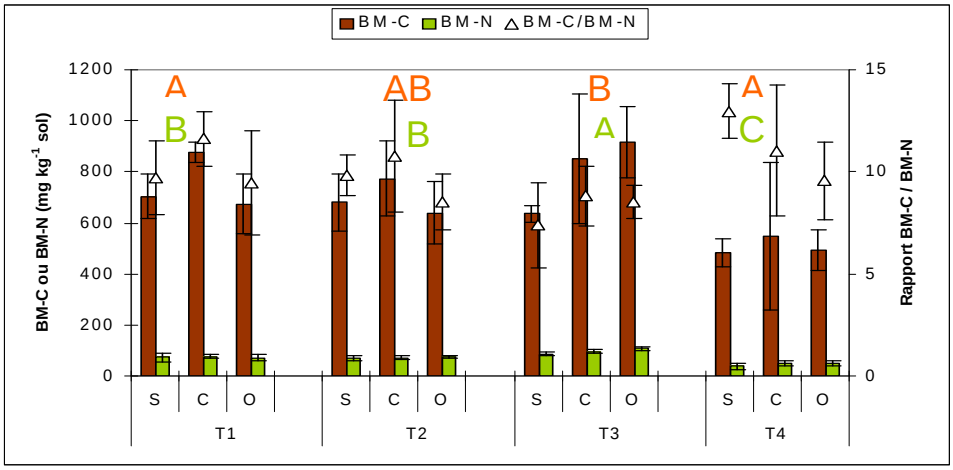


Figure 33 : Evolution des biomasses carbonées, biomasses azotées et des rapports BMC/BMN. Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls), en rouge : Biomasse carbonée ; en vert : Biomasse azotée

Nous constatons des valeurs élevés du rapport BMC/BMN au cours des différents temps de prélèvement. En effet, les valeurs du rapport des biomasses varient 7,4 à 13. Quel que soit le type de sol, ce rapport diminue significativement entre T1 et T3 et reprend des valeurs élevées à T4. Ainsi, la fraction fongique est bien représentée dans notre sol. Ces résultats sont en accord avec ceux de différents auteurs (Strong *et al.*, 2004 ; Bhupinderpal-Singh *et al.*, 2006 ; White, 2006), qui ont mis en évidence qu'une fraction fongique bien représentée dans un sol implique un rapport élevé des biomasses C et N.

Concernant l'évolution des biomasses C, tous temps confondus, elles apparaissent sous couvert de colza et de sol nu significativement supérieures par rapport à celle sous orge. En effet, nous trouvons des valeurs moyennes de 761,3 et 680,6 mg C Kg $^{-1}$ sol, respectivement en sol nu et sous colza. Ces valeurs sont significativement supérieures à celle observée sous orge (625,9 mg Kg $^{-1}$ sol. Par ailleurs, concernant la biomasse N, tous sols confondus, nous constatons une augmentation significative de celle-ci des temps de prélèvement T1 à T3. En effet, la biomasse augmente significativement de 73,1 à 96,7 mg Kg $^{-1}$ sol. Par contre, au temps de prélèvement T4, la biomasse N diminue significativement (46,1 mg Kg $^{-1}$ sol).

Enfin, nous constatons que le C soluble semble étroitement corrélé avec la biomasse carbonée microbienne, ce qui confirme les résultats de Sparling *et al*. (1998).

Evolution de la taille des communautés fongiques totale et fonctionnelle cultivables

Nous avons tout d'abord estimé la taille de la communauté fongique totale cultivable, en comptant le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) sur le milieu généraliste PDA (Figure 34).

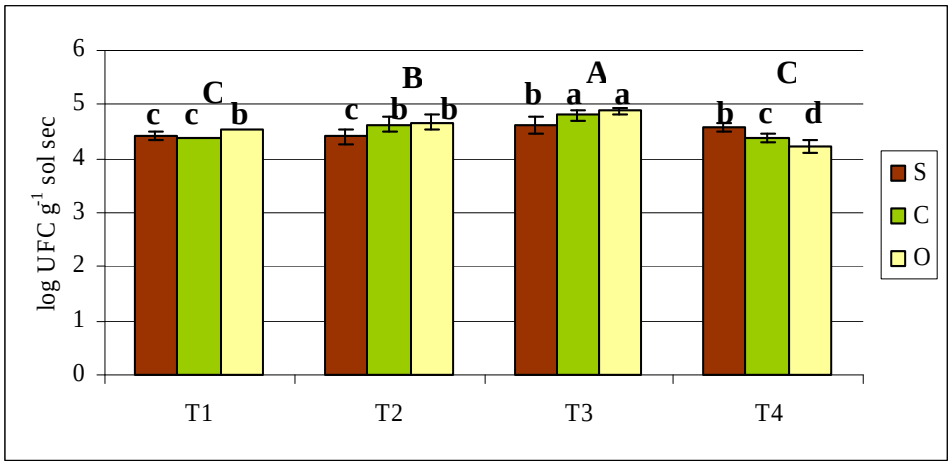


Figure 34 : Evolution de la taille de la communauté fongique totale cultivable

Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Tous sols confondus, nous constatons une augmentation significative de la taille de la communauté fongique cultivable, des temps de prélèvement T1 à T3. En effet, la taille augmente significativement de 4,45 à 4,77 (log UFC g^{-1} sol sec). Au temps de prélèvement T4, la taille de la communauté fongique cultivable diminue significativement (4,4 log UFC g^{-1} sol sec). Ces variations se confirment globalement lorsque nous appréhendons les évolutions de la taille de la communauté fongique totale cultivable, pour chaque type de sol. En effet, nous observons, quel que soit le sol considéré, que les densités sont significativement plus élevées au temps T3 puis diminuent significativement au temps T4. Comparativement au sol

nu, les densités sous couvert de colza et d'orge sont significativement supérieures aux temps T2 et T3 alors que ces densités sont significativement inférieures au stade T4. Les temps de prélèvement T2 et T3 correspondent au stade de croissance active des plantes (stades Boutons accolés-Boutons séparés pour le colza et début Montaison-courant Montaison pour l'orge), caractérisés par une rhizodéposition plus importante qu'au stade T4.

Par ailleurs, tous temps confondus, les densités moyennes sous couvert de colza et d'orge sont significativement supérieures par rapport à celles en sol nu. En effet, nous trouvons des valeurs de 4,61 et 4,56 (log UFC g^{-1} sol sec) respectivement sous orge et colza qui sont significativement supérieures à celle observée en sol nu (4,4 log UFC g^{-1} sol sec). Ainsi, ces résultats confirment l'impact du couvert (par rapport au sol nu) et ainsi renforce l'hypothèse de l'effet de la rhizodéposition sur l'augmentation de la taille de la communauté fongique totale cultivable.

Ainsi, il semblerait, même s'il aurait été nécessaire d'accéder à des indicateurs de la rhizodéposition, que cette libération de C organique, *via* les processus d'exsudation, favorise le développement de la communauté fongique cultivable. Nos résultats semblent donc aller dans le même sens que ceux de Wardle (1992) qui a mis en évidence que la croissance microbienne est principalement limitée par le carbone, ainsi que ceux de nombreux auteurs précisant que le mucilage et les exsudats représentent les plus importantes sources de matière organique apportées au sol et directement assimilées par la microflore tellurique (Whipps et Lynch, 1983 ; Helal et Sauerbeck, 1986 ; Wheatley *et al.*, 1990). Des études récentes, basées sur l'utilisation d'exsudats racinaires marqués au ^{13}C et concernant spécifiquement la microflore tellurique fongique, confirment ces travaux antérieurs (Butler *et al.,* 2003 ; Treonis *et al.,* 2004). De même, Arao (1999) et Waldrop et Firestone (2004) constatent après ajout d'exsudats racinaires marqués au ^{13}C, qu'il y a incorporation de ^{13}C dans les acides gras phospholipidiques fongiques. Ainsi, les champignons contribuent à la dégradation de carbone organique simple (De Boer *et al.,* 2005).

A l'inverse, les stades reproducteurs, marqués par une remobilisation des photoassimilats vers les organes reproducteurs et une diminution consécutive de la rhizodéposition, se caractérisent par une taille de la communauté fongique cultivable significativement inférieure à celle des temps T2 et T3.

En conséquence, comme en fait état la littérature, des stades végétatifs caractérisés par une forte exsudation, montrent des densités microbiennes importantes, ce que nous observons, dans le cadre de nos travaux, pour la taille de la communauté fongique totale.

Si nous considérons uniquement les couverts d'orge et de colza, nous remarquons, qu'aux temps T2 et T3, la taille de la communauté fongique cultivable est identique sous ces deux couverts. Nous observons également que la taille de cette communauté fongique est significativement supérieure pour l'orge au temps T1 et qu'inversement, les densités sont plus élevées sous couvert de colza, au temps T4. Concernant les différences observées entre les deux couverts au temps T1, ceci pourrait s'expliquer par l'implantation et le développement plus rapide de l'orge comparativement au colza. Concernant le temps T4, la présence de siliques vertes photosynthétiques chez le colza pourrait permettre de maintenir le processus de rhizodéposition de manière prolongée comparativement à l'orge, sénescente à ce stade.

Nous avons ensuite suivi les évolutions de la taille de la communauté fongique cultivable fonctionnelle (Figure 35), qui représente une fraction de la communauté fongique totale cultivable. Les densités moyennes, tous temps confondus, sont de 3,82 (log UFC g^{-1} sol sec) à la fois sous couvert d'orge et en sol nu contre 3,58 sous couvert de colza. Concernant la taille de la communauté fongique fonctionnelle et cultivable, nous ne notons pas d'effet rhizosphère, en particulier pour le couvert de colza, sous lequel les densités sont significativement inférieures à celles estimées en sol nu. Ces résultats apparaissent donc ici différents de ceux observés pour la communauté cultivable totale, pour laquelle nous avions bien un effet rhizosphère, à la fois sous couvert d'orge mais aussi de colza. Il est pourtant connu, que les rhizodépôts, de par leur nature et leur quantité variables selon les plantes, exercent une action sélective sur la microflore du sol (Angus *et al.,* 1994 ; Innes *et al.* 2004). Ainsi, nous aurions pu nous attendre, comme certains auteurs l'ont montré (Kuzyakov et Domanski, 2000 ; Marschner *et al.,* 2003) à observer un effet rhizosphère sur les communautés fonctionnelles, en particulier sous couvert de colza. Ces résultats suggèrent donc que les communautés fonctionnelles, en particulier sous couvert de colza, ne répondent pas à la rhizodéposition, en tout cas par rapport à l'apport de C. Mais il est également à noter que la proportion de microorganismes du sol capables de se développer sur milieu gélosé est très faible et de l'ordre de 1 à 10% de la microflore totale (Torsvik *et al*., 1990) et que de plus, ici, nous ne nous intéressons qu'à la communauté fongique fonctionnelle cultivable. Ainsi, les comptages effectués ici ne sont représentatifs que d'une faible part de la communauté microbienne totale du sol et restent, dans une certaine mesure, à interpréter avec précautions.
Par ailleurs, il est également possible que ces résultats soient liés au fait que nos expérimentations aient été réalisées en conditions contrôlées. En effet, lors de travaux

antérieurs réalisés au champ, nous trouvions des densités moyennes sous couvert de colza de l'ordre de 4,5 log UFC g^{-1} sol sec).

Nous observons principalement, tous sols confondus, une évolution temporelle significative de la densité de la communauté fongique possédant l'activité ARS. Ainsi, la densité de cette communauté diminue significativement entre T1 et T2 (de 4,17 à 3,75 log UFC g^{-1} sol sec), puis augmente significativement à T3 pour enfin diminuer significativement à T4 (de 4,77 à 4,4 log UFC g^{-1} sol sec).

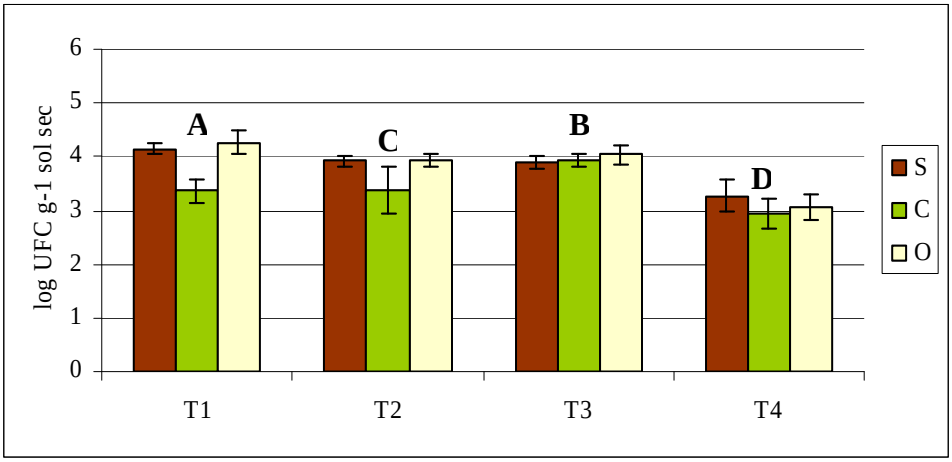


Figure 35 : Evolution de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Si nous considérons maintenant les évolutions de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable, pour chaque type de sol, aucune différence significative n'est observée au cours du temps. Cependant, des tendances peuvent être mises en évidence. Comparativement au sol nu, des différences sont en effet observées entre les couverts de colza et d'orge. Ainsi, sous couvert d'orge, nous observons que les densités évoluent de manière identique à celles du sol nu. Ces densités sont stables des stades T1 à T3 puis diminuent au stade T4. Sous couvert de colza, les densités semblent inférieures à celles sous couvert d'orge et sous sol nu, aux stades T1 et T2. Ces densités augmentent ensuite au stade T3 puis diminuent au stade T4.

2.1.3. Dynamique de S

Activités ARS totale, intra et extracellulaire

Nous avons représenté sur la même figure les activités ARS totale, extracellulaire et intracellulaire ; l'activité intracellulaire correspondant à la différence entre l'activité ARS totale et l'activité ARS extracellulaire (Figure 36).

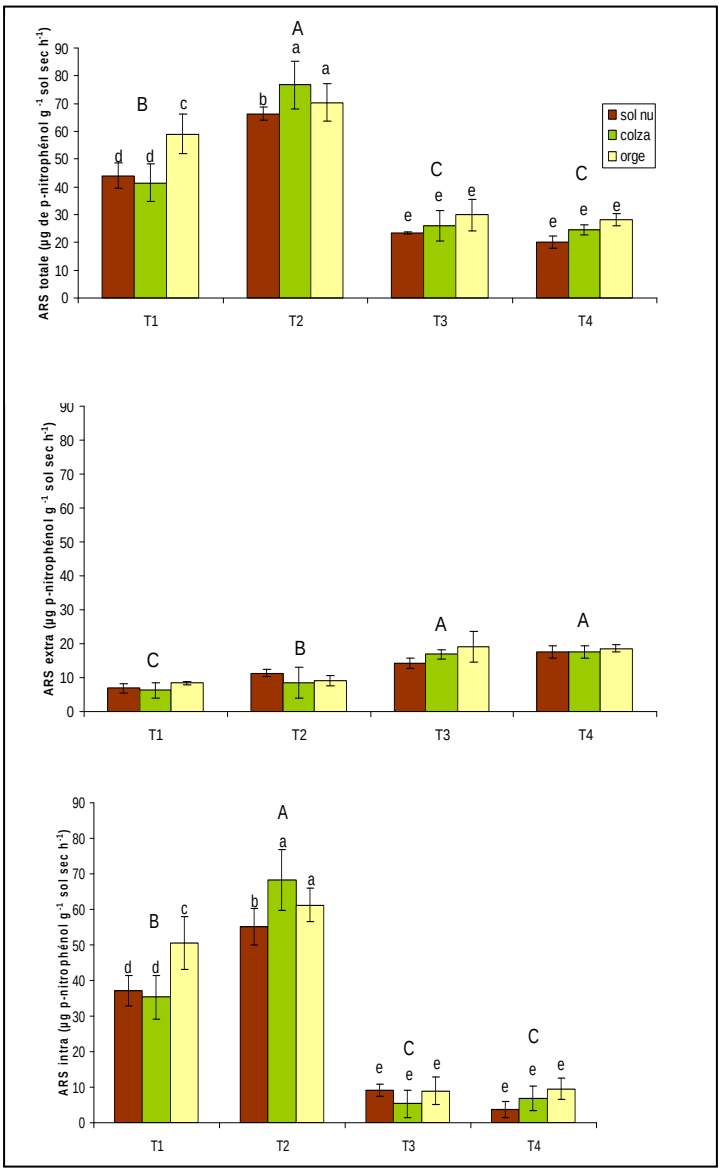


Figure 36 : Evolution des activités ARS totale, extracellulaire et intracellulaire Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de

prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Activité ARS totale

L'activité ARS est une activité d'origine microbienne. Elle représente en conséquence l'activité enzymatique des champignons mais également des bactéries ou de tous autres microorganismes présents dans le sol. Il s'agit également d'une activité potentielle dans la mesure où elle a été dosée à la température optimale de 37°C, en conditions de laboratoire.

Tous sols confondus, les valeurs moyennes d'ARS totale varient entre 24 et 72 µg de NP g^{-1} du sol sec h^{-1}. Ces résultats sont plus faibles que ceux obtenus lors de précédents études (Chen *et al*., 2001 ; Vong *et al*., 2004 ; Cregut *et al.*, 2009) et ces différences peuvent résulter de la méthode de dosage utilisée et/ou du type de mélange de sol utilisé. En effet, il a été montré d'une part, que la fumigation au chloroforme diminue l'activité de la microflore et de l'arylsulfatase totale de 23% et 50% respectivement (Klose et Tabatabai, 1999). De plus, après fumigation, des protéases sont actives et à même de dégrader des hydrolases telles l'arylsulfatase (Renella *et al*., 2002). D'autre part, le type de sol utilisé dans notre expérience est un mélange sol-sable (70-30), alors que dans les études précédentes, il s'agissait d'un sol « brut », sans aucun ajout. Ainsi, si nous tenons compte du « facteur de dilution » du sol, du fait du mélange avec du sable, les valeurs moyennes d'ARS totale varient entre 34 et 101 µg de NP g^{-1} du sol sec h^{-1}, ce qui nous rapproche des valeurs trouvées par ailleurs.
Un effet temporel est par ailleurs observé. Les activités ARS totales augmentent significativement entre le temps T1 et T2 puis diminuent significativement au stade T3.

Tous temps confondus, les valeurs d'activité ARS totale sont significativement plus élevées sous couvert d'orge (47 µg de NP g^{-1} de sol sec h^{-1}) comparativement à celles sous couvert de colza (42 de NP g^{-1} du sol sec h^{-1}) et sous le sol nu (38 µg NP g^{-1} du sol sec h^{-1}). De plus, l'activité ARS totale n'est pas significativement différente sous couvert de colza comparativement au sol nu.
En particulier, au stade T1, l'activité ARS totale sous orge est d'environ 59 µg de PN g^{-1} sol sec. h^{-1} et est significativement supérieure à celle sous colza et dans le sol nu (respectivement 41,5 et 44 µg PN g^{-1} sol sec. h^{-1}). Ces valeurs inférieures constatées sous colza peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses. Il est en effet connu que le colza libère dans le sol des

métabolites secondaires issus de la dégradation des glucosinolates et que ces composés montrent des propriétés biocides. C'est le cas du 2-phényléthyl-GLS qui est considéré comme un toxique pour les champignons (Kirkegaard *et al.*, 1998). En outre, contrairement à l'orge, le colza est une plante non mycorhizée, ce qui contribuerait à modifier la structure des communautés microbiennes. Ceci pourrait en conséquence moduler l'activité ARS.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer le fait d'observer une activité ARS totale supérieure sous orge par rapport au colza reposerait sur la morphologie du système racinaire des deux plantes (Grayston et Germida, 1990). Contrairement au colza qui présente un système racinaire en pivot, l'orge possède un système racinaire fasciculé d'une part, éventuellement plus propice à la colonisation microbienne et d'autre part, favorisant la protection des microorganismes contre les prédateurs.

ces activités augmentent significativement au stade T2 et sont significativement supérieures sous orge et colza comparativement au sol nu. Comme certains auteurs l'ont montré (Dedourge *et al.*, 2003, 2004 ; Vong *et al*., 2003, 2004 ; Paterson *et al*., 2006), la libération de C organique *via* les processus de rhizodéposition, est connue pour stimuler les activités microbiennes. D'ailleurs, concernant l'activité ARS, Vong *et al*. (2007) ont montré que cette l'activité est stimulée dans l'environnement rhizosphérique comparativement à un sol nu. Ainsi, ces résultats convergent vers le fait qu'aux stades végétatifs (T2), caractérisés par une rhizodéposition importante et donc des plantes ayant de forts besoin en soufre, les activités microbiennes sont également les plus intenses, et en particulier l'activité ARS.

Activités ARS extracellulaire et intracellulaire

Dans le sol, les enzymes sont localisées à l'intérieur des cellules microbiennes (enzymes intracellulaires) et/ou sécrétées par les microorganismes dans le milieu (enzymes extracellulaires) (Dick, 1997). Il est admis que la synthèse des enzymes intracellulaires est proportionnelle à la croissance microbienne alors que les activités extracellulaires peuvent être induites, indépendamment de cette croissance (Allison et Vitousek, 2005). La différenciation de ces deux fractions enzymatiques est importante afin de préciser la contribution réelle des microorganismes à la bio-disponibilité des éléments nutritifs pour la plante. En effet, de nombreux travaux suggèrent fortement que c'est la fraction extracellulaire qui participe significativement à la minéralisation de la MO (Sinsabaugh, 2008).

Concernant les activités ARS du sol, l'utilisation de chloroforme pour lyser les cellules microbiennes a permis de montrer qu'environ 45% de l'activité ARS totale du sol est

extracellulaire et 55% est associée aux microorganismes (intracellulaire et membranaire) (Klose et Tabatabai, 1999). Nos résultats confirment ces valeurs dans la mesure où, tous temps et tous sols confondus, nous mettons en évidence que 41,5% de l'activité ARS est extracellulaire (respectivement 41, 39,5 et 43,9% sous colza, orge et sol nu) et 56,7% est intracellulaire (55, 58,8 et 56 respectivement sous colza, orge et en sol nu). Ainsi, ces données indiquent l'importance de la microflore comme source d'enzymes dans le sol et en particulier de la fraction intracellulaire.

Concernant l'activité ARS extracellulaire, aucune différence significative de niveau d'activité n'est observée entre les différents types de sol, en moyenne, tous temps confondus (12,2, 12,3 et 13,8 PN g^{-1} sol sec. h^{-1}, respectivement en sol nu et sous couvert de colza et d'orge). Nous observons cependant une évolution temporelle de cette activité, tous types de sols confondus. Ainsi, l'activité ARS extracellulaire augmente significativement jusqu'au stade T3 puis reste stable au stade T4. A l'inverse, les valeurs de l'activité ARS intracellulaire sont les plus élevées aux stades T1 et T2, puis diminuent significativement à partir du stade T3. Il semblerait donc, qu'aux premiers stades de développement des plantes, qui correspondent à des stades durant lesquels les besoins en S sont importants, l'activité ARS soit essentiellement intracellulaire. Afin de confirmer cela, nous avons calculé le rapport des activités ARS intracellulaires et extracellulaires sur les activités totales [(ARSintra/ARStotale)x100] et [(ARSextra/ARStotale)x100)], ceci d'une part pour les stades T1 à T2, puis T3 à T4, (Tableau 26).

Tableau 26 : Pourcentages des activités ARS intracellulaires et extracellulaires sur les activités totales durant les stades végétatifs et de reproduction

ARS (intra/totale)*100	**Colza**	**Orge**
T1 à T2	61,3	60,5
T3 à T4	16,9	22,3

ARS (extra/totale)*100	**Colza**	**Orge**
T1 à T2	8,7	9,5
T3 à T4	47,6	45,3

Ce résultat montrent clairement que lors des stades végétatifs, l'activité ARS intracelullaire est dominante et qu'inversement, l'activité extracellulaire est majoritaire aux stades reproducteurs. Ainsi, cela suggèrerait, en conséquence, d'une part, que les communautés microbiennes possédant l'activité ARS pourraient être en compétition avec les plantes pour l'acquisition du S, ceci lors des stades phénologiques précoces et d'autre part, que l'activité ARS intracellulaire serait un marqueur d'immobilisation.

Teneurs en sulfates

Nous avons tenté d'exprimer les teneurs en sulfates, activités ARS, UFC totales, UFC fonctionnelles, en valeurs « nettes ».

La production nette pour chacune de ces variables est estimée en calculant la différence entre deux points de prélèvement des valeurs prises par ces variables.

Concernant les teneurs nettes en sulfates (Figure 37), bien qu'il soit difficile de commenter ces valeurs nettes de sulfates dans la mesure où il ne s'agit pas d'un véritable bilan net car nous n'avons pas mesuré les valeurs de S exporté par les plantes, nous constatons malgré tout des valeurs négatives dès le stade T2, indiquant une immobilisation de sulfates. Puis, dès le stade T3, la tendance s'inverse dans la mesure où les valeurs sont positives pour les trois types de sols. Ceci indique une minéralisation des sulfates. Nous remarquons en outre, du fait de teneurs nettes en sulfates plus élevées dans le cas du sol nu et sous couvert d'orge, que la minéralisation est donc plus importante sous orge et en sol nu comparativement au colza. Ces résultats suggèrent donc que les acteurs impliqués dans la dynamique du S ne sont pas forcément les mêmes et/ou qu'ils présentent des activités différentes selon le type de sol considéré. Enfin, au stade T4, seul le sol nu montre des valeurs négatives.

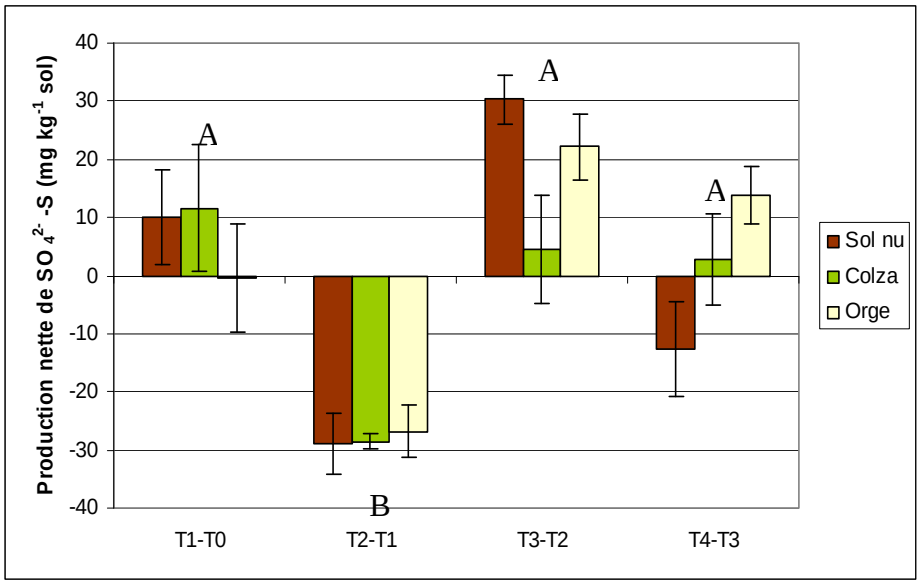


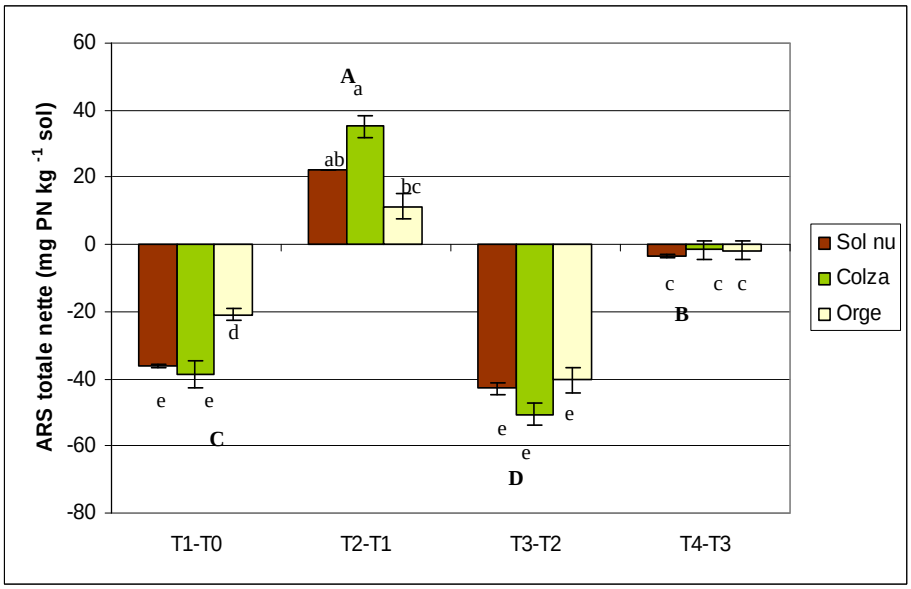
Figure 37 : Evolution des teneurs nettes en sulfates dans les trois sols Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

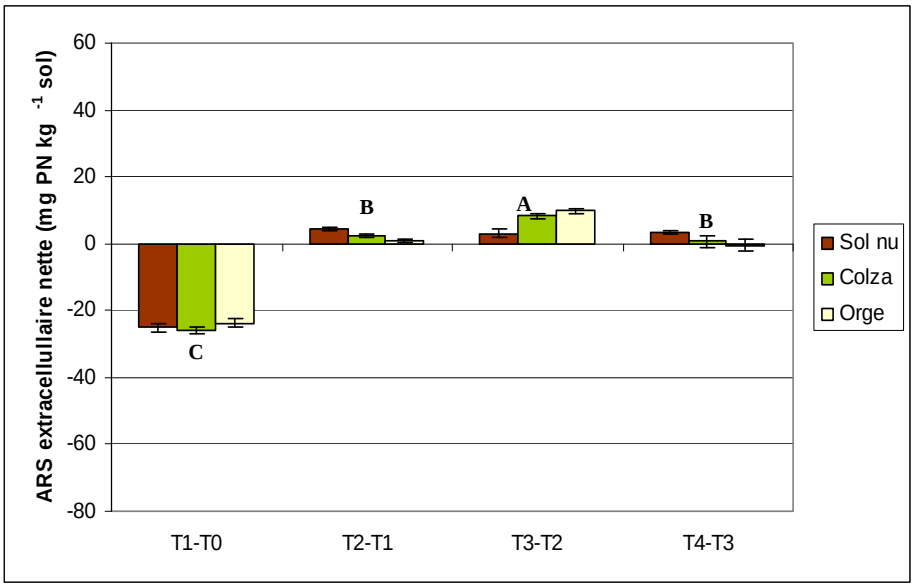
Concernant les activités ARS, nous observons des profils d'évolution relativement semblables pour les ARS totale et intracellulaire alors que dans le cas de l'activité extracellulaire, l'évolution des teneurs nettes, semble différente.

Concernant la fraction extracellulaire (Figure 38), nous observons des valeurs négatives au stade T1 (T1-T0), puis l'évolution semble peu marquée pour les trois stades suivants. Cette diminution marquée entre T1 et T0 pourrait résulter d'une absorption de cette fraction enzymatique sur les agrégats de sol, favorisée du fait de l'humidification du sol réalisée lors de la mise en place de l'expérimentation (Rao *et al.*, 2003). Plus globalement, cette activité semble se stabiliser dans les sols, avec peu de variations au cours du temps et jouerait donc un rôle importante dans la mise à disposition d'éléments nutritifs tels les sulfates lors de conditions défavorables pour l'expression de l'ARS intracellulaire (Klose *et al.*, 1999; Vong *et al.*, 2008).

L'activité ARS intracellulaire nette (Figure 38) montre par contre un profil d'évolution beaucoup plus variable au cours du temps. En effet, elle présente des valeurs négatives dès le

stade T1 ainsi qu'au stade T3, alors qu'au stade T2 la tendance s'inverse dans la mesure où les valeurs sont positives pour les trois sols. Les valeurs négatives observées entre les temps T1 et T0 pourraient s'expliquer par la diminution de la taille de la communauté fongique totale (dont la fonctionnelle) que nous avons observée durant de cet intervalle de temps (diminution de 0,5 log UFC g^{-1} sol sec entre T1 et T0). Plus globalement, les fortes variations au cours du temps suggèrent que les microorganismes présentent une plasticité importante leurs permettant d'adapter leur métabolisme à la disponibilité en S dans les sols afin de répondre à leurs besoins en S.


ARS totale nette (mg PN kg -1 sol)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
T1-T0
T2-T1
T3-T2
T4-T3
Sol nu
Colza
Orge
A
a
ab
bc
c c c
B
d
e e
C
e
e
e
D


ARS extracellullaire nette (mg PN kg -1 sol)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
T1-T0
T2-T1
T3-T2
T4-T3
Sol nu
Colza
Orge
B
A
B
C

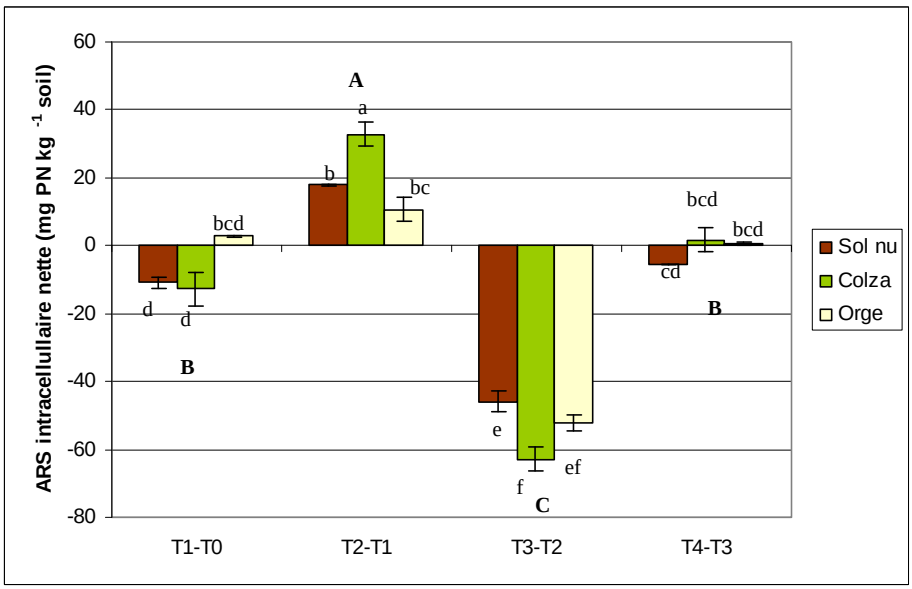

ARS intracellullaire nette (mg PN kg -1 soil)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
T1-T0
T2-T1
T3-T2
T4-T3
Sol nu
Colza
Orge
A
a
b
bc
bcd
bcd
bcd
cd
B
d
d
B
e
f
ef
C

Figure 38 : Evolution des activités nettes ARS dans les trois sols Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement. Les valeurs suivies d'une même lettre (majuscules : tous sols confondus ; minuscules : suivant le type de sol et le temps) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls)

Afin de tenter de mieux interpréter ces précédents résultats, nous avons réalisé des corrélations entre les activités ARS nettes, les UFC totales et fonctionnelles et les teneurs en sulfates nettes (Tableau 27).

Tableau 27 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001, UFC fonct : UFC Fonctionnelles, UFC tot : UFC totales, ARS intra : ARS intracellulaire, ARS extra : ARS extracellulaire, ARS tot : ARS totale

Sol nu						
	Sulfate	ARS tot	ARS ext	ARS intra	UFC tot	UFC fonct
Sulfate	1					
ARS tot	-0,722**	1				
ARS extra	-0,235	0,460	1			
ARS intra	-0,709**	0,886***	-0,001	1		
UFC tot	0,013	0,171	0,717**	-0,177	1	
UFC fonct	0,217	-0,508*	-0,957**	-0,076	-0,697	1

Colza

	Sulfate	ARS tot	ARS ext	ARS int	UFC tot	UFC fonct
Sulfate	1					
ARS tot	-0,507*	1				
ARS extra	-0,259	0,258	1			
ARS intra	-0,388	0,916***	-0,143	1		
UFC tot	-0,346	0,251	0,647**	-0,047	1	
UFC fonct	0,329	-0,645**	-0,667**	-0,412	-0,306	1

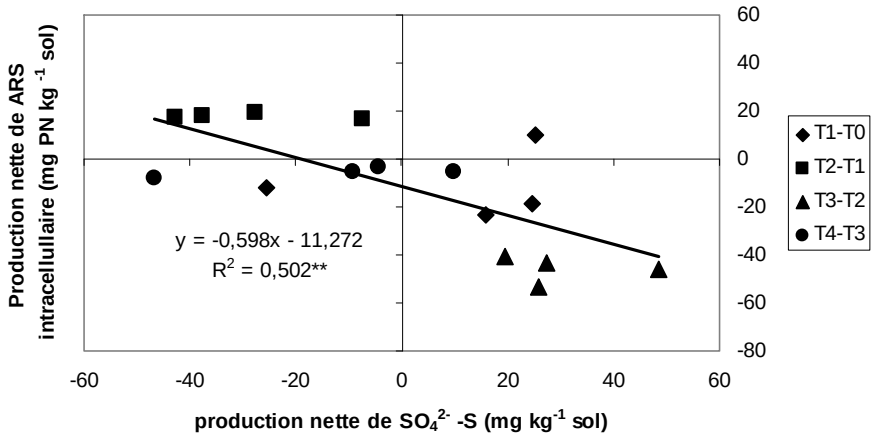
Orge

	Sulfate	ARS tot	ARS ext	ARS int	UFC tot	UFC fonct
Sulfate	1					
ARS tot	-0,531*	1				
ARS extra	0,172	-0,021	1			
ARS intra	-0,541*	0,864***	-0,517*	1		
UFC tot	-0.025	-0,218	0,427	-0,444	1	
UFC fonct	-0,034	-0,393	-0,786***	0,045	0,035	1

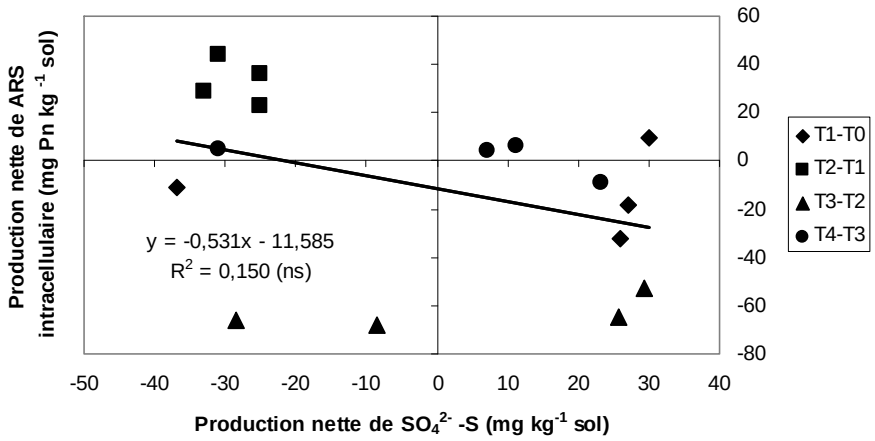
Pour les trois sols étudiés, nous constatons des corrélations négatives, significative entre l'ARS totale nette, l'ARS intracellulaire nette et les teneurs nettes en sulfates. En effet, concernant la fraction intracellulaire et les teneurs en sulfates nettes, nous obtenons des coefficients de corrélations négatifs (R = -0,71, $p < 0,01$; R = -0.39, ns ; R = -0.54, $p < 0.05$, respectivement, sol nu, colza, orge). Ainsi, quel que soit le type de sols, une augmentation de l'activité intracellulaire est corrélée à l'immobilisation des sulfates. A l'inverse, lorsque les sulfates sont minéralisés, l'activité ARS intracellulaire diminue. Ces résultats sont en accord avec ceux de Qiu *et al.* (2005), qui ont montrés que l'expression d'enzymes comme l'ARS était régulée par la disponibilité des éléments nutritifs. De plus, nos résultats suggèrent que c'est la fraction intracellulaire de l'activité ARS qui est le plus dépendante de la disponibilité en $SO4^{-2}$ dans les sols.

Sous couvert de colza et d'orge, les valeurs des coefficients de corrélations sont plus faibles que celle notée en sol nu (Figure 39). Ceci pourrait suggérer l'existence d'une compétition pour les sulfates entre les plantes et les microorganismes, ce qui affecte probablement ces relations.

Sol nu



Colza



Orge

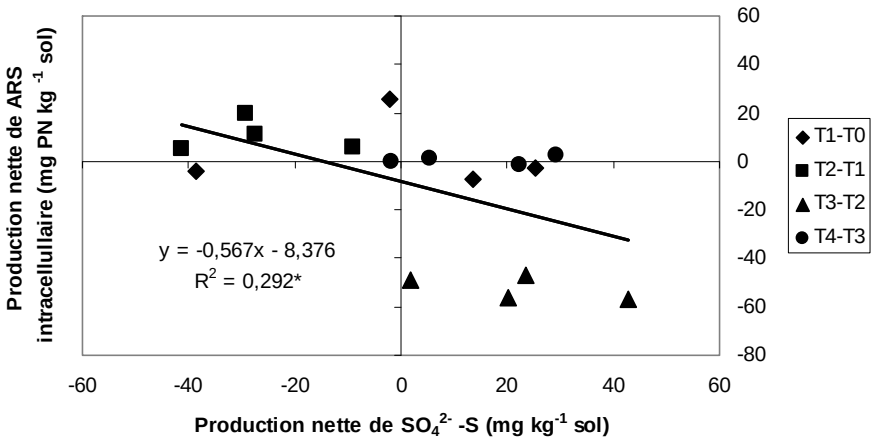


Figure 39: Corrélations entre la production nette en sulfates et les activités ARS nettes intracellulaires, dans les trois types de sol
Les points de prélèvements correspondent, respectivement pour le colza et l'orge, aux stades : T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : boutons séparés et montaison, T4 : floraison et épiaison. Quatre répétitions sont effectuées par traitement et temps de prélèvement.

En ce qui concerne l'ARS extracellulaire nette, il n'existe pas de corrélations avec la production nette de sulfates. L'ARS extracellulaire reste sensiblement constante au cours du temps, donc non affecté par la présence de sulfates. Ces résultats suggèrent que l'activité ARS extracellulaire est régulée indépendamment de la disponibilité en $SO4^{-2}$ du milieu. L'activité ARS extracellulaire du sol pourrait être régulée par des conditions environnementales mais aussi par la disponibilité en substrats organiques dans le milieu (Allison et Vitousek, 2005).
Par ailleurs, nous observons des corrélations significatives et négatives entre l'ARS extracellulaire et les UFC fonctionnelles pour les trois types de sols ($R = -0,96$, $p<0,001$; $R = 0,67$, $p<0.01$; $R = -0.79$, $p<0.001$; respectivement pour le sol nu, sous couvert de colza et d'orge). Cependant, les droites de régressions montrent une mauvaise répartition des individus (deux groupes à chaque extrémité de la droite, non montré). En conséquence, nous ne pouvons prendre en compte ces relations. Il faut remarquer que la littérature suggère fortement que les activités enzymatiques extracellulaires, telle que l'ARS, sont induites par la présence du substrat, dans le milieu. De ce fait, la synthèse de ces fractions enzymatiques est sans doute totalement découplée de l'augmentation de la taille des communautés fonctionnelles.

L'analyse des histogrammes indépendamment suggère des relations entre variables. En effet, aux valeurs plus élevées du rapport BMC/BMN correspondent les valeurs de carbone soluble également les plus élevées. Inversement, les valeurs de l'ARS totale les plus élevées semblent correspondre à celles où les sulfates prennent des valeurs les plus faibles.
Ainsi, après avoir étudié chacune des variables indépendamment, nous avons engagé une Analyse multivariée en Composantes Principales (ACP) afin de mettre en évidence les relations entre les différentes variables étudiées.

2.2. Analyses multivariées

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée afin de cerner l'évolution de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable, impliquée dans la minéralisation du S organique du sol, ceci dans les rhizosphères de deux plantes ayant des besoins en S contrastés, le colza et l'orge, en intégrant le sol non planté comme sol témoin.

Cette première ACP a porté sur l'ensemble des relevés effectués de T0 à T4, soit 52 relevés. Nous avons considéré à la fois, les variables indicatrices de la dynamique du S, telles que les l'activité ARS totale, la teneur en SO_4^{2-} mais aussi les variables indicatrices du processus de rhizodéposition. Pour ces dernières, seuls le C et N solubles du sol ont pu être considérés dans la mesure où le C et N racinaires ne concernent pas les échantillons issus des pots sans plantes (sols nus).

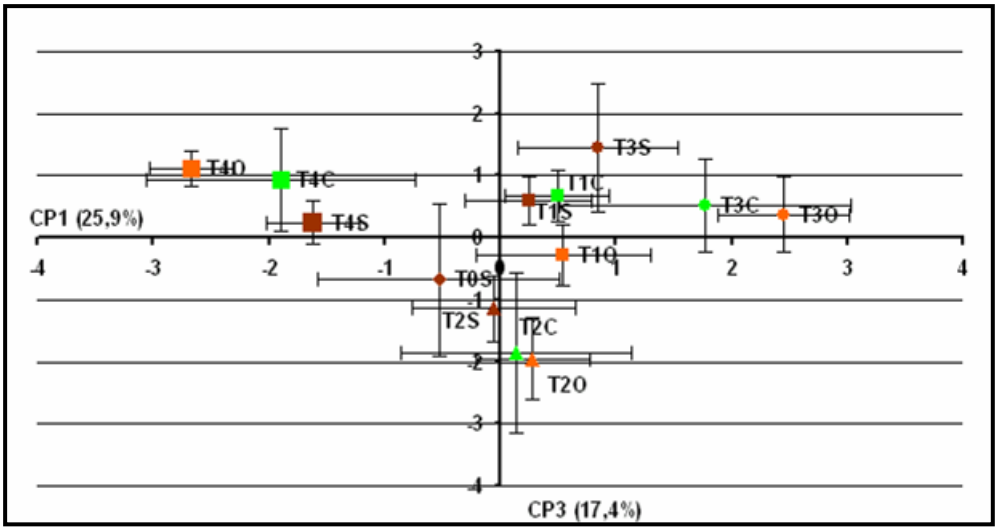


Figure 40 : Analyse en Composantes Principales des relevés réalisés sous couvert de colza, d'orge et en sol nu

Les points de prélèvements correspondent respectivement, pour le colza et l'orge, aux stades T0 : semis, T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : stades boutons séparés et courant montaison, T4 : floraison et épiaison. Des prélèvements aux mêmes dates ont été effectués pour les sols nus. Quatre répétitions par traitement et temps de prélèvement ont été réalisées. Sont représentés la moyenne des coordonnées et les intervalles de confiance

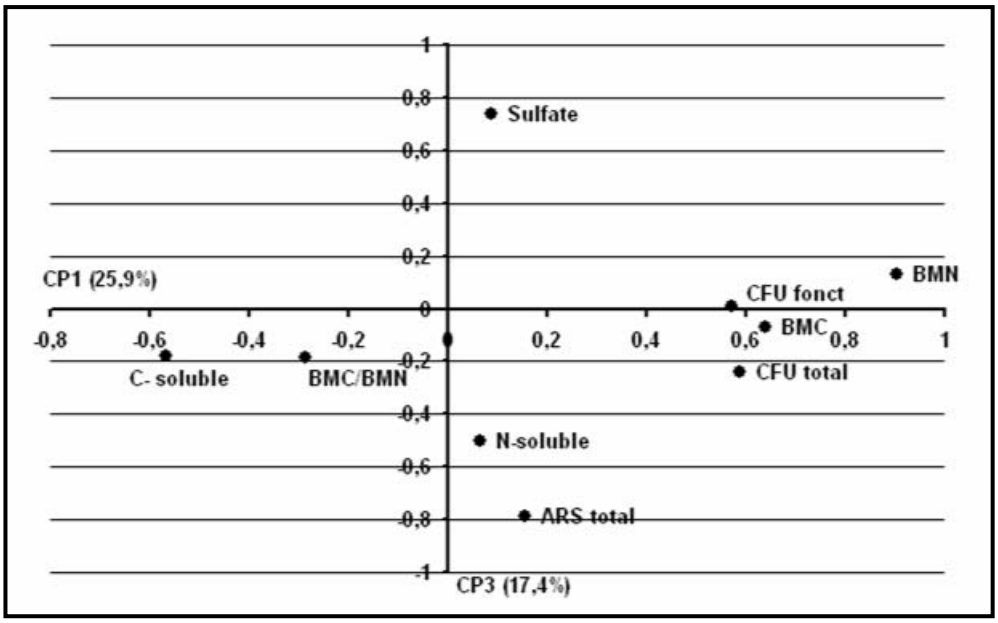


Figure 41 : Cercle de corrélation des variables explicatives dans le plan factoriel CP1-CP3

Le plan CP1-CP3 que nous avons représenté exprime 43,3 % de l'inertie totale. Ce plan a été retenu car les variables s'y discriminent mieux. L'axe 1 participe pour 25,9 % à cette inertie (Figure 40). Cet axe discrimine nettement les relevés effectués à T4 (et dans une moindre mesure, ceux réalisés à T0) de ceux faits à T3. Il ressort que les relevés réalisés à T3 se caractérisent par une taille des communautés fongiques cultivables totales et fonctionnelles la plus élevée. En outre, à ce stade, le rapport R/S calculé pour les communautés fongiques cultivables totale mais aussi fonctionnelle prend les valeurs les plus élevées (Figure 42).

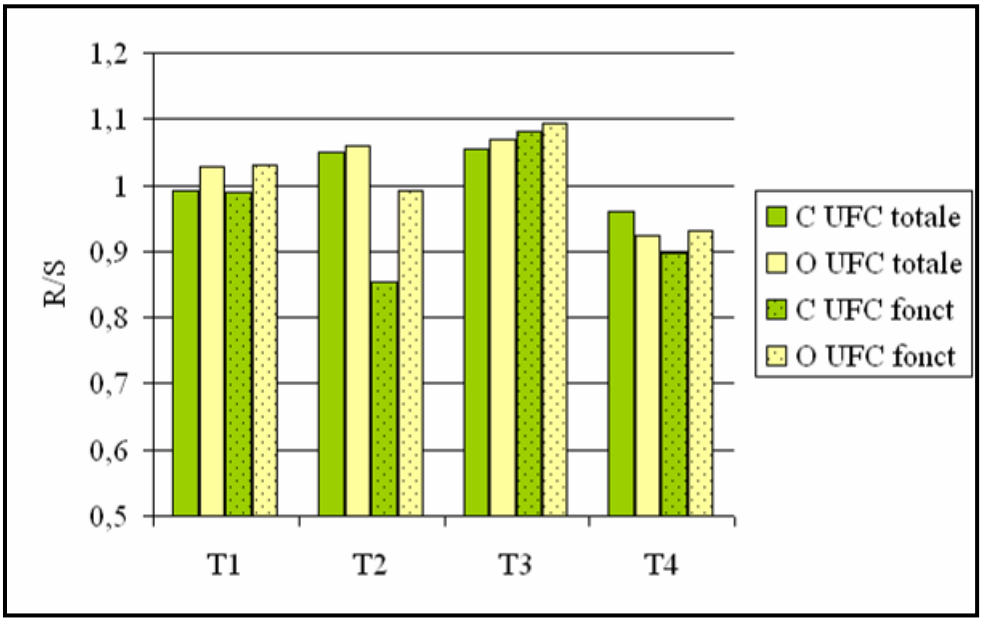


Figure 42 : Rapport R/S (rapport du nombre d'UFC g^{-1} sol sec cultivables, totales ou fonctionnelles, sur le nombre d'UFC g^{-1} sol sec en sol non rhizosphérique) de T1 à T4

Alors que ce ratio est estimé entre 10 et 20 pour les protéobactéries, il est en revanche compris entre 2 et 6 pour les champignons (Subba Rao, 1999), suggérant que les champignons sont moins « sensibles » à la rhizodéposition. Malgré les faibles valeurs que nous obtenons, nos résultats semblent cohérents avec ceux obtenus par de nombreux auteurs. En effet, comme cela a été montré par de nombreux auteurs, les stades de croissance active se caractérisent par une exsudation accrue. En effet, dans le cas du blé, Swinnen *et al.* (1994) ont estimé la variation de la rhizodéposition à partir d'un marquage au ^{14}C. Ils trouvent ainsi en moyenne 130, 310 et 70 kg de C ha^{-1} an^{-1} durant les trois périodes étudiées, à savoir, de l'émergence à l'élongation, de l'élongation au stade pâteux et du stade pâteux à la récolte. De la même façon Rivière (1960) constate que le rapport R/S est le plus important au stade montaison du blé ; ceci étant lié à une rhizodéposition plus importante à ce stade.

Ainsi, dans le cadre de notre expérimentation, au temps T3 de prélèvement, le colza est au stade boutons séparés et l'orge est en pleine montaison, ce qui correspond à des stades de croissance active, caractérisés par une rhizodéposition importante pouvant expliquer les valeurs les plus élevées de la taille des communautés fongiques cultivables totales et fonctionnelles et des rapports R/S les plus importants, même si cet effet reste relativement modéré. Nous constatons, en outre, que les échantillons de sols nus à ce même stade (T3S) se discriminent significativement de ceux sous couverts d'orge et de colza (T3O et T3C) avec

une taille des communautés fongiques totales et fonctionnelles moindre. Dans le même ordre d'idée, les points correspondant aux échantillons issus des prélèvements de sols à T4 (T4S, T4C et T4O) montrent des abscisses négatives et se caractérisent par des densités des communautés fongiques plus faibles. A ces stades tardifs (stades Floraison et Epiaison, respectivement pour le colza et l'orge), comme cela a été montré par de nombreux auteurs, la libération de C par les racines diminue généralement en fin de période végétative, en raison de la force de puits croissante des organes reproducteurs (Gregory et Atwell, 1991 ; Swinnen *et al.*, 1994).

L'axe 3, quant à lui, participe à 17,3 % de l'inertie totale. Cet axe sépare les communautés fongiques des stades de prélèvements T1 (ordonnées positives) et T2 (ordonnées négatives). Cette discrimination semble être liée à une activité ARS plus élevée aux stades Boutons accolés et début Montaison qu'aux stades Rosette et fin du Tallage, respectivement pour le colza et l'orge. De plus, et de manière corrélative, les quantités de sulfates estimées dans ces sols, sont inversement corrélées aux valeurs d'activité ARS. Cette augmentation de l'activité semblerait être liée ici davantage à une limitation des sulfates due à un prélèvement plus important par les plantes au temps T2, qu'à une augmentation de la taille de la communauté fonctionnelle, par comparaison avec le temps T1. En effet, l'activité ARS est maximale, en particulier, au stade de développement boutons du colza, stade phénologique qui coïncide avec la période où la plante à de forts besoins en S (Matula et Pechova, 2002 ; Cregut *et al.*, 2009). Ainsi, une limitation en sulfates dans l'environnement rhizosphérique pourrait avoir lieu, dès ce stade phénologique et au fur et à mesure que la saison progresse, du fait de prélèvements en sulfates, plus important par la plante (Blake-Kalff *et al.*, 2000). Cette limitation en sulfates, dans l'environnement rhizosphérique, induirait alors une stimulation de l'activité ARS microbienne pour satisfaire la demande en S des microorganismes du sol.

Enfin, nous pouvons constater également, à partir de cette Analyse en Composantes Principales, un phénomène particulier que Gunderson (2000) a défini comme étant le phénomène de résilience. Il s'agit de la capacité d'un système à retourner à son état de stabilité initial après perturbation. Cet effet a également été observé par Mougel *et al.*, (2006) sur *Medicago truncatula* cv. Jemalong J5, en conditions contrôlées. Ainsi, ce phénomène de résilience pourrait s'expliquer en partie par un apport de carbone au sol différentiel au cours du temps. En effet, les rhizodépôts, dont la composition varie au cours du temps, sont connus pour modifier la taille mais aussi la structure (diversité et abondance) des communautés microbiennes rhizosphériques (Smalla *et al.*, 2001). Or, lors de la Floraison (stade T4), les composés organiques solubles sont redirigés vers les organes reproducteurs et la part de

carbone alloué au sol diminue ainsi avec l'âge de la plante (Kuzyakov et Domanski 2000). Ainsi, l'apport de rhizodépôts au sol, moins important en fin de floraison, semble induire une diminution de la taille des communautés fongiques cultivables totales et fonctionnelles proche de celle observée lors du semis (stade T0).

Enfin, et quel que soit le temps de prélèvement, il ressort de notre étude, que l'effet temporel est majeur par rapport à l'effet couvert.

Comme nous l'avons décrit dans l'analyse variable par variable, les enzymes du sol, telle que l'ARS se composent d'une fraction intracellulaire et d'une fraction extracellulaire (Burns, 1982 ; Tabatabai, 1994 ; Klose and Tabatabai, 1999 ; Li and Sarah , 2003a ; Zwikel *et al.*, 2007). Les enzymes extracellulaires catalysent la dégradation de polymères complexes des matières organiques et sont régulées indépendamment de la croissance microbienne alors que les enzymes intracellulaires participent à l'hydrolyse de composés organiques simples et sont associés directement au métabolisme microbien (Burns, 1982 ; Sinsabaugh, 1994).

Ainsi, nous avons réalisé une autre ACP en considérant les valeurs des mesures d'activités ARS intracellulaires et extracellulaires (Figures 44 et 45), sur la base également de 52 relevés.

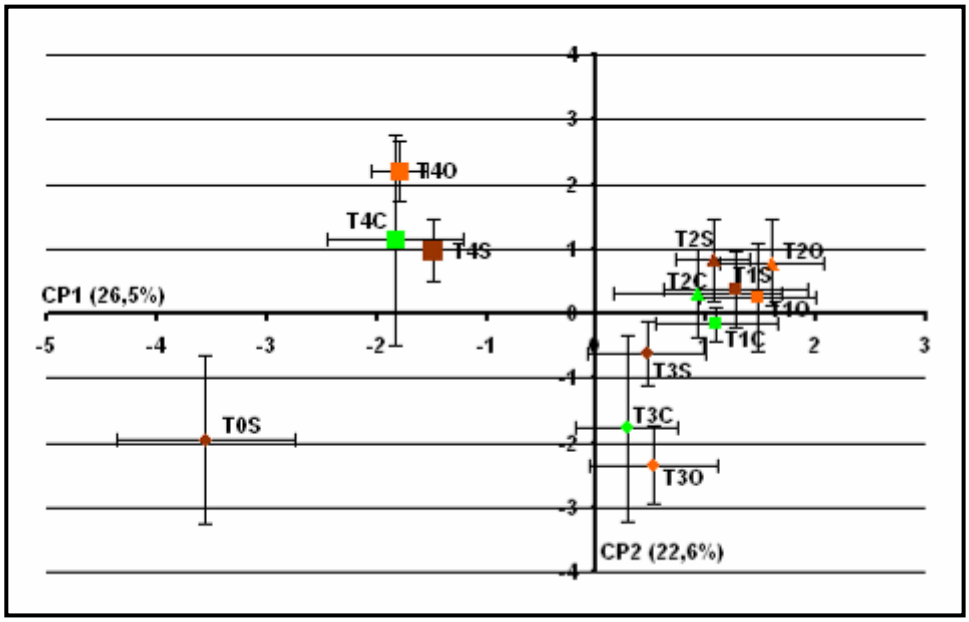


Figure 43 : Analyse en Composantes Principales des relevés réalisés sous couvert de colza, d'orge et en sol nu

Les points de prélèvements correspondent respectivement, pour le colza et l'orge, aux stades T0 : semis, T1 : rosette et fin tallage, T2 : boutons accolés et début montaison, T3 : stades boutons séparés et courant montaison, T4 : floraison et épiaison. Des prélèvements aux

mêmes dates ont été effectués pour les sols nus. Quatre répétitions par traitement et temps de prélèvement ont été réalisées. Sont représentés la moyenne des coordonnées et les intervalles de confiance

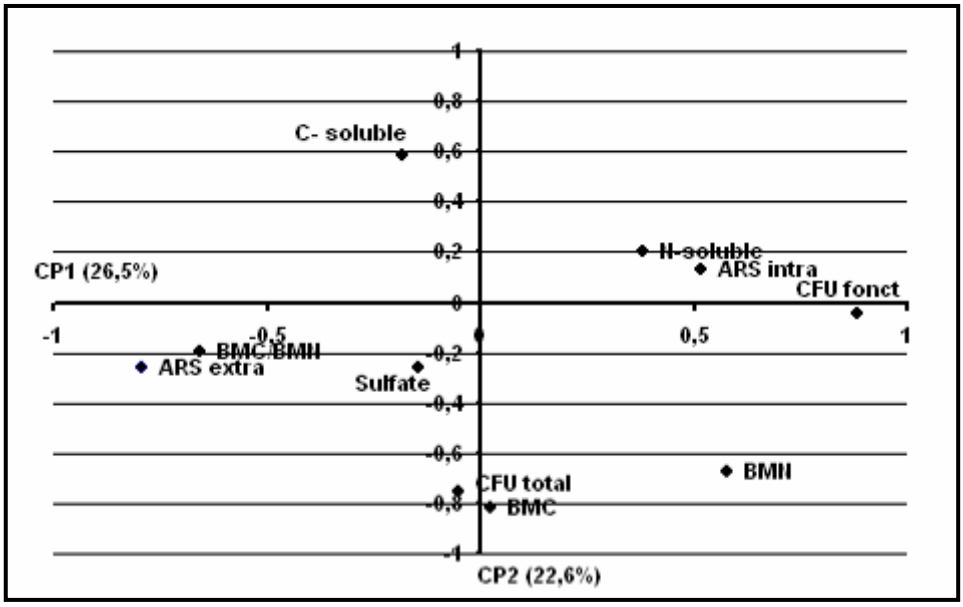


Figure 44 : Cercle de corrélation des variables explicatives dans le plan factoriel CP1-CP2

Le plan principal explique 49,1 % de l'inertie totale. L'axe 1 qui participe à 26,5 % de cette inertie discrimine les activités ARS intra (abscisses positives) et extracellulaires (abscisses négatives). Il oppose également les communautés fongiques cultivables fonctionnelles aux valeurs élevées de sulfates. En outre, seule l'activité ARS intracellulaire apparaît fortement corrélée aux UFC fonctionnelles, alors que l'activité ARS extracellulaire apparaît inversement corrélée avec ces dernières. Comme précédemment, nous observons sur l'axe 1, une opposition entre les relevés effectués aux temps T4 et T0 et ceux effectués des stades T1 à T3, ces derniers se caractérisant par une activité intracellulaire et une taille de la communauté fongique fonctionnelle plus importante. A l'inverse, les stades précoces (stade T0 correspondant au semis) ainsi que les stades tardifs reproducteurs se caractérisent par une activité ARS extracellulaire qui domine corrélativement à un rapport des biomasses C et N élevé. Il semblerait donc, qu'aux stades végétatifs, stades durant lesquels les plantes ont des besoins importants en SO_4^{2-}, les communautés microbiennes présentent une activité ARS principalement intracellulaire, leur permettant de se pourvoir en S. Ceci renforce l'hypothèse émise lors de l'analyse « variable par variable », d'une compétition entre la plante et les communautés fongiques fonctionnelles pour l'acquisition de S. Ainsi, l'activité ARS

intracellulaire constituerait un indicateur microbien, de l'immobilisation du SO_4^{2-} dans des conditions limitantes en cet élément. Aux stades végétatifs, la libération de C organique, *via* les phénomènes de rhizodéposition, est connue pour ne pas être limitante et permettrait, au contraire, un développement notable de la taille des communautés dont les fonctionnelles ainsi que de leur activité intracellulaire. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces dernières auront de forts besoin en S, renforcés par la compétition qu'exerce le couvert végétal. Il nous est possible d'émettre une autre hypothèse expliquant les valeurs élevées de l'activité ARS intracellulaire aux stades végétatifs. En effet, il est possible que la rhizodépostion stimule la taille et l'activité des bactéries et qu'en conséquence, s'instaure une compétition pour le S entre les plantes, les bactéries et les champignons, ce qui se traduirait donc par une stimulation de l'ARS intracellulaire fongique.
Ainsi, quelle que soit l'hypothèse formulée, il ressort que durant cette phase de croissance active, les valeurs d'activité ARS liées à la biomasse microbienne (ARS intracellulaire) représentent plus de 50% des activités ARS totales (de 85 à 88%), comme nous l'avions constaté précédemment. Ceci suggère, comme l'ont noté Li et Sarah (2003), que l'activité intracellulaire, durant cette période, représente la part principale de l'activité totale.

A l'inverse, l'activité ARS extracellulaire prend des valeurs élevées aux stades tardifs (T4). Ceci pourrait résulter d'une adsorption cumulée de cette activité sur les composants minéraux tels les argiles et/ou des colloïdes humiques du sol, qui agissent comme protecteur de cette enzyme (McLaren ,1975 ; Deng et Tabatabai, 1997 ; Klose et Tabatabai, 1999 ; Elsgaard *et al.,* 2003). De plus, leur synthèse dépendra de la disponibilité en SO_4^{2-} et/ou en substrats organiques dans le milieu, mais comme pour d'autres enzymes du sol pour lesquelles les paramètres abiotiques modulent leur activité (Allison et Vitousek, 2005 ; Geisseler et Horwath, 2008), l'activité ARS extracellulaire est régulée par les conditions environnementales, des paramètres abiotiques tels la température (Li et Sarah, 2003) et/ou l'humidité du sol (Steinberger *et al*., 1995 ; Alon et Steinberger, 1999).

Ces stades tardifs se caractérisent, en outre, par un rapport des biomasses C/N significativement les plus importants (valeur moyenne de 11, tous sols confondus) ce qui signifie, comme de nombreux auteurs l'ont constaté, une biomasse fongique dominante (Joergensen *et al.,* 1995 ; Stark *et al.,* 2007). Les plus faibles ratios C/N observés dans les échantillons de sol durant la période de végétation (valeurs moyenne 8,3 à 10,4) pourraient résulter d'un établissement davantage limités des communautés fongiques comparativement

aux stades tardifs ; ces sols ayant été manipulés (tamisage, conditionnement…) ce qui peut détruire les hyphes (Stark *et al.*, 2007). Mais comme le mentionne ces auteurs, cet effet négatif sur les communautés fongiques n'est que temporaire et le rapport C/N tant à retrouver des valeurs élevées en fin d'expérimentation.

2.3. Corrélations entre variables

Nous avons réalisé 4 matrices de corrélation différentes.
La première matrice, «matrice de corrélation totale » intègre l'ensemble des variables mesurées entre T0 et T4, pour les trois types de sols. Certaines de ces variables, tel que le C soluble racinaire, ne concernent que les couverts végétaux. En conséquence, selon les variables considérées, certaines corrélations seront basées sur 52 individus, d'autres sur 32 (absence de données pour le sol nu). Les 3 autres matrices de corrélation s'intéressent aux 3 types de sol, considérés individuellement. Nous distinguerons donc une matrice « colza », une matrice « orge » et une matrice « sol nu », chacune basée sur 16 individus, de T1 à T4.
Ces matrices de corrélation vont nous permettent d'estimer le niveau de significativité des corrélations entre variables, appréhendé par le coefficient de corrélation R.

2.3.1. Matrice de corrélation totale

Globalement, nous constatons de nombreuses corrélations significatives positives ou négatives entre les variables mesurées (Tableau 28).
Nous observons des corrélations significatives et positives entre les biomasses végétales et le C racinaire (R=0,55, $p<0,001$), les biomasses végétales et le C soluble du sol (R=0,51, $p<0,01$) et entre le C racinaire et le C hydrosoluble (R=0,44, $p<0,01$). Ce C hydrosoluble dérive de la biomasse microbienne et des exsudats racinaires (Ghani *et al*., 1993). Ainsi, ces observations confirment celles Dilkes *et al*. (2004) et Vong *et al*. (2007) qui ont montré une interdépendance entre les concentrations en C et N dans les racines et celles dans le sol. En effet, selon ces auteurs, le C exsudé est fortement couplé au C hydrosoluble des racines. Aucune corrélation positive entre les densités de la communauté fongique totale et fonctionnelle avec C soluble racinaire et le C soluble du sol n'a été mise en évidence. Par contre, nous avons mis en évidence des corrélations négatives entre le C hydrosoluble et les densités des communautés fongiques totales cultivables (R=-0,37, $p<0,01$) et les communautés fongiques fonctionnelles (R=-0,23, NS). Ces résultats renforcent les premières

observations effectuées dans cette analyse et suggèrent en conséquence que les communautés fongiques notamment fonctionnelles ne sont pas influencées par la rhizodéposition.

Tableau 28 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables sous colza, orge et/ou sol nu

	ARS totale	ARS totale spécifique	ARS extra	ARS extra spécifique	ARS intra	ARS intra spécifique	CFU total log	CFU fonct log	Sulfate	BMC	BMN	BMC/BMN	C-soluble	N-soluble	C rac/g rac	N rac/g rac	Matière sèche total	Matière sèche PR	Matière sèche PA
ARS totale	1,00																		
ARS totale spécifique	0,21	1,00																	
ARS extra	-0,45***	0,45**	1,00																
ARS extra spécifique	0,10	0,97***	0,53***	1,00															
ARS intra	0,98***	0,08	-0,63***	-0,03	1,00														
ARS intra spécifique	0,27	0,98***	0,38**	0,92***	0,15	1,00													
CFU total log	-0,09	0,34*	0,30*	0,29*	-0,02	0,37**	1,00												
CFU fonct log	0,07	-0,72***	-0,62***	-0,73***	0,20	-0,69***	-0,05	1,00											
Sulfate	-0,39**	0,18	0,03	0,24	-0,32*	0,15	-0,17	-0,04	1,00										
BMC	-0,21	0,45**	0,06	0,42**	-0,16	0,45***	0,48***	-0,02	0,25	1,00									
BMN	-0,06	-0,19	-0,16	-0,22	0,07	-0,16	0,39**	0,53***	0,13	0,56***	1,00								
BMC/BMN	0,08	0,66***	0,31*	0,68***	0,01	0,63***	0,18	-0,61***	0,10	0,41**	-0,48***	1,00							
C-soluble	0,06	-0,06	0,05	-0,05	0,06	-0,08	-0,37**	-0,23	-0,11	-0,25	-0,29*	-0,02	1,00						
N-soluble	0,22	-0,26	-0,29*	-0,29*	0,26	-0,22	-0,02	0,28*	-0,15	-0,04	-0,03	-0,03	0,07	1,00					
C rac/g rac	*-0,06*	*0,04*	*0,35**	*0,37**	*-0,11*	*-0,14*	*-0,17*	*-0,26*	*0,00*	*-0,49*	*-0,29*	*-0,28*	*0,44***	*-0,12*	*1,00*				
N rac/g rac	*-0,25*	*0,15*	*0,43***	*0,46***	*-0,28*	*-0,07*	*-0,20*	*-0,31*	*0,18*	*-0,38*	*-0,20*	*-0,26*	*0,18*	*-0,31*	*0,70****	*1,00*			
Masse sèche totale	*-0,58****	*0,32*	*0,72****	*0,79****	*-0,63****	*-0,06*	*-0,39**	*-0,74****	*0,11*	*-0,48***	*-0,45***	*-0,08*	*0,51***	*-0,42**	*0,55****	*0,49***	*1,00*		
Masse sèche PR	*-0,07*	*0,10*	*0,42***	*0,14*	*-0,18*	*0,05*	*0,39**	*-0,19*	*-0,37**	*-0,04*	*0,28*	*-0,37**	*0,12*	*-0,02*	*0,56****	*0,34*	*0,35**	*1,00*	
Masse sèche PA	*-0,59****	*0,32*	*0,69****	*0,80****	*-0,63****	*-0,06*	*-0,43**	*-0,75****	*0,15*	*-0,49***	*-0,49***	*-0,04*	*0,51***	*-0,43**	*0,51***	*0,48***	*0,99****	*0,26*	*1,00*

* significatif à p = 0.05; ** significatif à p = 0.01; *** significatif à p = 0.001

0,123 : n=52 de T0 à T4

0,189 : n=32 de T1 à T4

Les activités ARS totale et ARS intracellulaire apparaissent significativement et inversement corrélées aux teneurs en sulfates (respectivement R= -0,39, *p<0,01* et R=-0,32, *p<0,01*), et également très significativement inversement corrélées aux masses sèches des plantes (respectivement R=-0,58 *p<0,001* et R=-0,63, *p<0,001*). Ces résultats confortent les résultats précédents : à de faibles teneurs en SO_4^{2-} correspondent de fortes activités ARS intracellulaires, corrélativement à de faibles biomasses végétales. Il semblerait donc bien qu'en conditions limitantes en SO_4^{2-}, une compétition pour cet élément s'établisse entre la biomasse microbienne et le couvert végétal, pour l'acquisition de S. L'activité ARS intracellulaire apparaît donc comme un indicateur d'immobilisation de S.

Enfin, nous ne notons aucune corrélation significative entre les UFC fonctionnelles et les activités ARS, hormis un lien inverse avec l'ARS extracellulaire (R=-0,62, *p<0,001*), de même qu'entre les UFC fonctionnelles et les teneurs en sulfates (R=-0,04, NS).

2.3.2. Matrice de corrélation « sol »

Concernant les prélèvements effectués en sols nus, nos résultats ont permis de mettre en évidence une corrélation significative entre les UFC fonctionnelles et la BMC (R=0,58, *p<0,05*) ainsi qu'une corrélation positive significative entre la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable et l'ARS totale (R=0,51, *p<0,05*) ou l'ARS intracellulaire (R=0,59, *p<0,05*) (Tableau 29). Ceci pourrait résulter du fait que les communautés fongiques fonctionnelles sont présentes et actives dans les échantillons de sol et/ou que la fraction microbienne impliquée dans cette activité correspond davantage à la fraction fongique plutôt que bactérienne. Cette dernière hypothèse semble peu probable dans le cas des sols nus, dans la mesure où nous n'observons pas d'une part, de corrélation entre le rapport BMC/BMN et les activités ARS et d'autre part, une corrélation inverse entre le rapport des biomasses et les UFC fonctionnelles (R=-0,53, *p<0,05*). Ceci semblerait d'ailleurs confirmer par la valeur du coefficient de corrélation que nous trouvons pour la relation entre l'ARS totale et les UFC fongiques fonctionnelles. Ce coefficient prend la valeur de 0,51 ce qui pourrait traduire que la mesure de l'activité ARS effectuée n'est que potentielle et englobe à la fois l'activité liée à la microflore bactérienne et fongique mais aussi l'activité résiduelle extracellulaire (stabilisée dans le sol). Malgré tout, ce résultat confirme l'implication de la fraction fongique cultivable

Tableau 29 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées en sol nu (T1 à T4, n=16)

	ARS totale	ARS totale spécifique	ARS extra	ARS extra spécifique	ARS intra	ARS intra spécifique	CFU total log	CFU fonct log	Sulfate	BMC	BMN	BMC/BMN	C-soluble	N-soluble
ARS totale	1,00													
ARS totale spécifique	0,03	1,00												
ARS extra	-0,58*	0,49	1,00											
ARS extra spécifique	-0,44	0,84***	0,59*	1,00										
ARS intra	0,99***	-0,06	-0,69**	-0,50*	1,00									
ARS intra spécifique	0,69**	0,62**	-0,19	0,26	0,64**	1,00								
CFU total log	-0,65**	0,08	0,51*	0,35	-0,66**	-0,35	1,00							
CFU fonct log	0,51*	-0,77***	-0,75***	-0,92***	0,59*	-0,17	-0,43	1,00						
Sulfate	-0,51*	-0,30	-0,05	0,10	-0,45	-0,42	0,30	0,00	1,00					
BMC	0,58*	-0,44	-0,71**	-0,54*	0,64**	0,29	-0,20	0,58*	0,08	1,00				
BMN	0,24	-0,54*	-0,42	-0,50*	0,29	-0,04	-0,14	0,58*	0,34	0,72***	1,00			
BMC/BMN	-0,19	0,41	0,29	0,38	-0,22	0,05	0,18	-0,53*	-0,28	-0,48	-0,92	1,00		
C-soluble	0,45	0,17	-0,32	0,01	0,46	0,63**	-0,29	-0,06	-0,17	0,35	-0,11	0,30	1,00	
N-soluble	-0,16	0,39	0,33	0,44	-0,20	0,08	0,25	-0,47	-0,08	-0,31	-0,53*	0,55*	0,37	1,00

* significatif à p = 0.05; ** significatif à p = 0.01; *** significatif à p = 0.001

du sol dans la minéralisation du soufre organique Ainsi, même si les communautés fongiques fonctionnelles cultivables ne représentent probablement qu'une faible part de la communauté microbienne totale, mais aussi de la communauté fongique fonctionnelle totale, leurs densités, dans le sol nu, apparaissent bien corrélée à l'activité ARS potentielle totale mesurée sur les échantillons de sol.

Par ailleurs, l'activité ARS totale apparaît inversement corrélée aux teneurs en sulfates (R=-0,51, *p<0,05*). Ces résultats semblent cohérents avec ceux de la littérature qui mettent en avant que la synthèse de l'ARS semble être induite pour répondre aux besoins en S (Biel *et al*., 1995 ; Kertesz, 1999). Ainsi, la biomasse microbienne, en situation limitante en S, montre une activité ARS, en particulier intracellulaire élevée (corrélation significative entre BMC et ARS intracellulaire avec R=0,64, *p<0,001*) et cette activité, comme cela a été souligné par de nombreux auteurs (Dedourge *et al*., 2004 ; Vong *et al*., 2003) est fortement impliquée dans l'immobilisation du S.

2.3.3. Matrice de corrélation « orge »

Concernant l'orge (Tableau 30), l'analyse de la matrice de corrélation entre variables met en évidence une corrélation significative positive entre la taille de la communauté fongique fonctionnelle et l'activité ARS intracellulaire (R=0,49, *p<0,05*). De plus, nous notons des corrélations négatives et significatives entre les activités ARS totale et intracellulaire et les teneurs en sulfates du sol (respectivement R=-0,65, *p<0,01* et R=-0,61, *p<0,05*). Ainsi, l'activité ARS apparaît être un bon indicateur des processus d'immobilisation des sulfates (Castellano et Dick, 1991 ; Vong *et al*., 2003).

De plus, il ressort que ces activités ARS totale et intracellulaire sont corrélées négativement avec les biomasses végétales (R=0,71, *p<0,01* et R=0,72, *p<0,01*) ; aux stades tardifs, la communauté microbienne semble moins active.

De même, nous notons un lien significatif négatif entre les UFC totales et fonctionnelles et les biomasses végétales (respectivement R=-0,54, *p<0,05* et R=-0,89, *p<0,001*) ainsi qu'entre les densités fongiques (totales et fonctionnelles) et le C racinaire (respectivement R=-0,53, *p<0,05* et R=-0,63, *p<0,01*).

Tableau 30 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées sous orge (T1 à T4, n=16)

	ARS totale	ARS totale spécifique	ARS extra	ARS extra spécifique	ARS intra	ARS intra spécifique	CFU total log	CFU fonct log	Sulfate	BMC	BMN	BMC/BMN	C-soluble	N-soluble	C rac/g rac	N rac/g rac	Matière sec total	Matière sèche PR	Matière sèche PA
ARS totale	1,00																		
ARS totale spécifique	-0,31	1,00																	
ARS extra	-0,82***	0,36	1,00																
ARS extra spécifique	-0,52*	0,96***	0,52*	1,00															
ARS intra	0,99***	-0,32	-0,88***	-0,52*	1,00														
ARS intra spécifique	0,13	0,86***	0,00	0,67**	0,12	1,00													
CFU total log	0,18	-0,81***	-0,05	-0,77***	0,13	-0,70**	1,00												
CFU fonct log	0,47	-0,91***	-0,56*	-0,91***	0,49*	-0,72**	0,69**	1,00											
Sulfate	-0,65**	0,28	0,35	0,47	-0,61*	-0,10	-0,35	-0,35	1,00										
BMC	-0,08	-0,61*	0,15	-0,55*	-0,13	-0,60*	0,75***	0,56*	-0,19	1,00									
BMN	-0,05	-0,63**	0,16	-0,56*	-0,11	-0,61*	0,88***	0,59*	-0,28	0,84***	1,00								
BMC/BMN	-0,08	0,04	-0,01	0,03	-0,06	0,03	-0,28	-0,09	0,22	0,20	-0,34	1,00							
C-soluble	-0,17	0,53*	0,19	0,54*	-0,17	0,39	-0,51*	-0,64**	0,13	-0,46	-0,52*	0,13	1,00						
N-soluble	0,32	-0,23	-0,39	-0,31	0,34	-0,03	0,25	0,26	-0,5*	0,18	0,17	-0,01	-0,08	1,00					
C rac/g rac	0,05	0,57*	0,06	0,54*	0,04	0,51*	-0,53*	-0,63**	0,21	-0,67**	-0,71**	0,07	0,51*	-0,37	1,00				
N rac/g rac	-0,37	0,66**	0,32	0,72**	-0,34	0,42	-0,65**	-0,54*	0,54*	-0,45	-0,49	0,08	0,16	-0,59*	0,53*	1,00			
Matière sèche totale	-0,71**	0,73**	0,70**	0,81***	-0,72**	0,41	-0,54*	-0,89***	0,50*	-0,41	-0,43	0,07	0,66**	-0,42	0,50*	0,47	1,00		
Matière sèche PR	-0,05	0,05	0,36	-0,02	-0,12	0,15	0,34	-0,17	-0,48	0,28	0,38	-0,20	0,05	0,15	0,08	-0,13	0,08	1,00	
Matière sèche PA	-0,71**	0,73**	0,67**	0,82***	-0,71**	0,39	-0,57*	0,88***	0,54*	-0,44	-0,47	0,09	0,66**	-0,43	0,50*	0,48	1,00	-0,01	1,00

* significatif à p = 0.05; ** significatif à p = 0.01; *** significatif à p = 0.001

Ainsi, à des stades de développement avancés, bien que les biomasses végétales soient plus importantes, les plantes libèrent une faible quantité d'exsudats racinaires, ce qui a pour conséquence, un faible développement microbien et une activité moindre. Nous aurions pu alors nous attendre à observer comme Sparling *et al.* (1998), une corrélation entre la BMC et le C-soluble du sol, ce qui n'est pas le cas. En effet, la relation entre BMC et C soluble est négative (mais non significative) et dans le même ordre d'idée, nous trouvons une corrélation négative entre les UFC totales et fonctionnelles et le C soluble (R=-0,51, *p<0,05* et R=-0,64, *p<0,01*). Ceci suggèrerait que d'autres pools carbonés pourraient être utilisés par la microflore et laisserait aussi supposer, sur la base que ce carbone correspond en partie aux exsudats racinaires, que ces derniers ne sont pas utilisés par la microflore fongique cultivable pour assurer son développement, ce qui contredit les travaux de Franklin et Mills (2003) pour lesquels la disponibilité en substrats nutritifs est considérée comme un des déterminants importants de l'activité et de la biomasse microbienne.

2.3.4. Matrice de corrélation « colza »

L'analyse de la matrice de corrélation pour le traitement « colza » (Tableau 31) a permis de mettre en évidence une corrélation significative négative entre les UFC fongiques fonctionnelles et la matière sèche totale des plants de colza (R=-0,72, *p<0,01*). En outre, nous notons également une corrélation négative entre la taille de la communauté fonctionnelle et le carbone racinaire (R=-0,67, *p<0,01*). Ceci pourrait être expliqué par le fait que, aux derniers stades de prélèvements, la défoliation du colza, impliquant une réduction de la surface photosynthétique, entrainerait donc une rhizodéposition carbonée moindre, bien que les siliques déjà présentes photosynthétisent. Mais ces photoassimilats sont redirigés vers les organes reproducteurs puits et par conséquent, la translocation du carbone aux racines décroit généralement lorsque la saison progresse (Jensen, 1993). Ainsi, au cours son développement la plante montrera une biomasse totale importante, mais la quantité de rhizodépôts libérée dans le sol devient limitante. Par conséquent, la communauté fongique fonctionnelle n'augmente pas en taille. De plus, il est connu que lors de stades phénologiques avancés, une part des racines des plants de colza meurt de façon notable (Balesdent *et al.*, 2001) et que dans le cas du colza, cela se traduit par la libération dans le sol de composés biocides : les glucosinolates.

Tableau 31 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées sous colza (T1 à T4, n=16)

	ARS totale	ARS totale spécifique	ARS extra	ARS extra spécifique	ARS intra	ARS intra spécifique	CFU total log	CFU fonct log	Sulfate	BMC	BMN	BMC/BMN	C-soluble	N-soluble	C rac/g rac	N rac/g rac	Matière sèche total	Matière sèche PR	Matière sèche PA
ARS totale	1,00																		
ARS totale spécifique	0,34	1,00																	
ARS extra	-0,58*	-0,22	1,00																
ARS extra spécifique	-0,36	0,40	0,54*	1,00															
ARS intra	0,98***	0,35	-0,72**	-0,39	1,00														
ARS intra spécifique	0,52*	0,91***	-0,47	-0,02	0,55*	1,00													
CFU total log	0,07	-0,14	0,18	-0,37	-0,02	0,01	1,00												
CFU fonct log	0,01	-0,78***	-0,31	-0,78***	0,05	-0,50*	0,32	1,00											
Sulfate	-0,19	-0,18	-0,38	-0,22	-0,05	-0,10	-0,36	0,31	1,00										
BMC	0,14	-0,23	-0,32	-0,39	0,18	-0,07	0,26	0,48	0,51*	1,00									
BMN	0,02	-0,27	-0,12	-0,55*	0,01	-0,05	0,62*	0,57*	0,32	0,75***	1,00								
BMC/BMN	0,19	0,07	-0,28	0,21	0,25	-0,02	-0,34	-0,06	0,29	0,58*	-0,06	1,00							
C-soluble	0,10	0,30	0,07	0,43	0,10	0,15	-0,36	-0,48	-0,33	-0,28	-0,59*	0,33	1,00						
N-soluble	0,56*	-0,07	-0,33	-0,35	0,55*	0,08	-0,06	0,28	-0,04	0,33	0,10	0,32	0,10	1,00					
C rac/g rac	-0,49	0,27	0,75***	0,80***	-0,56*	-0,06	-0,03	-0,67**	-0,24	-0,41	-0,29	-0,19	0,18	-0,36	1,00				
N rac/g rac	-0,29	0,12	0,52*	0,43	-0,34	-0,06	0,27	-0,36	-0,13	-0,25	-0,01	-0,33	-0,02	-0,30	0,82	1,00			
Matière sèche totale	-0,52*	0,24	0,72**	0,85***	-0,59*	-0,12	-0,23	-0,72**	-0,26	-0,51*	-0,51*	-0,11	0,23	-0,49	0,86	0,49	1,00		
Matière sèche PR	-0,24	0,37	0,65**	0,39	-0,36	0,22	0,49	-0,50*	-0,41	-0,12	0,17	-0,32	-0,06	-0,28	0,66	0,53*	0,58*	1,00	
Matière sèche PA	-0,53*	0,22	0,70**	0,86***	-0,58*	-0,14	-0,29	-0,71**	-0,23	-0,53*	-0,55*	-0,09	0,24	-0,49	0,84	0,46	1,00	0,52*	1,00

* significatif à p = 0.05; ** significatif à p = 0.01; *** significatif à p = 0.001

En effet, les glucosinolates sont des composés glucidiques soufrés et azotés retrouvés fréquemment chez l'ordre des Capparales et en particulier chez la famille des Brassicacées (Peterson *et al*., 2002). Ils jouent un rôle dans la résistance des plantes aux ravageurs et aux agents pathogènes (Grubb *et al*., 2006). Leurs produits de dégradation ont également un rôle biologique. Parmi ces produits, les isothiocyanates ont, en effet, les propriétés biocides les plus efficaces (Halkier *et al*., 2006).
En revanche, nous constatons l'absence de corrélation les activités ARS et UFC, de même qu'entre les activités ARS et les teneurs en sulfates. Il se pourrait que les microorganismes oxydant le S sont prédominants dans la rhizosphère de colza (Grayston et Germida, 1991) et que ces mécanismes oxydatifs libèrent des protons acidifiant le micro-environnement autour des racines. Cette baisse de pH dans la rhizosphère de colza inhiberait alors l'activité microbienne (McKenzie *et al*., 1995) dans la mesure où l'activité ARS est connue pour être positivement corrélée avec le pH du sol (Ekenler et Tabatabai, 2003) et que ce paramètre conditionne de manière aussi important que la disponibilité en C et N, la taille et l'activité de la biomasse microbienne (Morris, 1999; Franklin et Mills, 2003).

Les objectifs de ce chapitre étaient d'approfondir nos connaissances sur le lien éventuel entre la plante, *via* ses rhizodépôts, et la communauté fongique fonctionnelle tellurique impliquée dans la minéralisation du S organique.
Il nous importait de vérifier 1°) si le niveau d'activité ARS dans la rhizosphère diffèrerait en fonction du type de plante, 2°) si l'activité ARS pouvait être modulée au cours des différents stades phénologiques des plantes, 3°) si ces modifications pouvaient résulter de changements dans la taille et la structure et/ou l'activité des communautés microbiennes possédant l'activité ARS.

Nous avons mis en évidence une corrélation positive et significative entre le carbone racinaire et le carbone hydrosoluble du sol, ce qui conforte les résultats obtenus par ailleurs et montre que le C exsudé est fortement couplé au C hydrosoluble des racines. Ainsi, le C des racines pourrait être utilisé comme indicateur de la rhizodéposition.
Nous avons observé, qu'aux stades végétatifs des plantes caractérisés par une forte rhizodéposition, les densités de la communauté fongique totale cultivable sont les plus importantes. Ainsi, cette communauté est influencée par la rhizodéposition. Par contre, cet effet rhizosphère est beaucoup moins marqué, voire absent, sur la communauté fongique fonctionnelle. Ce résultat suggère que les communautés fonctionnelles, en

particulier sous couvert de colza, ne répondent pas à la rhizodéposition, en tout cas par rapport à l'apport de C. Mais, comme nous l'avons souligné précédemment, nous nous sommes intéressés qu'à la fraction cultivable de cette communauté et cette expérience a été réalisée en conditions contrôlées.

Nous avons par ailleurs mis en évidence une corrélation négative entre les UFC fonctionnelles et le C soluble. Ceci suggèrerait que d'autres pools carbonés pourraient être utilisés par la microflore.

Concernant l'activité arylsulfatase, il ressort que l'activité ARS intracellulaire est la fraction dominante lors des stades végétatifs des plantes, ce qui suggèrerait, en conséquence, que les communautés microbiennes possédant cette activité pourraient être en compétition avec les plantes pour l'acquisition du S, du moins à ces stades. Ceci semble être confirmé par les résultats que nous avons obtenus concernant l'évolution de la production nette en sulfates. Il ressort, en effet, que les stades végétatifs sont marqués par une forte immobilisation des sulfates qui apparaît corrélée à une activité ARS nette intracellulaire importante. Ainsi, l'activité ARS intracellulaire et l'immobilisation des sulfates sont étroitement liées. La fraction extracellulaire nous est apparue plus stable, quel que soit le couvert végétal et pourrait donc jouer un rôle dans la mise à disposition d'éléments nutritifs tels les sulfates lors de conditions défavorables pour l'expression de l'ARS intracellulaire.

Enfin, par des analyses multivariées et l'établissement de matrices de corrélation, nous avons tenté d'avoir une vision plus globale et intégrative de ces phénomènes. Ces analyses nous ont permis de confirmer certains résultats obtenus précédemment, comme l'interdépendance entre les concentrations en C dans les racines et celles dans le sol et l'absence de corrélation entre les densités de la communauté fongique fonctionnelle avec le C soluble racinaire et le C soluble du sol. Les communautés fongiques fonctionnelles ne sont pas, dans nos conditions expérimentales, influencées par la rhizodéposition. Nous confirmons également que les activités ARS totale et ARS intracellulaire sont significativement et inversement corrélées aux teneurs en sulfates et qu'en conditions limitantes en SO_4^{2-}, une compétition pour cet élément s'établit entre la biomasse microbienne et le couvert végétal, pour l'acquisition de S. L'activité ARS intracellulaire apparaît donc bien comme un indicateur d'immobilisation de S.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Le soufre (S), 4^{ième} élément majeur pour les plantes, joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des protéines. Cet élément contribue en conséquence significativement à l'élaboration des rendements et à la qualité technologique des récoltes, notamment chez les céréales et les crucifères. De plus, le S est un constituant de métabolites tels que le glutathion ou les glucosinolates (chez les crucifères) qui interviennent *i)* dans la résistance des plantes vis-à-vis de stress oxydatifs ou d'agents pathogènes racinaires ou foliaires, *ii)* en santé humaine, de par leur propriété anti-cancérogènes. Enfin, S interagit avec l'azote (N) en favorisant l'assimilation et la remobilisation de cet élément. N non valorisé, du fait de limitations en S, peut conduire à l'émission de N_2O atmosphérique et à la lixiviation de nitrates dans les ressources en eau.

Actuellement, en Europe, du fait de la réduction des dépositions atmosphériques depuis une quinzaine d'années, S est devenu l'un des éléments les plus limitants de la production agricole (Zhao *et al*., 2002). Dans les sols, le S assimilable par la plante se trouve sous forme de sulfates qui constituent une forme très minoritaire de cet élément. De plus, les sulfates sont des éléments très mobiles et en conséquence, facilement lessivables. Ceci peut conduire à l'apparition de carences au niveau des cultures. Actuellement, un apport systématique de S minéral est réalisé sur colza pour prévenir les carences susceptibles de diminuer le rendement (Merrien, 1996). Dans le cas du blé tendre, l'apport systématique n'est pas toujours rentable (Bouthier et Danjou, 2009) mais permet cependant d'améliorer la qualité technologique du grain (Zhao *et al*., 1999). Ainsi, afin d'optimiser les productions agricoles et de préserver les ressources naturelles (interaction N/S), une bonne maîtrise de la fertilisation soufrée sur colza et céréales est nécessaire. Actuellement, faute d'appliquer un bilan prévisionnel, les règles de décision de la fertilisation soufrée restent cependant encore très empiriques (Bouthier *et al*., 2007). Une meilleure compréhension de la dynamique de S dans les sols pourrait contribuer à améliorer la nutrition soufrée des cultures.

Dans les sols, le S dont les teneurs varient entre 200 et 1200kg/ha, est, au même titre que N, présent très majoritairement sous des formes organiques non directement utilisables par les

plantes. L'intervention d'une microflore, hétérotrophe pour le C, est donc essentielle pour assurer la minéralisation de ces fractions organiques en sulfates, potentiellement disponibles pour la plante. Les estimations actuelles du taux de minéralisation de la réserve organique sont comprises entre 1,7 et 3,1%. Ceci représente entre 10 et 40 kg de S-sulfates/ha/an, quantités suffisantes pour couvrir théoriquement une grande partie des besoins des cultures. Cependant, le taux de minéralisation de la matière organique (MO) du sol est étroitement dépendant de facteurs tels que la texture et le pH du sol, la température, l'humidité… qui conditionnent l'activité microbienne. Ce taux de minéralisation est donc très variable selon les conditions pédoclimatiques. En conséquence, un taux de minéralisation trop faible et/ou une immobilisation importante dans la biomasse microbienne peuvent être à l'origine d'une disponibilité en sulfates limitée à la reprise de végétation. Dans ce contexte, un meilleur pilotage de la fertilisation S nécessite de comprendre la dynamique de cet élément dans les sols et en particulier de pouvoir estimer l'offre du sol en S, à la reprise de végétation au printemps, et d'identifier les déterminants biotiques et abiotiques de celle-ci. En effet, même si l'apport d'engrais minéraux permet de limiter les carences au cours de la saison, il n'influence que peu le cycle de S des sols, ce qui soulève le problème à long terme du maintien de la fertilité des agrosystèmes (Bünemann *et al*., 2006). Concernant la dynamique de S dans le sol, si des données de flux de minéralisation annuelle existent dans la littérature (Eriksen, 1995), les travaux relatifs à la caractérisation de la microflore (en terme de taille, structure et diversité) impliquée dans ces flux sont rares (Schmalenberger *et al*., 2008 ; Cregut *et al*., 2009).

Les expérimentations réalisées durant ce doctorat ont donc eu pour objectif de mieux caractériser la communauté fongique impliquée dans la minéralisation du S organique des sols, en prenant l'activité arylsulfatase (ARS) comme marqueur microbien de la minéralisation. Pour cela nous avons choisis de travailler sur un sol argilo-calcaire (Martincourt, 54) qui présente une teneur importante en S organique et qui est bien caractérisé au sein de l'équipe en terme d'activité potentielle ARS (Vong *et al.*, 2002 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2003). L'orge et le colza ont été choisis comme plantes modèles, en raison de leurs besoins en S contrastés. En effet, pour assurer une croissance optimale, le colza possède des besoins en S en moyenne deux fois supérieurs à ceux de l'orge (respectivement : 20 à 30 kg de S ha^{-1} et 15 à 20 kg de S ha^{-1}).

Les objectifs de ce travail ont été de : *i)* décrire taxonomiquement la communauté fongique fonctionnelle cultivable, *ii)* cerner certains des facteurs (disponibilité en soufre) régulant les fonctions de minéralisation de S chez ces microorganismes et *iii)* préciser l'influence de l'espèce végétale sur l'activité et/ou la taille des communautés fongiques cultivables, totale et fonctionnelle.

Une <u>première expérimentation</u> (Chapitre 1), réalisée à partir d'un dispositif expérimental au champ, a permis de développer un milieu de culture différentiel afin de détecter et caractériser les champignons capables de minéraliser les esters de sulfate *via* une activité ARS. En utilisant ce milieu (Czapek-X-Sulf), nous avons tout d'abord montré que les densités de champignons possédant l'activité ARS sont significativement supérieures sous couvert de colza comparativement à l'orge. Le colza, dicotylédone, est une plante connue pour libérer davantage de composés organiques solubles que l'orge, monocotylédone (Zagal, 1994 ; Vong *et al.*, 2007b). Ces composés organiques solubles sont directement accessibles à la microflore tellurique et induisent potentiellement des modifications des activités (Cheng *et al.*, 1996 ; Grayston *et al.*, 1996 ; Philippot *et al.*, 2002) et de la densité (Baudoin *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2008) microbiennes. Dans un second temps, nous avons mis en évidence une relation positive entre la densité des champignons cultivables possédant l'activité ARS et l'ARS totale du sol. Ces résultats établissent pour la première fois, la contribution de certaines communautés fongiques à l'activité ARS du sol et montrent que la taille de ces communautés influence le niveau de cette activité. Il faut remarquer cependant que la relation établie dans cette expérience n'est que partielle, du fait que les communautés microbiennes fongiques fonctionnelles cultivables ne représentent qu'une faible proportion des communautés fonctionnelles totales. Par ailleurs, d'autres communautés microbiennes et en particulier, les communautés bactériennes participent à l'activité ARS du sol (Cregut *et al*., 2009). Dans un troisième temps, nous avons isolé et caractérisé des membres de la communauté fongique fonctionnelle impliquée dans la minéralisation du S. Cette approche de microbiologie classique nous a ainsi permis de caractériser, pour la première fois, des souches fongiques du sol capables de minéraliser les composés organiques soufrés possédant des liaisons esters de sulfate, ceci *via* une activité ARS. Les champignons isolés par cette approche, dans les sols rhizosphériques de colza et d'orge, appartiennent principalement aux Ascomycètes et sont, pour certains, déjà connus pour jouer un rôle dans la dynamique des matières organiques dans les sols.

Nous avons entrepris, dans **une seconde expérimentation** (Chapitre 2), une caractérisation fonctionnelle des souches fongiques précédemment isolées (Chapitre 1). Nous avons en particulier, déterminé les profils d'activité ARS et les conditions d'induction de cette activité, selon la quantité ou la nature du S disponible pour la croissance de ces microorganismes. Cette expérimentation a été conduite sur des souches cultivées en conditions gnotobiotiques. Nous avons montré que les activités ARS, chez les champignons étudiés et cultivés en conditions plus ou moins limitantes en S minéral, se répartissent majoritairement, sous des formes solubles dans le cytosol et sous des formes associées aux membranes cellulaires. Ces résultats suggèrent l'existence d'un pool enzymatique ARS complexe chez les champignons. Concernant la réponse de ces activités à la disponibilité en S minéral, nous avons montré qu'elles semblent principalement dépendantes du taxon microbien considéré plutôt que de la localisation cellulaire de l'activité. Nous avons par ailleurs observé que les activités ARS extracellulaires semblent plutôt régulées par la disponibilité en substrat de l'enzyme dans le milieu. Ces résultats doivent être confirmés sur une collection de souches plus conséquente.

Afin d'approfondir nos connaissances sur l'influence éventuelle de la plante, *via* ses rhizodépôts, sur la communauté fongique fonctionnelle (taille et activité), nous avons réalisé une **troisième expérimentation**, en conditions contrôlées, avec les deux plantes modèles, à savoir le colza et l'orge (Chapitre 3). Les indicateurs de rhizodéposition que nous avons retenu sont le C racinaire et hydrosoluble du sol. Nous avons en effet montré une corrélation positive et significative entre le carbone racinaire et le carbone hydrosoluble du sol, ce qui conforte les résultats obtenus par Dilkes *et al*. (2004) et Vong *et al*. (2007). Nous avons également montré que les communautés fongiques fonctionnelles, en particulier sous couvert de colza, ne répondent pas à la rhizodéposition (par rapport au C hydrosoluble du sol), suggérant un faible effet de la rhizodéposition C sur la taille de cette communauté. Concernant l'activité ARS, nous avons tenté d'établir des corrélations entre la production nette de sulfates avec celles des activités ARS totale, intracellulaire et extracellulaire. Il ressort, une corrélation négative entre les teneurs nettes en sulfates et l'activité ARS totale du sol et la fraction intracellulaire de cette activité**.** Cette corrélation suggère que le S minéral inhibe l'activité ARS intracellulaire du sol et que cette fraction de l'activité ARS peut être considérée comme un marqueur d'immobilisation de S. Par contre, aucune relation entre la teneur en S minéral et la fraction extracellulaire de l'activité ARS n'a été mise en évidence. Ainsi, l'ARS intracellulaire apparaît être la fraction la plus active alors que la fraction extracellulaire nous est apparue plus stable, quel que soit le couvert végétal. La fraction

extracellulaire de l'ARS du sol pourrait donc plutôt jouer un rôle dans la dégradation de composés organiques S, indépendamment de la disponibilité en S minéral dans le sol.

Ces résultats peuvent être mis en relation avec les observations réalisées sur souches pures. Nous pouvons en effet remarquer que l'activité ARS intracellulaire mesurée sur les souches (Chapitre 2) présente une évolution similaire à celle de l'ARS intracellulaire mesurée dans le sol (Chapitre 3). Cette activité semblerait être régulé par la disponibilité en S minéral du milieu. Nous observons également que l'activité ARS extracellulaire du sol et l'ARS extracellulaire des souches pourraient être régulés par la présence de substrats de l'enzyme dans l'environnement.

Perspectives

En perspectives, il nous apparaît que différentes expérimentations complémentaires pourraient être réalisées afin de répondre en partie à certaines interrogations toujours présentes à l'issue de ce travail de doctorat.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la communauté fongique cultivable minéralisant les esters de sulfate. Pour cela, nous avons mis au point un milieu (milieu Czapek-X-Sulf) permettant d'une part, d'estimer la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable et d'autre part, d'isoler des souches fongiques possédant l'activité ARS, à partir d'échantillons de sol prélevés *in situ*. Ainsi, nous avons constitué une collection de 450 souches fongiques, tous temps de prélèvement confondus, sur lesquelles nous avons engagé une caractérisation taxonomique. Le nombre de souches isolées par traitement et temps de prélèvement ne nous a pas permis d'engager une analyse de la structure génétique de la communauté fongique fonctionnelle cultivable, pour chaque type de sol et au cours du temps. Il aurait été intéressant en conséquence de disposer d'une collection de souches plus importante. Ces trop faibles effectifs résultent d'une part, des choix opérés en terme de facteurs de dilution, lors des étalements des suspensions-dilutions de sol et d'autre part, de l'étape d'isolement des souches. Concernant les étalements, les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ont été utilisées. Il aurait fallu sans doute envisager des dilutions non pas au dixième mais par exemple au demi, afin de récupérer davantage d'isolats fongiques. Nous aurions pu alors, à partir de la fréquence relative de chaque type RFLP, qu'il aurait été possible de calculer, construire une matrice et réaliser diverses Analyses en Composantes Principales. Une première ACP aurait pu être réalisée afin de comparer la structure des communautés fongiques fonctionnelles cultivables isolées sous les 2 types de couverts et cerner si chaque couvert influence ou non la structure génétique de la communauté fongique fonctionnelle cultivable du sol. D'autres ACPs auraient aussi pu être réalisées afin d'appréhender l'évolution, au cours du temps, de la structure génétique de la communauté fongique fonctionnelle cultivable sous couvert de colza d'une part, et sous couvert d'orge, d'autre part. De plus, nous aurions pu suivre l'évolution des fréquences relatives des types RFLP dans les deux rhizosphères durant le développement des plantes et cerner si certains types RFLP sont mieux ou moins bien représentés dans chacune des deux rhizosphères étudiées. En effet, y a-t-il un ou plusieurs types RFLP dominants dans la rhizosphère de colza et/ou d'orge ? Est-ce

que certains types RFLP voient leur représentativité évoluer au cours de la phénologie des plantes? Ces questions demeurent.

Concernant la régulation de l'activité ARS chez les souches fongiques (Chapitre 2), nous avons mis en évidence que les activités ARS intracellulaires et membranaires semblent plutôt répondre à la disponibilité en S minéral du milieu, même si une variabilité importante est observée entre souches. Nous pourrions envisager de reconduire ce travail sur un nombre plus conséquent de souches fongiques afin d'apporter une meilleure généricité à nos résultats. Nous avons également montré que l'activité ARS extracellulaire semblait régulée par la présence d'un substrat de l'enzyme. L'utilisation d'autres substrats connus de l'ARS pourrait être envisagée afin de mieux cerner leur effet sur l'activité ARS. Cerner l'influence de sources de S autres que le S minéral ou les esters de sulfate aromatiques, et notamment de formes de S connues pour être présentes dans la rhizosphère ou dans les sols (méthionine, cystéine, glucosinolates, polysaccharides-S…) peut également être pertinent pour la suite de ce travail. Il semblerait également judicieux de faire varier la quantité et la qualité du C apporté dans la mesure ou C joue un rôle central dans la régulation des processus de transformation du S par la microflore.
Cette étude a également permis d'identifier huit séquences ARS putatives chez des champignons impliqués dans la minéralisation de S (Chapitre 2). La poursuite de cette partie du travail devrait permettre de pouvoir disposer d'amorces ciblant des séquences ARS fongiques (ou microbiennes). Ces outils moléculaires permettront de suivre l'évolution en termes de taille, de structure de la communauté fongique fonctionnelle en fonction de la dynamique de S, en s'affranchissant des problèmes de cultivabilité.

Notre troisième chapitre avait pour objectif de préciser l'influence de l'espèce végétale (colza *vs* orge) sur l'activité et/ou la taille des communautés fongiques possédant l'activité ARS et sur les communautés fongiques cultivables totales. Pour cela, nous avons mis en place une expérimentation en conditions contrôlées et des plants de colza et d'orge ont été semés en pot. Nous avons observé, qu'aux stades végétatifs des plantes caractérisés par une forte rhizodéposition, les densités de la communauté fongique totale cultivable sont les plus importantes. Ainsi, cette communauté apparaîtrait influencée par la rhizodéposition. Par contre, cet effet rhizosphère est beaucoup moins marqué, voire absent, sur la communauté fongique fonctionnelle ARS. Ce résultat suggère que les communautés fonctionnelles, en particulier sous couvert de colza, ne répondent pas à la rhizodéposition, en tout cas par

rapport à l'apport de C. Dans la mesure où nous nous sommes intéressés, au cours de cette expérimentation, uniquement à la communauté fongique cultivable, nous pourrions tenter d'accéder à la communauté fongique totale du sol par extraction de l'ADN du sol. La caractérisation de la taille (quantification par qPCR) et de la structure génétique (par *F*-ARISA ou DGGE) de cette communauté fongique globale, sous les deux couverts, pourrait être réalisée. Concernant la communauté fongique fonctionnelle, nous pourrions tenter de déterminer si certains des taxons identifiés (Chapitre 1) sont davantage représentés sous couvert de colza *versus* orge, en utilisant des amorces taxon-spécifique.

Par ailleurs, afin de mieux cerner l'effet rhizosphère, des approches de type DNA-SIP (Stable Isotope Probing) basées sur un marquage au carbone ^{13}C des plantes, pourraient être engagées. Ces expérimentations permettraient de confirmer que la communauté fongique totale est bien influencée par les rhizodépôts. Cette technique a déjà été utilisée ces dernières années pour identifier les populations actives (Dumont et Murrell, 2005 ; Lu *et al.*, 2006 ; Denef *et al.*, 2007) ou des populations impliquées dans la dégradation de différents substrats (Yevdokimov *et al.*, 2006). Ainsi le marquage du colza et de l'orge au ^{13}C pourrait permettre d'isoler les populations fongiques activement impliquées dans la dégradation des rhizodépôts spécifiques de chaque plante (Haichar *et al.*, 2008). L'utilisation d'amorces ciblant les ARS fongiques permettrait également de déterminer si les communautés fongiques fonctionnelles totales sont susceptibles d'utiliser les rhizodépôts.

Le couplage de l'expérience en conditions contrôlées avec des approches de marquage au ^{34}S, permettrait de déterminer quel est le pool préférentiel de S, organique ou minéral, qui est réellement utilisé par la microflore. En outre, nous pourrions également déterminer si l'immobilisation du S organique dans les microorganismes peut véritablement profiter à la nutrition de la plante, du fait du rapide turn-over microbien. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre et prédire le rôle et le devenir des esters de sulfate du sol dans la nutrition soufrée des organismes vivants (plantes et microorganismes).

Nous avons tenté, au cours de cette expérimentation réalisée en conditions contrôlées, d'estimer les teneurs nettes en sulfates mais nous avons été gênés dans l'interprétation de nos résultats, dans la mesure où il n'a pas été possible de réaliser un véritable bilan net. En effet, nous n'avons pas mesuré le S exporté par les plantes. Ainsi, afin de mieux cerner l'impact de la plante sur les communautés fongiques minéralisant les esters de sulfate, plusieurs expérimentations seraient envisageables. Nous pourrions mesurer le S exporté par les plantes

afin d'avoir un bilan net de sulfates et corréler les résultats obtenus avec la production nette de l'activité ARS intracellulaire. Pour appréhender l'effet « prélèvement de sulfates par la plante », il serait aussi envisageable de mettre en place des microcosmes indépendants contenant soit un, deux, trois…plants de colza. Ce nombre croissant de plants impliquerait, *a priori*, des prélèvements croissants en sulfates par les plantes. Nous verrions ainsi si l'augmentation des prélèvements stimule au final la communauté fongique fonctionnelle, en mesurant comme indicateur l'activité ARS intracellulaire de cette communauté. Demeure néanmoins, lors de l'estimation de l'activité ARS, le problème que cette activité potentielle correspond à l'activité de l'ensemble des microorganismes présents dans les échantillons de sol. Ainsi, il conviendrait éventuellement d'apporter à nos échantillons de sols certains antibiotiques, afin d'éliminer la fraction bactérienne de ces échantillons et d'accéder uniquement à l'activité ARS liée à la communauté fongique.

Les plantes modèles que nous avons retenues pour nos expériences sont le colza et l'orge, car montrant des exigences différentes en S. Néanmoins, une autre différence notable caractérise ces plantes : l'orge peut être mycorhizée, ce qui n'est pas le cas du colza. Or, une plante mycorhizée pourrait mieux incorporer le S ; les champignons mycorhiziens ont en effet la capacité de permettre le transfert des nutriments vers la plante, grâce au vaste réseau d'hyphes extra et intra-radiculaires (Tian *et al*., 2010). Par ailleurs, l'établissement de la symbiose contribue à modifier les flux de photoassimilats vers les racines. Nous pourrions donc *i)* vérifier la présence d'une mycorhization des racines d'orge par des approches de coloration des racines d'orge, et *ii)* montrer si la différence en terme d'activité ARS vient de « l'effet mycorhize » sous l'orge, ou bien si les différences en terme de diversité et d'activité des champignons présents sous ces deux couverts, sont expliquées par la variété des composés organiques libérés par les plantes.

L'ensemble de ces expérimentations nous permettrait ainsi de mieux comprendre l'interaction existant entre la communauté fongique minéralisant les esters de sulfate et la plante. En effet, il nous apparaît nécessaire d'appréhender le rôle potentiel de chaque acteur, à savoir, la communauté fongique fonctionnelle, la plante, mais aussi les facteurs abiotiques, afin de mieux cerner les processus de minéralisation des esters de sulfate et plus largement le turn-over du soufre dans le sol.

Références Bibliographiques

A

Al-Abdalall A.H.A. 2010. Assessment of yield loss caused by root rots in wheat and barley. Journal of Food, Agriculture and Environment. 8 : 638-641.

Allison S.D., Vitousek P.M. 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. Soil Biology & Biochemistry. 37 : 937-944.

Alloway B.J. 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway B.J, (Ed), *Heavy Metals in Soils*, Blackie Academic and Professional, London pp. 11–37.

Alon A., Steinberger Y. 1999. Effect of nitrogen amendments on microbial biomass, aboveground biomass and nematode population in the Negev Desert soil. Journal of Arid Environments. 41 : 429-441.

Anderson I.C., Cairney J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental Microbiology. 6 : 769-779.

Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1973. Quantification of bacterial and fungal contribution to soil respiration. Archiv für Mikrobiologie. 93 : 113-127.

Angus J.F., Gardner P.A., Kirkegaard J.A., Deshmarchelier J.M. 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* root inhibit growth of take-all fungus. Plant & Soil. 162 : 107-12.

Apte B.N., Bhavsar P.N., Siddiqi O. 1974. The regulation of aryl sulphatase in *Aspergillus nidulans.* Journal of Molecular Biology. 86 : 637-648.

Arao, T. 1999. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring 13C incorporation into soil phospholipid fatty acids from 13C acetate. Soil Biology. Biochemistry. 31:1015-1020.

Arnold E. 1995. Problems on measurements of species diversity of macrofungi. In: Allsopp D., Colwell R.R., Hawksworth D.L. (Eds). Microbial diversity and Ecosystem function. CAB International, Wallingford, UK, 337-353.

Atkinson D., Watson C.A. 2000. The research needs of organic agriculture-distinct or just partof agricultural research? The BCPC Conference -Pests & Diseases. 151-158.

B

Bailey C.D., Price R.A., Doyle J.J. 2002. Systematics of the Halimolobine *Brassicaceae*: evidence from three loci and morphology. Systematic Botany. 27 : 318-32.

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. The Annual Review of Plant Biology. 57 : 233-266.

Balasubramanian A., Rangaswami G. 1978. Influence of seed and root exudations on the rhizosphere effect in *Sorghum vulgare* and *Crotalaria juncea*. Folia Micrbiologica. 23 : 480-488.

Balesdent M.H., Attard A., Ansan-Melayah D., Delourme R., Renard M., Rouxel T. 2001. Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans.* Phytopathology 91 : 70-76.

Banerjee M.R., Chapman S.J. 1996. The significance of microbial biomass sulphur in soil. Biology and Fertility of Soils. 22 : 116-125.

Barber D.A., Lynch J.M. 1977. Microbial growth in the rhizosphere. Soil Biology &Biochemistry. 9 : 305-308.

Barber D.A., Martin J.K. 1976. The release of organic substances by cereal roots into soil. New phytologist. 76 : 69-80.

Bardgett R.D., Chan, K.F. 1999. Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralisation and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. Soil Biology &Biochemistry.31*:* 1007-1014.

Bardgett R.D., Hobbs P.J., Frostegard A. 1996. Changes in fungal : bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management on an upland grassland. Biology and Fertility of Soils. 22 : 261-264.

Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F. 1980a. Further studies on the substrate specificity and inhibition of the stereospecific CS2 secondary alkylsulphohydrolase of *Comamonas terrigena.* The Biochemical Journal. 191 : 467-473.

Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F., Payne W.J. 1980b. Preliminary observations on alcohol dehydrogenases in *Comamonas terrigena* that exhibit stereospecificity towards secondary alcohols. The Biochemical Journal. 187 : 703-709.

Bartholomew B., Dodgson K.S., Matcham G.W.J., Shaw D.J., White G. 1977. A novel mechanism of enzymatic ester hydrolysis. The Biochemical Journal. 165 : 575-580.

Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 1183-1192.

Baum C., Hrynkiewicz K. 2006. Clonal and seasonal shifts in communities of saprotrophic microfungi and soil enzyme activities in the mycorrhizosphere of *Salix* spp. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 169 : 481-487.

Beare M.H., Hu S., Coleman D.C., Hendrix P.F. 1997. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soil. Applied Soil Ecology. 5 : 211-219.

Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W, Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthetized by *Pseudomonas aeruginosa*

PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*ats*A). European Journal of Biochemistry. 229 : 385-394.

Benizri E., Dedourge O., Di Battista-Leboeuf C., Piutti S., Nguyen C., Guckert A. 2002 Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. Applied Soil Ecology. 21 : 261-265.

Benizri E., Nguyen C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. Soil Biology &Biochemistry. 39 : 1230-1233.

Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1983. Sulphur cycling in soils.*In:* MoreA.I.(Ed), Proceedings of Sulphur ’82 Conference. British Sulphur Corporation, London. 2 : 747–785.

Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli. India. pp. 14.

Bhupinderpal-Singh., Rengel Z., Bowden J.W. 2006. Carbon, nitrogen and sulphur cycling following incorporation of canola residue of different sizes into a nutrient-poor sandy soil. Soil Biology and Biochemistry. 38 : 3242.

Blake-Kalff M.M.A., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 2000. Diagnosing sulphur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant and Soil. 225 : 95-107.

Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. 2005. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. Journal of Plant Nutrition. 28 : 763-784.

Borkovich K.A., Alex L.A., Yarden O., Freitag M, Turner G.E,. Read N.D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta N. Plesofsky M., Plamann M., Goodrich-Tanrikulu U., Schulte G., Mannhaupt F.E., Nargang A., Radford C., Selitrennikoff, J.E. Galagan, J.C., Dunlap J.J., Loros D., Catcheside H., Inoue R., Aramayo M., Polymenis E.U., Selker M.S., Sachs G.A. Marzluf I. Paulsen J., Davis R., Ebbole D.J., Zelter A., Kalkman E.R., O'Rourke R., Bowring F., Yeadon J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W., Pratt R. 2004. Lessons from the genome

sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68 : 1-108.

Borneman J., Hartin R.J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Applied & Environmental Microbiology. 66 : 4356-4360.

Bouthier A, Bonnifet JP, Drieu Y, Seguin A, Gatay D (2007) Fertilisation soufrée des céréales : Mieux prévoir le risque de déficience. Perspectives Agricoles 330: 54-59.

Bowen G.D., Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plantgrowth. Advences in Agronomy. 66 : 1-102.

Boyle S.A., Yarwood R.R., Bottomley P.J., Myrold D.D. 2008. Bacterial and fungalcontributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon.
Soil Biology & Biochemistry. 40 : 443-451.

Bridge P., Spooner B.M. 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant and Soil. 232 : 147-154.

Bromfield A.R. 1972. Sulphur in Northern Nigeria soils. I. The effects of cultivation and fertilizers on total S and sulphate patterns in soil profiles. Journal of Agricultural Science. 78 *:* 465-470.

Brookes P.C., Landman A., Pruden G., Jenkinson D.S. 1985. Chloroform fumigation and therelease of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomassnitrogen in soil. Soil Biology & Biochemistry. 17 : 837-842.

Brown P.D., Morra M.J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolatecontaining plants. Advance Agronomic. 61 : 167-231.

Brussaard.L., De Ruiter P.C., George G. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. Agriculture, Ecosystems and Environment. 121 : 233-244.

Buchner P., Stuiver C.E.E., Westerman S., Wirtz M., Hell R., Hawkesford M.J., DeKok L.J. 2004. *Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in Brassicaoleacerae L. is affected* by atmospheric H2S and pedospheric sulfate nutrition. Plant Physiology. 136 : 3396-3408

Bünemann E.K, Heenan D.P, Marschner P and McNeill A.M. 2006. Long-term effects of crop rotation, stubble management and tillage on soil phosphorus dynamics in a Chromic Luvisol from New South Wales, Australia. Australian Journal of Soil Research 44, 611–618.

Burns G.R., Wynn C.H. 1977. A rapid direct assay for the determination of the separate activities of the three arylsulphatases of *Aspergillus oryzae*. Biochemistry Journal. 166 : 411-413.

Burns R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. Soil Biology & Biochemistry. 14 : 432-427**.**

Burns R.G., 1978. Enzyme activity in soil: Some theoretical and practical considerations. In: Soil enzymes, pp. 295-326. Academic Press, New York.

Butler J.L., Mark A. Williams M.A., Peter J. Bottomley P.J, and David D. Myrold D.D. 2003. Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow.Applied & Environmental. 69 : 6793-6800.

C

Cairney J. 2005. Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. Mycological Research. 109 : 7-20.

Castellano S.D., Dick R.P. 1990. Cropping and sulfur fertilization influence on sulphur transformation in soil. Soil Science Society of America Journal. 54 : 114-121.

Chen C.R., Condron L.M., Davis M.R., Sherlock R.R. 2001. Effects of land-use change from grassland to forest on soil sulfur and arylsulfatase activity in New Zealand. Australian Journal of Soil Research. 39 : 749-757.

Chen J., Ferris H. 1999. The effects of nematode grazing on nitrogen mineralization during fungal decomposition of organic matter. Soil Biology & Biochemistry. 31 : 1265-1279.

Cheng W., Zhang Q., Coleman D.C., Ronald Carroll C., Hoffman C.A. 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? Soil Biology & Biochemistry. 28 : 1283-1288.

Clarkson D.T., Saker L.R., Purves J.V. 1989. Depression of nitrate and ammonium influx in barley plants with diminished sulfate-status: evidence for co-regulation of nitrogen and sulphate intake. Journal of Experimental Botany. 40 : 953-963.

Cloves J.M., Dodgson K.S., Payne W.J., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980a. Purification and properties of the P2 primary alkylsulphohydrolase of the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. The Biochemical Journal. 185 : 23-31.

Cloves J.M., Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980b. Specificity of P2 primary alkylsulphohydrolase induction in the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. The Biochemical Journal. 185 : 13-21.

Costa R., Götz M., Mrotzek N., Lottmann J., Berg G., Smalla K. 2006. Effects of site andplant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. FEMS Microbiology Ecology. 56 : 236-249.

Cowling D.W., Jones L.H.P., Lockyer D.R. 1973. Increased yield through correction of sulfur deficiency in ryegrass exposed to sulfur dioxide. Nature. 243 : 479-480.

Cowling G.J., Jones A.S., Walker R.T. 1971. Polynucleotide analogue inhibition of messenger-stimulated transfer RNA binding to ribosomes. Biochemica & Biophysica Acta. 254 : 452-456.

Cregut M., Piutti S., Vong P.C., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., Benizri E. 2009. Density, structure, and diversity of cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-rown rape and barley. Soil & Biochemistry. 4 : 704-710.

Crescenzi A.M.V., Dodgson K.S., White G.F. 1984. Purification and some properties of the D-lactate-2-sulphatase of *Pseudomonas syringae* GG. The Biochemical Journal. 223 : 487-494.

Cutler A.J., Krochko J.E. 1999. Formation and breakdown of ABA. Trends in Plant Science. 4 : 472-478.

Czarnes S., Hallett P.D., Bengough A.G., Young L.M. 2000. Root- and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. European Journal of Soil Science. 51 : 435-443.

D

Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA (Ed.) 383 pp.

Davison J., Brunel F., Phanopoulos A., Prozzi D., Terpsstra P. 1992. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. Gene. 114 : 19-24.

Deacon J. 2006. Environmental conditions for growth and tolerance of extremes. Fungal Biology. 142-157.

Deacon L.G., Pryce-miller E.J., Frankland J.C., Bainbridge B.W., Moore P.D., Robinson C.H. 2006. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. Soil Biology & Biochemistry. 38 : 7-20.

De Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L. 2005. Living in a fungal World: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiology Reviews 29 : 795-811.

De Kok R., Irwin P.G.J., Teanby N.A., Lellouch E., Bézard B., Vinatier S.,Nixon C.A., Fletcher L., Howett C., Calcutt S.B., Bowles N.E., Flasar F.M., Taylor F.W. 2007. Oxygen compounds in Titan’s stratosphere as observed by Cassini CIRS. Icarus. 186 : 354-363.

De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. Biology and Fertility of Soils. 35 : 302-306.

Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. Biology and Fertility of Soils. 38 : 181-185.

Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2004. Effects of glucoseand rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-35S, microbial biomass-35S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. European Journal of Soil
Science. 55 : 649-656.

DeLuca T.H., Keeney D.R. 1994. Soluble carbon and nitrogen pools of prairie and cultivated soils: seasonal variation. Soil Science Society of America Journal. 58 : 835-840.

Denef K., Zotarelli L., Boddey R.M., Six J. 2007. Microaggregate-associated carbon as a diagnostic fraction for management-induced changes in soil organic carbon in two Oxisols . Soil Biology and Biochemistry. 39 : 1165-1172.

Deng S.P., Tabatabai M.A. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III - Phosphatases and arylsulfatase. Biology and Fertility of Soils. 24 : 141-146.

Dennis P.G., Miller A.J., Hirsch P.R. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacteria communities? FEMS Microbiology Ecology. 72 : 313-327.

Dick M.W. 1997. Fungi, flagella and phylogeny. Mycological Research. 101 : 385-394.

Dierks T., Lecca M.R., Schlotterhose P., Schmidt B., von Figura K. 1999. Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. The EMBO Journal. 18 : 2084-2091.

Dilkes N.B., Jones L.D., Farrar J.F. 2004. Temporal dynamic of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. Plant Physiology. 134 : 706-715.

Dodgson K.S., White G., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatase Enzymes of Microbial Origin.1 : 41-43.

Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. 1980. Compendium of soil Fungi, vol 1 Academic, London.

Domsch K.H, Gams W.1970. Fungi in agricultural soils, Pp 59-60, Wiley, New york.

Droux M., 2004. Sulphur assimilation and the role of sulphur in plant metabolism: a survey. Photosynthesis Research 72, p331-348.

Dumont M.G, Murrell J.C. 2005. Stable isotope probing – linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiol 3: 499–504.

E

Ekenler M., Tabatabai. 2003. Tillage and residue management effects on β-glucosaminidase activity in soils. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 871-874.

Elmholt S., Labouriau R. 2005. Fungi in Danish soils under organic and conventional farming. Agriculture, Ecosystems and Environment. 107 : 65-73.

Elsgaard L., Pojana G., Miraval T., Eriksen J., Marcomini A. 2003. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates in sulfate-leached soil mesocosms. Chemosphere. 50 *:* 929-937.

Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. Soil Biology & Biochemistry. 27 : 1011-1016.

F

Farrar J., Hawes M., Jones D., Lindow S. 2003. How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. Ecology. 84 : 827-837.

Fieldsend J., Milford G.F J. 1994. Changes in glucosinolates during crop development in single- and double-low genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus*). I. Production and distribution in vegetative and developing pods during development and potential role in the recycling of sulfur within the crop. Annals of Applied Biology. 124 : 531-542.

Filion M., Hamelin R.C., Bernier L., St-Arnaud M. 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased Black Spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 3541-3551.

Fitzgerald J.W.1976. Sulfate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulfur cycle of aerobic soils. Bacteriological Reviews. 40 : 698-721.

Fowler D., Smith R.I., Muller J.B.A., Hayman G., Vincent K.J. 2005. Changes in the atmospheric deposition of acidifying compounds in the UK between 1986 and 2001. Environmental Pollution. 137 : 15-25.

Franklin R B., Mills A.L. 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. FEMS Microbiology Ecology 44 : 335-346.

Freney J.R., Melville G.E., Williams C.H. 1971. Organic sulphur fractions labelled by addition of ^{35}S-sulphate to soil. Soil Biology & Biochemistry. 3 : 133-141.

Freney J.R. Melville G.E., Williams C.H. 1975. Soil organic matter fractions as sources of plant available sulfur. Soil Biology & Biochemistry. 7: 177-183.

Frey S.D., Elliott E.T., Paustian K., Paterson G.A. 2000. Fungal translocation as a mechanism for soil nitrogen inputs to surface residue decomposition in a no-tillage agroecosystem. Soil Biology & Biochemistry. 32 : 689-698.

Frey S.D., Six J., Elliott E.T. 2003. Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer fungi at the soil-litter interface. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 1001-1004.

Frossard D., Suhardi, Contat F., 1991. Comment bien échantillonner pour bien apprécier la disponibilité du sol en soufre mineral. . *In*: Duc P. (Ed). L'azote et le soufre dans le sol. Pp. 41-43.

G

Gadler P., Faber K. 2007. New enzymes for biotransformations : microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. Trends in Biotechnology. 25 : 83-88.

Galletti S., Sala E., Leoni O, Susanna Cinti S., Claudio Cerato C. 2008. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a β-thio-glucosidase. Soil Biology & Biochemistry. 40 : 2170-2173.

Ganeshamurthy A.N., Nielsen N.E., 1990. Arylsulfatase and the biochemical mineralization of soil organic sulphur. Soil Biology & Biochemistry. 22 : 1163-1165.

Gary R.J.B., Colin H. W. 1977. Differential repression of arylsulphatase synthesis in *Aspergillus oryzae*. Biochemistry Journal 166 : 415-420.

Geisseler D., Horwath W.R. 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. Soil Biology & Biochemistry. 40 : 3040-3048.

Germida J.J., Wainwright M., Gupta V.V.S.R. 1992. Biochemistry of sulfur cycling in soil. Soil Biology & Biochemistry. 7 : 1-53.

Ghani A., Mc Larren R.G., Swift R.S. 1993. Mobilization of recently formed soil organic sulphur. Soil Biology & Biochemistry. 25 : 1739-1744.

Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.M.N., Swift J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology. 6 : 3-16.

Godo G.H., Reisenauer H.M. 1980. Plant effects on soil manganese availability. Soil Science Society of America. 44 : 993-995.

Goodwin P.H., Li J., Jin S. 2000. Evidence for sulphate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 57 : 169-176.

Gransee A., Wittenmeyer L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exsudates in relation to plant species and development. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 163 : 381-385.

Grayston S.J., Germida J.J. 1990. Influence of crop rhizosphere on populations and activity of heterotrophic sulfur-oxidizing microorganisms. Soil Biology & Biochemistry. 22 : 457-63.

Grayston S.J., Germida J.J., 1991. Sulfur-oxidizing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria for *Canola.* Canadian Journal of Microbiology. 37 *:* 521-529.

Grayston S.J., Campbell C.D. 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). Tree Physiology. 16 : 1031-1038.

Gregorich E.G., Beare M.H., Stoklas U., St-Georges P. 2003. Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. Geoderma. 113 : 237-252.

Gregory P.J., Atwell B.J. 1991. The fate of the carbon in pulse-labelled crops of barley and wheat. growth. *In*: Sparks D.L., (Ed.), Advances in Agronomy, Vol. 66. Academic Press, New York. pp. 1-102.

Grubb C.D., Abel S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. Trends in Plant Science. 11 : 89-100.

Guckert A. 1985. Root exsudation and microbial activity at the soil-root interface. 2nd IPI-Is Workshop on potassium, Nanjing, Academia Sinica. pp. 49-60.

Gunderson L.H. 2000. Ecological resilience in theory and application. Annual Review of Ecology Systematics. 31 : 425-439.

Gutiérrez-Luna F.M., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E., Reyes de la Cruz H., Macías-Rodríguez L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. Symbiosis. 51 : 75-83.

H

Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Kolmar L., Tümmler B., Heinz D.W., Schubert W.D. 2006. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatse from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the America. 103 : 7631-7636.

Haggquist M.L., Svenninsson H., Olsson S., Sundin P., Odham G., Liljenberg C. 1984. Longterm culturing of plants with aseptic root. Determination of rape exudates. Plant Cell Environment. 7 : 5549-552.

Haichar F.E.Z., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J.I., Prosser J.I., Balesdent J., Heulin T., Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. The ISME Journal. 2 : 1221-1230.

Halkier B A., Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual Review of Plant Biology. 57 : 303-333.

Hall A.D., 1909. Fertilizers and Manures. London, pp 384.

Hamlen R. Lukezic F., Bloom J. 1972. Influence of age and stage development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. Canadian Journal of Plant Science. 52 : 633-642.

Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. 2004. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. Angewandte Chemie International Edition. 43 : 5736-5763.

Harad T., Spencer B. 1960. Choline sulphate in Fungi. Journal of General Microbiology. 22 : 520-527.

Harada T., Spencer B. 1962. The effect of sulphate assimilation on the induction of arylsulphatase synthesis in fungi. The Biochemistry Journal. 82 : 148-156.

Harada T., Spencer B. 1964. Repression and induction of arylsulphatase synthesis in *Aerobacter aerogenes*. The Biochemistry Journal. 93 : 373-378.

Hartmann A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G. 2009. Plant driven selection of microbes. Plant Soil. 321 : 235–257.

Hawesford M.J., De Kok L.J. 2006. Managing sulphur metabolism in plants. Plant, Cell et Environment. 29: 382-395.

Hawkesford M.J. 2003. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? Physiologia Plantarum. 117 : 155-163.

Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research. 105 : 1422-1432.

Hawksworth, D.L., Sutton B.C., Ainsworth G.C. 1993. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 7th ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.

Helal H.M., Sauerbeck D.R. 1986. Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. Zeitschrift für Pflanzenznernährung und Bodenkunde. 149 : 181-188.

Helal H.M., Sauerbeck D.R., 1989. Carbon turnover in the rhizosphere. Zeitschrift für Pflanzenznernährung und Bodenkunde. 152: 211-216.

Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P W. 1998. Ploughing up the wood-wide web. Nature. 394 : 431.

Henry S., Texier S., Hallet S., Bru D., Dambreville C., Chèneby D., Bizouard F., Germon J.C., Philippot L. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers anddenitrifiers: insight into the role of root exudates. Environmental Microbiology. 10 : 3082-3092.

Hiltner, L. 1904. Über neuere Ehrfahrungen und Probleme auf dem Gebiet deBodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundüngung und Brache. Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft, 98, 59-78.

Hoagland D.R., Arnon D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment. Station. Circ. 347.

Högberg M.N., Chen Y., Högberg P. 2007. Gross nitrogen mineralisation and fungi-tobacteria ratios are negatively correlated in boreal forests. Biology and Fertility of Soils 44 :363-366.

Hue N.V., Cope Jr J.T. 1987. Use of soil-profile sulphate data for predicting crop response to sulphur. Soil Science Society of America Journal. 51 : 658-664.

Hussey, E. C., Spencer, B.,1967. Biochemical. Journal. 103, 56P.

I

Ingham E.R. 2000. The soil biology primer : soil fungi ,chapter 4, (edn) NRCS. Departement of agriculture. America.

Innes L., Hobbs P.J., Bardgett R.D. 2004. The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. Biology and Fertility of Soil. 40 : 7-13.

J

Jacquin F., Vong P.C., Diot F. 1992. Etude des formes d'immobilisation du soufre et de leur reminéralisation dans deux sols cultivés lorrains. Science du Sol. 30 : 215-225.

James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson A.W., Schüßler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer G., Untereiner W.A., Lucking R., Budel B., Geiser D.M., Aptroot A., Buck W.R., Cole M.S., Diederich P., Printzen C., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Zavarzin A., Hibbett D.S., Lutzoni F., Mclaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818-822.

Jenkinson D.S., Ladd J.N. 1981. Microbial biomass in soil measurement and turnover. *In*: Paul E.A, Ladd JN (Eds), Soil Biochemistry. New York: Marcel Dekker. 5: 415-471.

Jensen B. 1993. Rhizodepostion by $^{14}CO_2$-pulse-labelled spring barley grows in small field plots on sandy loam. Soil Biology & Biochemistry. 25 : 1553-1559.

Joergensen R.G. 1995. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass, extraction with 0.01 M $CaCl_2$. Agribiological Research. 48 : 319-324.

Jones D.L., Darrah P.R. 1992. Resorption of organic-components by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. 1. Resorption of ^{14}C labelled glucose, mannose and citricacid. Plant Soil 143 : 259–266.

Jones D.D., Morre D.J. 1973. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. III. Control by Exogenous Sugars. Physiologia Plantarum. 29 : 68-75.

Jones D.L., Hodge A., Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist. 163 : 459-480.

Juhlin-Dannfelt H. 1911. Gips verkan som gijdselmedel. Kungl. Lantbruksak. Handl. Och Tidskr. 50 : 87-91.

K

Kahnert A., Mirleau P., Wait R., Kertesz M.A. 2002. The LysR-type regulator is involved in soil survival and sulphate ester metabolism in *Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology. 4 : 225-237.

Kertesz M.A, Fellows E, Schmalenberger A. 2007. Rhizobacteria and plant sulfur supply. Advances. Applied. Microbiology. 62 : 235-268.

Kertesz MA. (2004). Metabolism of sulphur-containing organic compounds. In Ramos JL (Ed.), *Pseudomonas, vol III (ed. JL Ramos)*. Kluwer Academic/Plenum
Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram- negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 24 : 135-175.

Kertesz M.A., Cook A.M., Leisinger T. 1994. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. FEMS Microbiological Reviews. 15 : 195-215.

Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 60 : 2296-2303.

Kim D.H., Kim B., Kim H.S., Sohng I.S., Kobashi K. 1994. Sulfatation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 17 : 1326-1328.

Kirkegaard J.A., Sarwar M. Matthiessen J.N. 1998. Assessing the biofumigation potential of crucifers, *Acta Horticulturae* 459 : 105-111.

King J.E., Quinn J.P. 1997. The utilization of organosulphonates by soil land freshwater bacteria. Letters in Applied Microbiology. 24 : 474-478.

Kjoller A., Struwe S. 1982. Microfungi in ecosystems : Fungal occurrence and activity in litter and soil. Oïkos. 39 : 389-422.

Klein D.A., Paschke M.W. 2004. Filamentous fungi: The indeterminate lifestyle and microbial ecology. Microbial Ecology. 47 : 224-235.

Klose S., Moore J.M., Tabatabai M.A. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. Biology and Fertility of Soils. 29 : 46-54.

Knauff U., Schulz M., Scherer H.W. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. European Journal of Agronomy. 19 : 215-223.

Knights J.S., Zhao F.J., McGrath S.P., Magan N. 2001. Long-term effects of land use and fertiliser treatments on sulphur transformations in soils from the Broadbalk experiment. Soil Biology & Biochemistry. 33 : 1797-1804.

Kong L., Abrams S.R., Owen S.J., Van Niejenhuis A., Von Aderkas P. 2009. Dynamic changes in concentrations of auxin, cytokinin, ABA and selected metabolites in multiple genotypes of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) during a growing season. Tree Physiology 29 : 183-190.

Kowalchuk G.A., Buma D.S., De Boer W., Klinkhamer P.G.L., van Veen J.A. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. Antonie von Leeuwenhoek. 81 : 509-520.

Kumar, A., Paietta, J.V. 1995. The sulfur controller-2 negative regulatory gene of *Neurospora crassa* encodes a protein with β-transducin repeats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92 : 3343-3347.

Kuzyakov Y. 2005. Theoretical background for partitioning of root and rhizomicrobial respiration by $\delta_{13}C$ of microbial biomass. European Journal of Soil Biology. 41 : 1-9.

Kuzyakov Y., Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 163 : 421-431.

L

Laheurte F., Leyval C., Berthelin J. 1990. Root exudates of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation. Symbiosis. 9 : 111-116.

Landi L., Badalucco L., Pomare F., Nannipieri P. 1993. Effectiveness of antibiotics to distinguish the contributions of fungi and bacteria to net nitrogen mineralization, nitrification and respiration. Soil Biology & Biochemistry. 25 : 1771-1778.

Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene. Nature. 443 : 818-822.

Lanoue A., Burlat V., Henkes G.J., Koch I., Schurr U., Röse U.S.R. 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. New Phytologist. 185 : 577-588.

Lasserre-Joulin F., Vong P.C., Guckert A. 2001. Evolution of soluble organic carbon in rhizosphere and corresponding non-rhizospere soil in field-grown oilseed rape and barley. Immobilisation and turnover of sulphur-35 in the rhizosphere soil. In: Plant nutrition-Food security and sustainability of agro-ecosystems. W.J. Horst et al. (Eds). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, pp. 624-625.

Laughlin R.J., Stevens R.J. 2002. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. Soil Science Society of America Journal. 66 : 1540-1548.
Laughlin R.J., Stevens R.J., Müller C., Watson C.J. 2008. Evidence that fungi can oxidize NH_4^+ to NO_3^- in a grassland soil. European Journal of Soil Science. 59 : 285-291.

Leake J.R., Ostle N.J., Rangel-Castro J.I., Johnson. 2006. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field $^{13}CO_2$ pulse-labelling in an upland grassland. Applied Soil Ecology. 33 : 152-175.

Lecellier G., Silar P. 1994. Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. Current Genetics. 25 : 122-123.

Leckie S.E., Prescott C.E., Grayston S.J., Neufeld J.D., Mohn W.W. 2004. Characterization of humus microbial communities in adjacent forest types that differ in nitrogen availability. Microbial Ecology. 48 : 29-40.

Leinweber P., Schulten H.R., Korschens M. 1995. Hot water extracted organic matter: Chemical composition and temporal variations in a long-term field experiment. Biology and Fertility of Soils. 20 : 17-23.

Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N.-S., Hofrichter M., Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology. 27 : 175-185.

Levasseur A., Saloheimo M., Navarro D., Andberg M., Pontarotti P., Kruus K., Record E. 2010. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: A functional, phylogenetic and evolutionary study. BMC Biochemistry. pp 32.

Leyval C., Berthelin J. 1993. Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. Biology and Fertility of Soils. 15 : 259-267.

Li X., Sarah P. 2003. Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along Mediterraneanarid transect. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 925-934.

Linehan D.J., Sinclair A.H., Mitchell M.C. 1985. Mobilisation of Cu, Mn and Zn in the soil solutions of barley rhizospheres. Plant and Soil. 86 : 147-149.

Liu Y.J., Hodson M.C., Hall B.D. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage:phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. BMC Evolutionary Biology. 6 : 74-87.

Lu Y., Rosencrantz D., Liesack W., Conrad R. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. Environmental Microbiology. 8 : 1351-1360.

Ludley K.E., Robinson C.H. 2008. Soil 'decomposer' Basidiomycota in Arctic and Antarctic ecosystems. Soil Biology & Biochemistry. 40 : 11-29.

Lynch J.M., Whipps J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. Plant and Soil. 129 : 1-10.

Lynch J.M 1990. Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: The Rhizosphere. Lynch J M. (Ed), John Wiley and sons, New York. pp. 1-10.

M

Mansfield S.D., Meder R. 2003. Cellulose hydrolysis - The role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. Cellulose. 10 : 159-169.

Mansouri-Bauly H., Kruse J., Sykorova Z., Scheerer U., Kopriva S. 2006. Sulfur uptake in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. Mycorrhiza. 16: 421-427.

Marcial-Gomes N.C., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N.G., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. Applied and Environmental Microbiology. 69 : 3758-3766.

Marschner P., Fu Q., Rengel Z. 2003. Manganese availability and microbial populations in the rhizosphere of wheat genotypes differing in tolerance to Mn deficiency. Plant Nutrition and Soil Science. 166 : 712-718.

Marschner P., Neumann G., Kania A., Weiskopf L., Lieberei R. 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus L.*). Plant Soil. 246 : 167–174.

Matula J., Pechová M. 2002. A simplified approach to liming and its evaluation. Communication in Soil Science and Plant.Analysis. 33 : 2989–3006.

Marzluf G.A. 1994. Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in fungi. Advances in Genetics. 31 : 187-206.

Marzluf G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. Annual Reviews of Microbiology. 51 : 73-96.

Maynard D.G., Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1984. Sulfur cycling in grassland and parkland soils. Biogeochemistry. 1 : 97-111.

Mc Donald N.W., Zak D.R., Pregitzer K.S. 1995. Temperature effects on kinetics of microbial respiration and net nitrogen and sulfur mineralization. Soil Science Society American Journal. 59 : 233-240

.

Mc Dougall B.M., Rovira A.D. 1970. Sites of exudation of ^{14}C-labelled compounds from wheat Roots. New Phytologist. 69 : 999-1003.

Mc Gill W.B., Cole C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma. 26 : 267-286.

Mc Laren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. Soil Biochemistry. 17 : 73-79.

McKenzie R.H., Dormaar J.F., Schaalje B.B., Stewart J.W.B. 1995.Chemical and biochemical changes in the rhizospheres of wheat and canola. Canadian Journal of Soil Science. 7 : 439-447.

McLaren R.G. 1975. Marginal sulphur supplies for grassland herbage in south-east Scotland. Agricultural Science. 85 : 571-573.

Meharg A.A., Killham K. 1988. A comparison of carbon flow from pre-labelled and pulselabelled plants. Plant Soil. 112 : 225-231.

Mench M., 1985. Exsudats racinaires solubles du maïs : incidence sur la dynamique des métaux lourd dans la rhizosphère. Thèse de doctorat, INPL, Nancy, 108 p.

Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and theirs possible ecological importance. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 162 : 787-796.

Metzenberg R.L., Parson J.W. 1966. Altered repression of some enzymes of sulfur utilization in a temperature-conditional lethal mutant of *Neurospora*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 55 : 629-635.

Miah M.Y., Kanazawa S., Chiu C.L. Hayashi H., Chino M. 2000. Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. Soil Sciences and Plant Nutrition. 46 : 787-796.

Mille-Lindblom C., Tranvik L.J. 2003. Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. Microbial Ecology. 45 : 173-182.

Mirleau P., Wogelius R., Smith A., Kertesz M.A. 2005. Importance of organosulfur utilization for survival of *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology. 71 : 6571-6577.

Mitsunaga-Nakatsubo, K., Akasaka, K. *et al.* 1998. Differential expression of sea urchin Otx isoform (HpOtxE and HpOtxL) mRNAs during early development. International Journal of. Developmental Biology. 42, 645-651**.**

Mol L. 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. II. Quantitative analysis of the luring effect of crops. European Journal of Plant Pathology. 101 : 679-685.

Morris S.J. 1999. Spatial distribution of fungal and bacterial biomass in southern Ohio hardwood forest soils: fine scale variability and microscale patterns. Soil Biology & Biochemistry. 31 : 1375-1386.

Mougel C., Offre P., Corberand T., Robin C., Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communites at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn cv. Jemalong J5. New Phytologist. 170 : 165-175.

Mounier E., Hallet S., Cheneby D., Benizri E., Gruet Y., Nguyen C., Piutti S., Robin C., Slezack-Deschaumes S., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. Environmental Microbiology. 6 : 301-312.

Murooka Y., Adachi T., Okamura H., Harada T. 1977. Genetic control of arylsulfatase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 130 : 74-81.

Murray R.P. 1985. Manual approaches to rapid microbiology results. Diagnostic Microbiology and infectious Disease. 3 : 95-145.

N

Natorff R., Sienko M., Brywczy J., Paszewski A. 2003. The *Aspergillus nidulans* metR gene encodes a bZIP protein which activates transcription of sulphur metabolism genes. Molecular Microbiology. 49 : 1081-1094.

Ndiaye E.L., Sandeno J.M., Mc Grath D., Dick R.P. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. American Journal of Alternative Agriculture. 15 : 26-36.

Nelson J.A., Lym R.G. 2003. Interactive effects of *Aphthona nigriscutis* and picloram and 2,4-D in leafy spurge (*Euphorbia esula*). Weed Science. 51 : 118-124.

Neumann G., Massonneau A., Martinoia E., Römheld V. 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. Planta. 208 : 373-382.

Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie. 23 : 375-396.

Nguyen C. 2007. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour la plante. Ecole Doctorale Ressources, Produits, Procédés, Environnement, Habilitation à Diriger des Recherches, Nancy. 136 pp.

Nicholls R.G., Roy A.B. 1971. Arylsulfatases. *In*: Boyer, P.D. (Ed), The Enzymes. Academic Press, New York. 5 : 21-41.

Niemi R.M., Vepsäläinen M. 2005. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. Microbiological Methods. 60 : 195-205.

Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H., 2002. Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. Journal of Experimental Botany. 53 : 1283-1304.

Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., McNicol J.W., Prosser J.I. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. Applied and Environmental Microbiology. 71 : 6784-6792.

Nye P. H., 1986. -Acid-base changes in the rhizosphere. Advances in Plant Nutrition, 2 : 129-1253.

O

Odham G., Tunlid A., Valeur A., Sundin P., White D.C. 1986. Model system for studies of microbial dynamics at exuding surfaces such as the rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology. 52 : 191-196.

Oger P., Petit A., Dessaux Y. 1997. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. Nature Biotechnology. 15 : 369-372.

P

Paietta, J.V., Akins, R.A., Lambowitz, A.M., Marzluf, G.A. 1987. Molecular cloning and characterization of the cys-3 regulatory gene of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology. 7 : 2506-2511.

Paietta J.V. 1989. Molecular cloning and regulator analysis of the arylsulfatase structural gene of *Neurospara crassa*. Molecular and Cellular Biology. 9 : 3630-3637.

Pankhurst C., Doube B.M., Gupta V.V.S.R (Eds). 1997. Biological Indicators of Soil Health. New Phytologist. 139 : 389-392.

Paterson E., Smit A., Standing D., Dorward M., Mc Donald A.J.S. 2006. Root exudation from *Hordeum vulgare* in response to localized nitrate supply. Experimental Botany. 57 : 2413-2420.

Paul C.L., Clark S.J. 1996. Cytosine methylation: Quantitation by automated genomic sequencing and genescan (tm) analysis. Bio Techniques. 21 : 126-133.

Pennanen T., Liski J., Bååth E., Kitunen V., Uotila J., Westman C.J., Fritze H. 1999. Structure of the microbial communities in coniferous forest soils in relation to site fertility and stand development stage. Microbial Ecology 38 : 168-179.

Petersen B., Chen S., Hansen C., Olsen C., Halkier B. 2002. Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. Planta. 214 : 562-571.

Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Hallet S., Germon J.C. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize planted soil. Applied and Environmental Microbiology. 68 : 6121-6128.

Phillips D.A., Fox T.C., King M.D., Bhuvaneswari T.V., Teuber L.R. 2004. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. Plant Physiology. 136 : 2887-2894.

Pollack K, Naeke A, Fischer R, Kohlhaas M, Pillunat L.E. 2008. Severe Aspergillus endophthalmitis occurring after liver transplantation in an 8-month-old baby. Ophthalmologe. 105:66-69.

Poll C., Pagel H., Devers-Lamrani M., Martin-Laurent F., Ingwersen J., Streck T., Kandeler E. 2010. Regulation of bacterial and fungal MCPA degradation at the soil–litter interface. Soil Biology & Biochemistry. 42 : 1879-1887.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 1999. Microbiologie (3ème Eds). DeBoeck Université (Ed.). Bruxelles, Belgique. 1014 pp.

Prietzel J., 2001. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany—seasonal variation and effect of $(NH_4)_2SO_4$ fertilization. Soil Biology & Biochemistry. 33 : 1317-1328.

Prikryl Z., Vancura V. 1980. Root exudates of plant. VI. Wheat root exudation as dependent on growth. Concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. Plant Soil. 57 : 69-83.

Q

Qiu, S., McComb, A.J., Bell, R.W., Davis, J.A., 2005. Response of soil microbial activity to temperature, moisture, and litter leaching on a wetland transect during seasonal refilling. Wetlands.Ecology.& Management. 13 : 43-54.

Quian J.H., Doran J.W. 1996. Available C released from crop roots during growth as determined by C^{-13} natural abundance. Soil Science Society of America Journal. 14 : 828-831.

R

Ranjard L., Poly F., Lata J.C., Mougel C., Thioulouse J., Nazaret S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. Applied & Environmental Microbiology. 67 : 4479-4487.

Rankovic. 2004. The fungal community of Lake Sjenica, Serbia. Journal of Freshwater Ecology. 19 : 325-322.

Rao M.A., Sannino F., Nocerino G., Puglisi E., Gianfreda L. 2003. Effect of air-drying treatment on enzymatic activities of soils affected by anthropogenic activities. Biology and Fertility of Soils 38 : 327-332.

Rausch T., Wachter A. 2005. Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations. Trends in Plant Sciences. 10 : 503-509.

Rayner A.D.M., Boddy L. 1988. Wood decomposition: its biology and ecology. Willey-Interscience Pub. Chichester. Pp 587

Renella G., Chaudri A.M., Brookes P.C. 2002. Fresh additions of heavy metals do not model long-term effects on microbial biomass and activity. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 1203-1210.

Rennenberg H, Polle A. 1994. rom oxidative stress in transformed plants. Biochemical Society Transactions. 22 : 936-940.

Rinaudo G., Aufeuvre M.A. Boureau M. 1978. Dispositif pour l'estimation de la fixation d'azote rhizosphérique en sol drainé ou engorgé. Cahiers O.R.S.T.OM., série Biologie., vol. XIII, n°2 : 165-170.

Rivière J. 1960. Etude de la rhizosphère du Blé. Annuel Agronomie. 11, 4: 397- 440.

Rovira A.D. 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV: Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation. Plant Soil 11. : 53-64.

Rovira A.D. 1969. Plant root exudates. The Botanical Review. 35 : 35-55.

Rovira A.D. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. Pesticide Science. 4 : 361-366.

Rovira A.D. 1969. Diffusion of carbon compounds away from wheat roots. Australian Journal. Biology Scinces. 22 : 1287-1290.

S

Safavi S.A., Shah F.A., Pakdel A.K., Reza Rasoulian G., Bandani A.R., Butt T.M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters. 270 : 116-123.

Saggar S., Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1981. Measurement of microbial sulphur in soil. Soil Biology & Biochemistry. 13 : 493-498.

Saito K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. Plant Physiology 136 : 2443-2450.

Scherer H.W. 2001. Sulphur in crop production. European Journal of Agronomy. 14 : 81-111.

Schindler S.C., Mitchell M.J. 1987. Dynamics of ^{35}S in horizons and leachates from a hardwood forest Spodosol. Soil Biology & Biochemistry. 19 : 531-538.

Schmalenberger A., Hodge S., Bryant A., Hawkesford M.J., Singh B.K., Kertesz M.A. 2008. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. Environmental Microbiology. 10 : 1486-1500.

Schmalenberger A., Kertesz M.A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria – high diversity of the *asf*A gene. Environmental Microbiology. 9 : 535-545.

Schmoll M., Esquivel-Naranjo E.U., Herrera-Estrella A. 2010. *Trichoderma* in the light of day : Physiology and development. Fungal Genetics and Biology. *in press*.

Schnug E., Haneklaus S. 1998. Diagnosis of sulphur nutrition. In: Schnug, E. and Beringer, H. (ed.): Sulphur in Agro-Ecosystems. The series Mineral Nutrition in Ecosystems, Kluwer Academic Publ. Dordrecht. 2: 1-38.

Scott W.A., Kenneth D. Munkres K.D., Metzenberg R.L. 1971. A particulate fraction from *Neurospora crassa* exhibiting aryl sulfatase activity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 142 : 623-632.

Scott W.A., Metzenberg R.L. 1970. Location of aryl sulfatase in conidia and young mycelia of *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology. 104 : 1254-1265.

Seegmuller S., Rennenberg H .2002. Transport of organic sulfur and nitrogen in the roots of young mycorrhizal pedunculate oak trees (*Quercus robur L.*). Plant Soil. 242 : 291-297.

Seif E., Leigh J., Liu,Y., Roewer I., Forget L., Lang B.F. 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: Bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in Angiosperms. Nucleic Acids Research. 33 : 734-744.

Semenov A.M., van Bruggen A.H.C., Zelenev V.V. 1999. Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. Microbial Ecology. 37 : 116–128.

Shepherd T., Davies H.V. 1993. Carbon loss from the roots of forage rape (*Brassica napus L.*) seedlings following pulse-labelling with $^{14}CO2$. Annals of Botany. 72 : 155-163.

Simon-Sylvestre G. 1960. L'enfouissement des pailles dans le sol. Etudes générales et répercussions sur la microflore du sol. Annales Agronomiques. 2 : 311-330.

Simon-Sylvestre G. 1969. Les sulfates solubles du sol. Annales Agronomiques. 25: 645-653.

Singh D.P., Backhouse D., Kristiansen P. 2009. Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal residues by fungal antagonists. Biological Control. 48 : 188-195.

Singh, B.R. 1984. Sulfate Sorption by acid forest soils: 2. Sulfate adsorption isotherms with and without organic matter and oxides of aluminium and iron. Soil Science. 138 : 257-319.

Sinsabaugh R.L., Lauber C.L., Weintraub M.N., Ahmed B., Allison S.D., Crenshaw C., Contosta A.R., Cusack D., Frey S., Gallo M.E., Gartner T.B., Hobbie S.E., Holland K., Keeler B.L., Powers J.S., Stursova M., Takacs-Vesbach C., Waldrop M.P., Wallenstein M.D., Zak D.R., Zeglin L.Y. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. Ecology Letters. 11 : 1252-1264.

Sinsabaugh R.L. 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. Biology and Fertility of Soils. 17 : 69-74.

Sinsabaugh R.L., Gallo M.E., Lauber C., Waldrop M., Zak D.R. 2005. Extracellular enzyme activities and soil carbon dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. Biogeochemistry. 75 : 201–215.

Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Applied and Environmental Microbiology. 67 : 4742-4751.

Smit E., Leeflang P., Gommans S., Van Den Broek J., Van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. Applied and Environmental Microbiology. 67 : 2284-2291.

Smit E., Leeflang P., Glandorf B., Van Elsas J.D., Wernars K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 65 : 2614-2621.

Smith F.W., Hawkesford M.J., Ealing P.M., Clarkson D.T., Van den Berg P.J., Belcher A.R., Warrilow A.G.S. 1997. Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. The Plant Journal 12 : 875-88.

Smith S.E., Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Biologia Plantarum. Vol 40 pp 787. Sparling G.P., Vojvodic-Vukovic M., Schipper L.A., 1998. Hot-water soluble C as a simple mesure of labile soil organic matter: the Relationship with microbial biomass C. Soil Biology & Biochemistry, 30, 1469-1472.

Speir T.W., Lee R., Pansier E.A. and Cairns A., 1980. A comparison of sulphatase, urease and protease activities in planted and fallow soils. Soil Biology & Biochemistry. 12 : 281–291.

Spencer B., Harada T. 1960. The role of choline sulphate in the sulphur metabolism of fungi. Journal of Biochemistry. 77 : 305-315.

Stark D., Milliken S., Marriott D., Harkness J. 2007. Rhizopodiformis sinus-orbital zygomycosis in an immunosuppressed patient : successful treatment with posaconazole after a complicated clinical course. Journal of Midical Microbiology. 56 : 599-701.

Steenhoudt O., Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews. 24 : 487–506.

Steenkamp E.T., Wright J., Baldauf S.L. 2006. The protistan origins of animals and fungi. Molecular Biology and Evolution. 23 : 93-106.

Steinberger Y., Degani R., Barness G. 1995. Decomposition of root litter and related microbial population dynamics of a Negev Desert shrub, *Zygophyllum dumosum*. Arid Environments. 31 : 383-399.

Stevenson F.J., Cole M.A. 1999. The sulfur cycle. In : Stevenson F.J., Cole M.A. (Eds) . Cycle of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. Wiley J. and Sons, New York. pp. 340-348.

Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli, India. p14.

Stromberger M.E., Klose S., Ajwa H., Trout T., Fennimore S. 2005. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. Soil Science Society of America. 69 : 1987-1999.

Strong D.T., De Wever H., Merckx R., Recous S. 2004. Spatial location of carbon décomposition in the soil pore system. European Journal of Soil Science. 55 : 739-750.

Studer R. 1984. Le soufre, élement fertilisant secondaire. Techniques Agricoles. 1270 : 1-6.

Subba Rao N.S. 1999. Sulphur, phosphorus and trace element nutrition. In: Soil Microbiology, 4th Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth. Science Publishers, Inc., USA, pp. 265-292.

Suhardi. 1992. Importance du soufre organique du sol dans la nutrition soufrée du blé (*Triticum aestivum L.).* Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France, pp. 147.

Svenningsson H., Sundin P., Liljenberg. 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedling exposed to water-deficit stress. Plant and Cell Environment. 13 : 155-162.

Swinnen J.J.A., Van Veen., Merckx R. 1995. Carbon fluxes in the rhizosphere of winter wheat and spring barley with conventional vs integrated farming. Soil Biology & Biochemstry. 27 : 811-820.

Swinnen J., van Veen J.A., Merckx R. 1994. Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: model calculations based on ^{14}C partitioning after pulse-labelling. Soil Biology & Biochemistry. 27 : 211-217.

T

Tabatabai M.A. 1994. Soil enzymes. *In*: Weaver R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicek D., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. (Eds). Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America Journal. Book Madison. Series 5. pp. 775-833

Tabatabai, M.A. 1986. Sulphur in Agriculture. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, America. Pp 428.

Tabatabai M.A. 1984. Importance of sulphur in crop production. okBiogeochemistry. 1 : 45-62.

Tabatabai M.A., Al-khafaji A.A. 1980. Comparison of nitrogen and sulphur mineralization in soils. Soil Science Society of America Journal. 44 : 1000-1006.

Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology & Biochemistry. 4 : 479-487.

Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Forms of sulfur and carbon, nitrogen and sulphur relationships in Iowa soils. Soil Science. 114 : 380-386.

Tan Z., Mc Laren R.g., Cameron K.C., 1994. Forms of sulfur extracted from soils after different methods of sample preparation. Australian Journal of Soil Research. 32 : 823-834.

Taureau J.C., Thevenet G., Bordeaux J.L., Defroberville G. 1987. Réponses des cultures à la fertilisation soufrée, une méthode d'approche: le cas du blé d'hiver en terres de Groie étudié en 1986. Perspectives Agricoles. 111 : 23-43.

Tausz M., Gullner G., Komives T., Grill D. 2003. Role of thiols in plant adaptation to environmental stress. In: Abrol Y. P., Ahmad A. (eds.) Sulphur in plants. Kluwer Publishers, Dordrecht. 221-244.

Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biology & Biochemistry. 34 : 387-401.

Thormann M.N., Currah R.S., Bayley S.E. 2003. Succession of microfungal assemblages in decomposing peatland plants. Plant Soil. 250 : 323–333.

Thorn G. 1997. The fungi in soil. In: Van Elsas J.D, Wellington E.M.H, Trevors S.T (Eds). Modern Soil Microbiology, New York: Marcel Dekker. pp. 63–127.

Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P.J., Bucking H., Shachar-Hill Y. 2010. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. Plant Physiology. 153 : 1175-1187.

Torsvik V., Salte K., Sorheim R., Goksoyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in population of soil bacteria. Applied & Environmental Microbiology. 56 : 776-781.

Traoré O., Groleau-Renaud V., Plantureux S., Tubeileh A., Boeuf-Tremblay V. 2000. Effect of root mucilage and modelled root exudates on soil structure. European Journal of Soil Science. 51 : 575-581.

Treonis A.M., Ostle N.J., Stott A.W., Primrose R., Graystone S.J., Ineson, P. 2004. Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope prob- ing of PLFAs. Soil Biology.& Biochemistry., 36, 533-537.

Treseder K.K. 2005. Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO2. *In*: Dighton J., Oudemans P., White J (Eds), The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem. Marcel Dekker. pp. 713:731

U

Uren N.C. 1982. Chemical reduction at the root surface. Plant Nutrition. 5 : 4-7.

V

Valero A., Sanchis V., Ramos A.J., Marin S. 2008. Brief in vitro study on *Botrytis cinerea* and *Apergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. Letters in Applie Microbiology. 47 : 327-332.

Valton J., Fontecave M., Douki, T., Kendrew S.G., Nivière V. 2006. An aromatic hydroxylation reaction catalyzed by a two-component FMN-dependent monooxygenase: The ActVA-ActVB system from *Streptomyces coelicolor*. Journal of Biological Chemistry. 281 : 27-35.

Van De Kamp M., Pizzinini E., Vos A., Van Der Lende T.R., Schuurs T.A., Newbert R.W., Turner G., Konings W.N., Driessen A.J.M. 1999. Sulfate transport in *Penicillium chrysogenum*: Cloning and characterization of the sutA and sutB genes. Journal ofBacteriology. 181 : 7228-7234.

Van De Kamp M., Schuurs T.A., Vos A., Van Der Lende T.R., Konings W.N., Driessen A.J.M. 2000. Sulfur regulation of the sulfate transporter genes sutA and sutB in *Penicillium chrysogenum*. Applied and Environmental Microbiology 66 : 4536-4538.

Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature. 396 : 69-72.

Van der Putten W.H. 2003. Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. Ecology. 84 : 2269-2280.

Van Elsas J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. Microbiological Methods. 43 : 133-151.

Van Elsas, J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. 2000. Analysis of the dynamics of fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Microbiol. Methods 43:133-151.

Van Hoof N.A.L.M., Koevoets P.L.M., Harvoort H.W.J., Ballintijn K.F., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O., Karenlampis O., Tervahauta A.I. 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) garcke populations from copper mines is associated with increase transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. Plant Physiology. 126 : 1519-1526.

Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology & Biochemistry. 19 : 703-707.

Vancura V., Prikryl Z., Kalachov L., Wurst M. 1977. Some quantitative aspects of root exudation. Ecological Bulletins. 25 : 381-386.

Vargas Gil, S., Pastor, S., March, G.J. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. Microbiological Research. 164 : 196-205.

Vaughan D, Lumsdon D.G., Linehan D.J. 1993. Influence of dissolved organic matter on the bio-availability and toxicity of metals in soils and aquatic systems. Chemical Ecology. 8 : 185-201.

Verkleij J.A.C, Sneller F.E.C., Schat H. 2003. Metallothioneins and and phytochelatins: ecophysiological aspects. *In*: Abrol Y , Ahmad A (Eds), Sulphur in Plants. Dordrecht The Netherlands pp 163-176.

Vermeij P., Wietek C., Kahnert A., Wüest T., Kertesz M.A. 1999. Genetic organization of sulfur-controlled aryl desulfonation in *Pseudomonas putida* S-313. Molecular Microbiology. 32 : 913-926.

Viebahn M., Doornbos R., Wernars K., Van Loon L.C., Smit E., Bakker P.A.H.M. 2005. Ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat are not affected by introductions of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. Environmental Microbiology. 7 : 1775-1785.

Vidal S., Salmon J.M., Williams P., Pellerin P. 1999. *Penicillium daleae*, soil fungus able to degrade rhamnogalacturonan II, a complex pectic polysaccharide. Enzyme and Microbial Technology. 24 : 283-290.

Vinten A.J.A., Whitmore A.P., Bloem J., Howard R., Wright F. 2002. Factors affecting N immobilisation/mineralisation kinetics for cellulose-, glucose- and straw-amended sandy soils. Biology and Fertility of Soils.36 : 190-199.

Vong PC., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2002. Mobilization of labeled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizophere soil. Journal of Plant Nutrition. 25: 2191-2204.

Vong PC., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. Soil Biology & Biochemistry. 35 : 1651-1661.

Vong PC., Dedourge O., Guckert A. 2004. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. Plant and Soil. 258 : 227-239.

Vong P.C., Nguyen C., Guckert A., 2007a. Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type. European Journal of Agronomy. 27 : 35-43.

Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007b. Watersoluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. Plant Soil. 294 : 19-29.

Vong P.C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Benizri E., Guckert A. 2008. Sulphur immobilization and arylsulphatase activity in two calcareous arable and fallow soils as affected by glucose additions. Geoderma. 148 : 79-84.

Vujanovic V., Hamelin R.C., Bernier L., Vujanovic G., St-Arnaud M. 2007. Fungal diversity, dominance and community structure in the rhizosphere of clonal *Picea mariana* plants throughout nursery production chronosequences. Microbial Ecology. 54 : 672-684.

W

Walker K., Dawson C. 2002. Sulphur fertiliser recommendations in Europe. Proceedings No. 504. International Fertiliser Society York, UK.20 pp.

Wallenstein M.D., Weintraub M.N. 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. Soil Biology & Biochemistry. 40 : 2098-2106.

Wallenstein, M.D., McNulty, S., Fernandez, I.J., Boggs, J., Schlesinger, W.H.2006. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. Forest Ecology and Management. 222 : 459-468.

Waldrop M.P., Firestone M.K. 2004. Altered utilization patterns of young and old soil C by microorganisms caused by temperature shifts and N additions. Biogeochemistry 67: 235-248.

Wardle D.A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. Biological Reviews. 67: 312–358.

Warembourg F.R. 1975. Applications de techniques radioisotopiques à l'étude de l'activité biologique dans la rhizosphère des plantes. Revue d'Ecologie et de Biologie des Sols. 12 : 261-272.

Warembourg F.R., Estelrich H.D. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on belowground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. Soil Biology & Biochemistry. 33 : 1291-1303.

Waschütza S., Hofman N., Nieman E.G., Fendrich I. 1992. Investigations on root exudates of Korean rice. Symbiosis. 13 : 181-189.

Wheatley R., Ritz K., Griffiths B. 1990. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. Plant Soil. 127 : 157-167.

Whipps J.M. 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedlings grown in soil. Plant Soil. 103 : 95-100.

Whipps J.M. 1990. Carbon economy. In: The Rhizosphere., Lynch J.M. Mitchell J.M. (Eds) Wiley and Sons., Chichester. pp. 59-97.

Whipps J.M., Lynch J.M. 1983. Substrate flow and utilization in the rhizosphere of cereals. New Phytologist. 95 : 605-623.

White R.E., 2006. Principles and practice of soil science: the soil as a natural resource. 4th Edition. By R. E. White. Oxford: Blackwell Publishing.

White S., McIntyre M., Berry D.R., McNeil B. 2002. Te autolysis of industrial filamentous fungi. Critical Review of Biotechnology. 22 : 1-14.

Wirtz M., Droux M., Hell R. 2004. O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 55 : 1785-1798.

Wrigley C.W., Du Crous D.L., Fullington J.G., Kasarda D.D. 1984. Changes in polypeptide compostion and grain quality due to sulfur deficiency in wheat. Journal of Cereal Sciences. 2 : 15-24.

Wu J., O'Donnell A.G., He Z.L., Syers J.K. 1994. Fumigation – extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. Soil Biology & Biochemistry. 26 : 117-125.

X

Xu J.G., Juma N.G. 1993. Above-and below-ground transformation of photosynthetically fixed carbon by two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in a typic cryoboroll. Soil Biology & Biochemistry. 25 : 1263-1272.

Y

Young M. 1998. Biophysical interactions at the root–soil interface: a review. The Journal of Agricultural Science. 130 : 1-7.

Z

Zagal E. 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system with barley (*Hordeum vulgare* L.), ryegrass(*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a14CO2 atmosphere. *Plant and Soil* 166, 63-74.

Zhang C.L., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., Xu T., 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a north to south distribution of species in East Asia. FEMS Microbiology Letters. 251 : 251-257.

Zhang F.S., Ma J., Cao Y.P. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of lowmolecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raghanus sativus L.*) and rape (*Brassica napus L.*) plants. Plant Soil. 196 : 261-264.

Zhao F., McGrath S.P. 1994. Comparison of sulphur uptake by oilseed rape and the soil sulphur status of two adjacent fields with different soil series. Soil Use and Management. 10 : 47-50.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., Warrilow A.G.S., McGrath S.P., Clarkson D.T. 1996. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. Plant Soil. 181 : 317-327.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. Journal of Cereal Science. 30 : 1-17.

Zhao FJ, McGrath SP, Blake-Kalff MMA, Link A, Tucker M. 2002. Crop responses to sulphur fertilisation in Europe. Proceeedings N° 504, International Fertiliser Society, York, UK, 27pp.

Zhao F.J., Lehmann J., Solomon D., Fox M.A., McGrath S.P. 2006. Sulphur speciation and turnover in soils: evidence from sulphur K-edge XANES spectroscopy and isotope dilution studies. Soil Biology & Biochemistry. 38 : 1000-1007.

Zhou W., He P., Li S., Lin B. 2005. Mineralization of organic sulphur in paddy soils under flooded conditions and its availability to plants. Geoderma. 125 : 85-93.

Zürrer D., Cook A.M., Leisinger T. 1987. Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids. Applied and Environmental Microbiology. 53 : 1459-1463.

Zwikel S., Lavee H., Sarah P. 2007. Temporal dynamics in arylsulfatase enzyme activity in various microenvironments along a climatic transect in Israel. Geoderma. 140 : 30-41.

ANNEXES

Sommaire des tableaux

Tableau 1 : Composition des exsudats de colza (d'après Haggquist *et al*., 1984 ; Odham *et al*., 1986 ; Zhang *et al*., 1997) et d'orge (d'après Guckert 1985 ; Mench 1989)

Tableau 2 : Exigences des plantes en S (d'après Taureau *et al*., 1987)

Tableau 3 : Grille de décision d'un apport de soufre sur céréales d'hiver et de printemps (cas des situations sans apports réguliers de fumier), selon ARVALIS Institut du végétal

Tableau 4 : Exemples de sulfatases caractérisées chez des Eucaryotes inférieurs et des Procaryotes (d'après Hanson *et al*., 2004 ; Hagelueken *et al*., 2006)

Tableau 5 : Fonctions écologiques remplies par les communautés microbiennes du sol (d'après Giller *et al*., 1997)

Tableau 6 : Analyse physico-chimique du sol de Martincourt réalisée par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras

Tableau 7 : Conditions de culture en phytotron

Tableau 8 : Composition de la solution nutritive (d'après Hoagland et Arnon, 1938 ; Streiff, 1997)

Tableau 9 : Dates des prélèvements de sols rhizosphériques et stades de développement des plantes

Tableau 10 : Composition du milieu Czapek modifié

Tableau 11 : Composition de la solution de Heller

Tableau 12 : Volumes des réactifs et conditions d'incubation pour le dosage des activités ARS intracellulaire, extracellulaire et membranaire

Tableau 13 : Couples d'amorces testées pour l'amplification de l'ADNr 18S

Tableau 14 : Séquences des amorces ITS1F et 3126T

Tableau 15 : Séquences, températures d'hybridation des différentes amorces dégénérées et taille des fragments attendus pour les différentes combinaisons d'amorces

Tableau 16 : Conditions de PCR utilisées

Tableau 17 : Affiliation taxonomique des 23 types RFLP identifiés (C : rhizosphère de colza ; O : rhizosphère d'orge)

Tableau 18: Activité ARS de souches fongiques appartenant aux 23 types RFLP identifiés dans les rhizosphères de colza et d'orge

Tableau 19 : Compartimentation cellulaire de l'activité ARS après croissance en conditions limitantes en S *(où E : activité ARS extracellulaire ; I : activité ARS intracellulaire ; M : activité ARS membranaire)*
Tableau 20 : Récapitulatif des activités ARS intracellulaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

Tableau 21 : Récapitulatif des activités ARS membranaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

Tableau 22 : Récapitulatif des activités ARS membranaires, pour les différents types RFLP, en réponse à la disponibilité en S du milieu de culture

Tableau 23 : Induction de l'activité ARS dans différents compartiments cellulaires en réponse à la présence d'un ester de S. *En rouge, sont indiquées les modifications de profils d'activité observées*

Tableau 24 : Séquences, températures d'hybridation des différentes amorces dégénérées utilisées en PCR pour identifier des séquences ARS et taille des fragments attendus pour les différentes combinaisons d'amorces

Tableau 25 : Homologie des séquences ARS, en acides aminés, avec les séquences de référence

Tableau 26 : Pourcentages des activités ARS intracellulaires et extracellulaires sur les activités totales durant les stades végétatifs et de reproduction

Tableau 27 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$

Tableau 28 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables sous colza, orge et/ou sol nu

Tableau 29 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées en sol nu (T1 à T4, n=16)

Tableau 30 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées sous orge (T1 à T4, n=16)

Tableau 31 : Coefficients de corrélation (R) entre les différentes variables mesurées sous colza (T1 à T4, n=16)

Sommaire des figures

Figure 1 : Les voies d'absorption de S par les plantes (voies foliaire et racinaire) P 24

Figure 2 : Flux transmembranaires des sulfates (d'après Buchner *et al*., 2004) P 26

Figure 3 : Assimilation du S dans les compartiments sub-cellulaires des cellules végétales (d'après Saito *et al*., 2004). P 27

Figure 4 : Emissions de SO_2 atmosphérique en France métropolitaine (CITEPA, 2008) P 30

Figure 5 : Différentes formes de S dans trois types de sol (d'après Mirleau *et al*., 2005) P 34

Figure 6 : Transformations du soufre dans les sols P 35

Figure 7 : Mécanisme de désulfonatation des sulfonates aliphatiques (d'après Kertesz, 1999) P 37

Figure 8 : Exemple d'un ester de sulfate aliphatique P 39

Figure 9 : Exemple d'un ester de sulfate aromatique, le *p*-nitrophényl sulfate P 39

Figure 10 : phylogénique des champignons (d'après Seif *et al*., 2005 ; James *et al*., 2006a,b ; Liu *et al*., 2006 ; Steenkamp *et al*., 2006) P 43

Figure 11 : Voie d'assimilation du soufre chez *Neurospora crassa* (d'après Borkovich *et al*., 2004) P 46

Figure 12 : Schéma récapitulatif des analyses réalisées pour l'expérimentation en phytotron P 59

Figure 13 : Représentation du dispositif et des prélèvements réalisés pour l'expérimentation au champ P 60

Figure 15 : Isolement et caractérisation taxonomique de la communauté fongique fonctionnelle possédant une activité ARS. P 63

Figure 16 : Caractérisation fonctionnelle des souches fongiques possédant une activité ARS P 64

Figure 17 : Formule chimique du 5 bromo-4-chloro-3-indoyl sulfate (X-Sulf). P 72

Figure 18: Organisation de l'unité ribosomique chez les champignons et position des amorces P 74

Figure 19 : Analyse de la structure génétique de la communauté fongique globale du sol P 76

Figure 20 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés fongiques rhizosphériques sous couvert de colza et d'orge, tous temps confondus (A) et en considérant les 5 temps de prélèvements (B). P 90

Figure 21 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés fongiques rhizosphériques sous couvert d'orge (A) et de colza (B) P 91

Figure 22 : Evolution de la densité des champignons cultivables possédant l'activité ARS sous couvert de colza (A) et d'orge (B) P 95

Figure 23 : Régression linéaire entre l'activité ARS totale et la densité de champignons cultivables possédant l'activité ARS, sous couvert de colza (A) et d'orge (B) P 96

Figure 24 : Cinétique de croissance radiale des isolats affiliés aux genres : *Bionectria* R3 (A), *Aspergillus* R19 (B) et *Trichoderma* R18 (C), en présence de différentes concentrations en sulfates (0 à 10 mM) P 111

Figure 25 : Récapitulatif des temps de latence (Lag_{time}) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM) P 112

Figure 26 : Récapitulatif des taux de croissance (K) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM) P 113

Figure 27 : Récapitulatif des diamètres maximaux (Dmax) pour les différents types RFLP, en fonction de la concentration en sulfates du milieu (0 à 10 mM) P 114

Figure 28 : Profils des activités ARS intracellulaire (I), membranaires (M) et extracellulaires (E), pour les différents types RFLP cultivés en conditions de carences en S P 120

Figure 29 : Alignement à partir de *Multalin*, des séquences ARS de souches fongiques de référence, utilisées pour dessiner les amorces. Les différents couples d'amorces sont positionnés sur ces séquences P 130

Figure 30 : Evolution des teneurs en carbone hydrosoluble des racines de colza et d'orge P 143

Figure 31 : Evolution des masses sèches des parties racinaires pour le colza et l'orge P 144

Figure 32 : Evolution des teneurs en carbone soluble des sols P 145

Figure 33 : Evolution des biomasses carbonées, biomasses azotées et des rapports BMC/BMN. P 146

Figure 34 : Evolution de la taille de la communauté fongique totale cultivable P 147

Figure 35 : Evolution de la taille de la communauté fongique fonctionnelle cultivable P 150

Figure 36 : Evolution des activités ARS totale, extracellulaire et intracellulaire P 151

Figure 37 : Evolution des teneurs nettes en sulfates dans les trois sols P 156

Figure 38 : Evolution des activités nettes ARS dans les trois sols P 158

Figure 39: Corrélations entre la production nette en sulfates et les activités ARS nettes intracellulaires, dans les trois types de sol P 161

Figure 40 : Analyse en Composantes Principales des relevés réalisés sous couvert de colza, d'orge et en sol nu P 163

Figure 41 : Cercle de corrélation des variables explicatives dans le plan factoriel CP1-CP3 P 164

Figure 42 : Rapport R/S (rapport du nombre d'UFC g^{-1} sol sec cultivables, totales ou fonctionnelles, sur le nombre d'UFC g^{-1} sol sec en sol non rhizosphérique) de T1 à T4 P 165

Figure 43 : Analyse en Composantes Principales des relevés réalisés sous couvert de colza, d'orge et en sol nu P 167

Figure 44 : Cercle de corrélation des variables explicatives dans le plan factoriel CP1-CP2 P 168

Sommaire des photographies

Photographie 1 : Mise en évidence de déficiences en S sur une culture de colza (CETIOM, 2006). La carence en S provoque un jaunissement des parties foliaires (A) et un avortement des fleurs (B). P 28

Photographie 2 : Symptômes de carences en soufre sur une culture de blé (Zhao *et al*., 2006). La carence en S provoque un jaunissement des parties foliaires (-S) comparativement aux plantes non carencées (+S). P 29

Photographie 3 : Dispositif expérimental des essais réalisés en phytotron (A : orge, B : colza) P 54

Photographie 4 : Les stades de développement de Colza (A) et de l'orge (B) P 57

Photographie 5 : Colonies fongiques après étalement sur milieu Czapek-X-Sulf. Les colonies bleues possèdent l'activité ARS P 72

Photographie 6 : Isolat fongique possédant l'activité ARS sur milieu Czapek-X-Sulf P 72

Photographie 7 : Estimation de la croissance journalière d'une colonie fongique par mesure du diamètre P 80

Photographie 8 : Exemples d'un étalement (A) à partir d'une suspension-dilution de sol et d'une souche fongique isolée (B) sur le milieu Czapek modifié. Les colonies fongiques présentant une activité ARS présentent une coloration bleue P 94

Photographie 9 : Exemple d'analyse en gel d'électrophorèse des produits d'amplification obtenus en utilisant les amorces EF4-Fung5. P 98

Photographie 10 : Profils de digestion du fragment d'ADNr 18S obtenu avec les enzymes de restriction *Hinf*1 et *Rsa*1. P 99

Photographe 11 : Exemple de gel d'électrophorèse obtenu après amplification d'un fragment ARS par PCR à partir d'ADN extrait de souches fongiques, à l'aide des amorces ARF4/ARF6. P 131

Sommaire des schimas

Schéma 1 : Contribution des communautés fongiques possédant l'activité ARS à la minéralisation du S et à la nutrition soufrée de la plante p 49

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Sylvie RECOUS, Directeur de Recherche, INRA, Reims

Monsieur Christian STEINBERG, Directeur de Recherche, INRA, CMSE, Dijon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame HAMDAN Lama

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Caractérisation de la communauté fongique impliquée dans la minéralisation du soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Sciences Agronomiques »**

Fait à Vandoeuvre, le 03 novembre 2010
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé :
En Europe de l'Ouest, S est devenu un élément limitant pour la croissance des plantes. Ainsi, des carences en S apparaissent de plus en plus fréquemment sur des cultures tel que le colza. Dans le sol, 95% de S est sous formes organiques, non disponibles pour les plantes. L'intervention de la microflore est indispensable pour assurer la minéralisation du S organique en sulfates, assimilables par la plante. Nos objectifs ont été de caractériser la communauté fongique impliquée dans la minéralisation des esters de S, forme majoritaire de S organique, via une activité arylsulfatase (ARS), dans les rhizosphères de colza et d'orge.
La communauté fongique est composée de plusieurs genres affiliés principalement aux Ascomycètes. Chez les souches fongiques isolées de la rhizosphère de colza et d'orge, une activité ARS a été détectée dans différents compartiments cellulaires. La régulation de ces activités ARS semble dépendante du taxon considéré. Nous avons par ailleurs montré que l'environnement rhizosphérique n'influence pas toujours la taille de la communauté fongique ARS. Dans les sols, si les activités ARS totale et intracellulaire semblent négativement corrélées avec les quantités de sulfates, l'activité ARS extracellulaire semble indépendante de la disponibilité en sulfates.
En conclusion, l'ensemble des expérimentations suggère que la communauté fongique fonctionnelle joue un rôle dans la dynamique du S dans les sols agricoles**.** Des approches d'écologie fonctionnelle permettraient de mieux cerner leur implication dans la disponibilité en S minéral pour la plante.

Mots-clefs : arylsulfatase, esters de sulfate, communauté fongique fonctionnelle, rhizosphère, colza, orge.

Abstract :
In Western Europe, sulfur (S) deficiency occurs in certain crops, including crucifers and cereals. Therefore, S becomes limiting for crop production and plants exhaust S mainly from soil organic S. In soil, 95% of S is in organic form that is not readily available for plants. This organic form containing principally ester S requires microbial mineralization to sulfate by arylsulfatase (ARS) enzyme. Our objectives were to characterize the fungal community having the ARS activity in the rhizosphere of rape versus that of barley.
Functional fungal community comprised several genera principally belonging to *Ascomycota*. In different fungal strains, ARS activity was detected in different cellular compartments. The regulation of ARS was mostly dependent on microbial taxa. The density of the functional fungal community was not influenced by rhizospheric compartment.
In soils, total and intracellular ARS activities were negatively correlated with soil sulfates whereas soil extracellular ARS activity was independent of sulfates.
The overall results suggest that the functional fungal community could play a role in the dynamics of S in agricultural soils. Further approaches should be developed to allow a better understanding of their potential involvement in S nutrition of crops.

Key words: arylsulfatase, sulfate esters, functional fungal community, rhizosphere, rape, barley