



Université de Caen
Basse-Normandie

UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

THESE

Présentée par

Sébastien VARIN

Et soutenue à Caen le **20 / 03 / 2009**

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
(Arrêté du 7 août 2006)



Titre :

**Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc
en réponse à la disponibilité en soufre.**

MEMBRES DU JURY :

Mme Marie-Laure NAVAS, Professeur, SupAgro, Montpellier

Mr Jean-François SOUSSANA, Directeur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand.

Mr Bernard AMIAUD, Maître de Conférences, ENSAIA, Nancy

Mr Frédéric LE DILY, Professeur, Université de Caen

Mme Servane LEMAUVEL-LAVENANT, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Jean-Bernard CLIQUET, Maître de Conférences, Université de Caen

(Rapporteur)

(Rapporteur)

(Examineur)

(Examineur)

(Examineur)

(Directeur de Thèse)



Université de Caen
Basse-Normandie

UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

THESE

Présentée par

Sébastien VARIN

Et soutenue à Caen le **20 / 03 / 2009**

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
(Arrêté du 7 août 2006)



Titre :

**Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc
en réponse à la disponibilité en soufre.**

MEMBRES DU JURY :

Mme Marie-Laure NAVAS, Professeur, SupAgro, Montpellier

Mr Jean-François SOUSSANA, Directeur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand.

Mr Bernard AMIAUD, Maître de Conférences, ENSAIA, Nancy

Mr Frédéric LE DILY, Professeur, Université de Caen

Mme Servane LEMAUVEL-LAVENANT, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Jean-Bernard CLIQUET, Maître de Conférences, Université de Caen

(Rapporteur)

(Rapporteur)

(Examineur)

(Examineur)

(Examineur)

(Directeur de Thèse)

R Remerciements

Les recherches présentées dans ce mémoire ont été effectuées au sein du laboratoire EVA où se côtoie de nombreux savoirs scientifiques (écologique, physiologique) et modes de pensées. Ce milieu nutritif intellectuel a permis l'élaboration de ce travail.

Les Directeurs

Je tiens à remercier Messieurs les Professeurs Alain OURRY et Frédéric LE DILY, directeurs de l'UMR-INRA-UCBN 950 d'Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N.C.S. de l'université de Caen, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire où j'ai pu effectuer mon stage de « Master 2 Recherche » puis réaliser ces travaux de thèse dans des conditions admirables. Je les remercie également de m'avoir permis d'obtenir une allocation de recherche du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, d'avoir mis à ma disposition les moyens techniques dont ils disposaient.

Les Rapporteurs

Je suis sensible à l'honneur que me fait Madame le Professeur Marie-Laure NAVAS d'être rapporteur de ce mémoire.

Que Monsieur le Docteur Jean-François SOUSSANA soit assuré de mes sentiments reconnaissants pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Le Jury et Examineurs

Je voudrais également remercier vivement, Monsieur Bernard AMIAUD pour l'intérêt qu'il m'a manifesté et pour avoir accepté de participer au jury. Je remercie Monsieur le Professeur Frédéric LE DILY qui a accepté de juger ce travail.

L'Encadrement

Je tiens à remercier vivement Monsieur Jean-Bernard CLIQUET et Madame Servane LENAUVIEL-LAVENANT qui ont bien voulu diriger mes travaux, pour m'avoir guidé dans mes premiers pas de chercheur et pour leurs grandes patiences, compétences, rigueurs, créativité et efficacités scientifiques qui ont été pour moi exemplaires.

Je vous dois à tous deux un style de travail qui me sera d'un profit inestimable au-delà des expériences présentes et que ce travail soit pour moi l'occasion de vous témoigner ma très respectueuse reconnaissance. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance dont vous avez toujours fait preuve à mon égard.

Je remercie tout particulièrement Jean-Bernard pour m'avoir immergé dans la recherche et fait connaître de nouvelles techniques pour me permettre de mieux organiser mes idées, mais également pour m'avoir insufflé la connaissance utilisant les isotopes stables.

Servane trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance, non seulement pour les nombreux conseils, éclairages et suggestions dont tu m'as fait bénéficier, mais aussi, pour la bienveillance dont tu as constamment fait preuve à mon égard. Et pour m'avoir initié à l'écologie fonctionnelle et au travail de recherche depuis le « Master 2 Recherche ». Je te remercie également de m'avoir « serré la vis » de sorte d'éviter que les idées ne débordent et ne s'égarent lors des journées de valorisations de ce travail et des différentes expérimentations qui ont composé ce projet.

L'Equipe

Je tiens également à exprimer tout particulièrement ma gratitude aux personnes suivantes : Emmanuelle PERSONENI, Virginie SEGUIN, Tiphaine TALLEC, Sylvain DIQUELOU, Romain GUILLEMIN, Fabien LESUFFLEUR, Benjamin LEVEEL, composant l'équipe Ecologie Interaction plante-plante, pour l'encadrement général qu'ils m'ont apporté tout au long de ce travail.

Je voudrais dire toute ma gratitude et l'assurance de ma sincère reconnaissance à Tiphaine TALLEC et Benjamin LEVEEL qui furent de précieux collaborateurs et sont de très cher(e)s ami(e)s. Je voudrais également remercier Jessica BRYANT et Laurence CANTRILL pour les corrections en Anglais des articles de ma thèse.

Les Collaborateurs

Je tiens à remercier le personnel de la station INRA du Pin au Haras dans l'Orne, qui mit à notre disposition des parcelles de cultures pour les études de l'équipe Ecologie Interaction plante-plante dont j'ai pu bénéficier lors de mes recherches.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Terence MICHAELSON-YEATES de « l'Institute of Grassland and Environmental Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Ceredigion, United Kingdom », pour nous avoir fourni des graines de trèfles de lignées autofécondes ayant des différences dans leur capacité d'acquisition de l'azote qui ont pu initier ce travail. Qu'il trouve ici mes plus vifs remerciements pour s'être intéressé à mes recherches.

Que Jean-Christophe AVICE et Emmanuelle PERSONENI soient assurés de ma reconnaissance pour leurs aides techniques dans les domaines de la protéomique et des méthodes d'études de parties souterraines végétales et les relectures qui ont contribué à ce manuscrit. Je remercie également Hugues RENAULT Thésard de l'université de Rennes pour les quelques analyses d'acides aminés en ULC (Chromatographie Liquide en Ultra haute pression).

Mes remerciements s'adressent aussi à Anne Françoise AMELINE (Pour les Récoltes et pour la surveillance des phytopathogènes), Marie-Paule BATAILLE (pour l'IRMS), Michelle COUSTENOBLE (pour tous les services et l'aide précieuse qui ont été fournis), Josiane PICHON (pour tous les services et l'aide précieuse qui ont été fournis avec Michelle), Sandrine REZE, Dominique BALLOIS (pour l'aide technique), Patrick BEAUCLAIR (pour la Gestion du climat et les mesures de photosynthèses), Raphaël SEGURA (pour l'IRMS et pour la surveillance des phytopathogènes), pour leurs appuis techniques à la réalisation de ce travail dont les compétences et les connaissances techniques ont facilité cet ouvrage et bien évidemment leurs enthousiasmes et la vitalité qu'ils m'ont apporté au quotidien.

L'Administration

Que le personnel administratif du laboratoire (Christine GOURBE avant son départ et de façon générale au cours de ces années passées au laboratoire) soit remercié pour l'amabilité dont il a fait preuve à mon égard.

Les Coups de pouce

Je voudrais également remercier Messieurs les Professeurs Jean-Pierre BILLARD pour son aide et son intérêt constant au développement de ma recherche, Claude HUAULT et Marie-Pascale PRUD'HOMME pour m'avoir transmis leur passion de la « biologie végétale ».

Mes plus sincères remerciements vont à Mesdames Annette BERTRAND, Marie-Laure DECAU, Emmanuelle PERSONENI, Marie-Pascale PRUD'HOMME, et Messieurs Jean-Christophe AVICE, Philippe ETIENNE, Philippe LAÏNE, Frédéric LE DILY, Erwan LE DUNFF, Frédéric MEURIOT et Jean-Claude SIMON pour les discussions, entretiens fructueux que nous avons

eus ensemble.

A tous ceux qui m'ont aidé moralement et culturellement au cours de ces recherches. Je désire apporter mes remerciements très cordiaux aux différentes cohortes du labo. Merci aux membres du Club des tricoteuses. Je trinque en l'honneur des membres de la confrérie du « saucisson bière ». J'exprime ma profonde salutation aux adeptes de la « déesse Fabacée » qui nous fait souffrir avec ces nodules, passionne et interpelle sur les difficultés que cette famille de plante peut avoir dans sa vie courante. Merci Bok Rye LEE, Gorka ERICE SOREASU, Iker ARANJUELO, et Tae Hwan KIM.

Merci à tous mes collègues stagiaires et doctorants dit : « Les légumes » Julie GOMBERT, Lucie LE GOU-DUBOUSSET et Virginie SEGUIN (collègues de bureau pendant ces années), Maha Mohamed-shater ABDALLAH, Marie DECLOS (sœur dans cette couvée), Anne-sophie DESFEUX, Tiphaine TALLEC, Alexandre BERTHIER, Bertrand LASSEUR (fructane synthétor qui a été converti à la « Plasticité »), Fabien LESUFFLEUR (PS : Les nodules ne photosynthétisent pas. Par contre, les nodules de soja fixent le CO₂ atmosphérique de manière Nyctémérale via le cycle du glyoxylate (Coker & Schubert, 1981 ; king *et al.*, 1986)), Benjamin LEVEEL, Jérémy LOTHIER (fructan destructor, PS : le trèfle nain n'est pas si petit et c'est un sacré légume), Romain GUILLEMIN, et tous les nouveaux arrivants pour les bonnes parties de rigolades et de divertissements. Je leur souhaite bon courage pour atteindre leurs objectifs futurs.

J'aimerais également remercier les amis du côté du laboratoire de Microbiologie de l'environnement dit : « Les Microbes » (Eliette RIBOULET, Laurent HEBERT, et les autres), pour leur gentillesse et leur accessibilité.

L'Ecole doctorale et Ministère de la Recherche

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'Ecole doctorale Normande Chimie-Biologie et nouvellement l'Ecole doctorale Normande Biologie intégrative, Santé, Environnement, l'IAE de Caen, l'Université de Caen pour m'avoir accueilli, pour les formations scientifiques et professionnelles qu'elles m'ont permis d'acquérir tout le long de cette tranche de vie.

Ce travail de thèse a été réalisé avec les soutiens financiers du ministère de la Recherche, du Conseil Régional de Basse-Normandie, et bien entendu des citoyens. Ils ont mes remerciements. Enfin, je remercie l'université de Caen pour ce cadre agréable et la structure qui était mise à ma disposition tout au long de ces quelques années ainsi que le personnel de la bibliothèque universitaire pour le travail de mise à disposition des périodiques qui fut très appréciable.

Les Clins d'oeil

Je tiens enfin à avoir une pensée envers les membres de ma famille et tous ceux, qui se sont souciés de ce travail tout au long de sa réalisation.

Je tiens à préciser combien les soutiens chaleureux de mes amis m'ont permis de me changer les idées et de rester en forme (physique et morale) malgré les difficultés.

Je n'oublierai pas de mentionner l'importance des soutiens et encouragements de ma famille. Merci, Yolande, Elise, Alain pour m'avoir permis de garder le contact avec la Nature Normande lors des cueillettes et récoltes de Pommes, de Pissenlits et autres plantes traditionnelles. Cela me rappelle que c'est : *« la technique qui doit s'adapter à la Nature et à l'art. L'homme doit simplement être en adéquation avec la Nature »*.

Enfin, un grand merci aux différents membres du cocon familial en particulier mes parents Jean-Louis et Agnès pour leur soutien tout au long de ces années et Graziella qui me fera toujours bien rire (la cuillère à « mouki ») et notre fauve de chasse « Batman » (depuis que la Loi stipule que tu ne fais plus partie des meubles).

Avec l'aide de mes encadrants, j'ai tenté de trouver un équilibre entre les études récentes et plus anciennes. Le choix a été guidé par le respect de l'esprit pionnier des auteurs ayant œuvré dans ce domaine et décrit des phénomènes encore d'actualités aujourd'hui. Cette démarche découle du souci d'illustrer la dimension historique de cette discipline, thématique encore très jeune. Nous sommes tous conscients du fait que le choix des références est subjectif et qu'il ne peut être que fragmentaire face à la multitude de données nouvelles qui apparaissent quotidiennement.

Avant de vous offrir le fruit de mon travail de recherche, merci à tous pour votre participation à l'élaboration de ce document.

Je remercie d'avance tous ceux qui, par leurs compléments d'informations, corrections, indications ou remarques contribueront à l'amélioration de cet ouvrage.

Je compte sur vous pour faire de cet ouvrage quelque chose de vivant et d'évolutif, n'hésitez pas à le modifier, le « triturer » ; enlevez lui des choses et ajoutez lui en d'autres. En d'autres termes, faites en sorte que ce manuscrit soit plastique et vivant. Il ne reste plus qu'à vous de jouer.

Bonne lecture à tous.

« La seule chose que je sais c'est que je ne sais rien » Socrate

« Qui reconnaît son ignorance n'est pas vraiment ignorant ; qui reconnaît son égarement, n'est pas vraiment égaré » Tchouang-Tseu

Je dirais simplement : « la connaissance est à tous, mais n'appartient qu'à ceux qui savent l'exploiter ».

Liste des abréviations

$\mathcal{A}$	
ARA : Acetylene Reduction Activity	Ndff : N derived from fertiliser
APS : ATP sulfurylase	Nfix : N derived from the atmosphere
ARNm : Acide RiboNucleique messenger	NH₄⁺ : Ion Ammonium
Asn : Asparagine	NNU : Normal Nitrate Uptake
ATP : Adénosine Triphosphate	NO₃⁻ : Ion Nitrate
$\mathcal{C}$	$\mathcal{O}$
C : Carbone	O : Oxygène
C₂H₂ : Acétylène	O₂ : Dioxygène
CaSO₄ : Pyrite ou sulfate de Calcium	OAS : O-Acetyl-L-Serine
CO₂ : Dioxyde de carbone	OAS-TL : O-AcetylSerine(Thiol)Lyase
$\mathcal{F}$	$\mathcal{P}$
Fe : Fer	P : Element Phosphate
$\mathcal{G}$	PAPS : 3'-PhosphoAdénosine-5'-PhosphoSulfate
GS/GOGAT : Cycle Glutamine Synthétase / Glumate Synthase	PEPCase : PhosphoEnolPyruvate Carboxylase
GSH : Glutathion	PO₄²⁻ : Pi : Ion Phosphate
$\mathcal{H}$	$\mathcal{Q}$
H : Hydrogène	QSdns : The Quantity of S derived from the nutrient solution
H₂O : Eau	QSdad : The Quantity of S derived from atmospheric deposition
H₂S : Sulfure d'hydrogène	
HSO₃⁻ : Bisulfite	$\mathcal{R}$
$\mathcal{K}$	RGR : Relative Growth Rate : Taux de Croissance Relatif
K⁺ : Ion Potassium	ROS : Espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
$\mathcal{L}$	RubisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase /Oxygénase
LA : Leaf Area	$\mathcal{S}$
LAR : Leaf Area Ratio	S : Soufre
Lb : Léghémoglobine	S²⁻ : Sulfure (<i>Sulfide</i>)
LM : Leaf Mass	SAM : S-AdénosylMéthionine
LMR : Leaf Mass Ratio	SAT : Serine Acetyl Transferase
$\mathcal{M}$	SAU : Surface Agricole Utile
M : Masse de la plante entière	-SH : Groupement thiol
MDH : Malate DésHydrogénase	SH⁻ : Ion SulfHydryl
Mo : Molybdem	SLA : Specific Leaf Area
$\mathcal{N}$	SO₂³⁻ : Sulfite ou sulfite actif (<i>Sulfite</i>)
N : Azote	SO₄²⁻ : Sulfate (<i>Sulphate</i>)
N₂ : Diazote	SPAD : Soil Plant Analysis Development
NAR : Net Assimilation Rate	SST1 : Sulfur System Transport
Nabs : N derived from the nutrient solution	$\mathcal{V}$
Ndfa : N derived from the atmosphere	VLF : Very Low Fixation

P**ublications et communications scientifiques**

Les résultats rapportés dans ce document ont, à ce jour, fait l'objet de la rédaction de 4 publications internationales :

♣ ***Publications internationales acceptées :***

Sébastien Varin, Servane Lemauiel-lavenant, Jean-bernard Cliquet, Sylvain Diquélou & Terence Padraic Thomas Michaelson-Yeates. In press. Functional plasticity of *Trifolium repens* L. in response to sulphur and nitrogen availability. *Plant and Soil*. (DOI 10.1007/s11104-008-9800-4).

Sébastien Varin, Benjamin Leveel, Servane Lemauiel-Lavenant, Jean-Bernard Cliquet. In press. Does the white clover response to sulphur availability correspond to phenotypic or ontogenetic plasticity? *Acta Oecologica*.

♣ ***Publications internationales en cours de rédaction :***

Sébastien Varin, Jean-Bernard Cliquet, Emmanuelle Personeni, Jean-Christophe Avice, Servane Lemauiel-Lavenant. How does sulphur availability modify N acquisition of White Clover (*Trifolium repens* L.)? A soumettre à *Physiologia Plantarum*.

Sébastien Varin, Jean-Bernard Cliquet, Servane Lemauiel-Lavenant. 2009. Use of the ³⁴S dilution method to study the contribution of foliar deposition of atmospheric S to S nutrition in white clover. A soumettre à *New Phytologist*.

Ce travail de recherche a également donné lieu à 3 communications lors de congrès nationaux et 1 communication lors d'un congrès international:

♣ **Congrès internationaux :**

Communication affichée :

S. Varin, J.B. Cliquet, E. Personeni, J.C. Avise, S. Lemauiel-Lavenant, F. 2008. How does sulphur availability modify N acquisition by White Clover (*Trifolium repens* L.)? **7th Workshop on Sulphur Metabolism in plant, 13-17 May 2008, Warsaw-Poland.**

♣ **Congrès nationaux :**

Communications affichées :

S. Varin, S. Lemauiel-Lavenant, J.B. Cliquet, S. Diquelou et T.P.T. Michaelson-Yeates. Plasticité des traits d'histoire de vie de trois lignées de trèfles blancs *Trifolium repens* L. en réponse à des fertilisations azotées et soufrées. **VIII Journées d'Ecologie Fonctionnelle (J.E.F.), 07 - 09 Mars 2006, Nouan Le Fuzelier – France.**

Varin Sébastien, Leveel Benjamin, Lemauiel-Lavenant Servane, Cliquet Jean-Bernard. 2008. Effects of sulphur availability on white clover in time course of growth. **Journée d'Ecole Doctorale Normande Chimie-Biologie (J.E.D.N.), 14 Mars 2008, Le Havre – France.**

S. Varin, B. Leveel, S. Lemauiel-Lavenant, J.B. Cliquet. 2008. L'effet de la disponibilité en soufre sur la croissance du trèfle blanc correspond-il à des modifications de performances ou à un décalage ontogénétique ? **X Journées d'Ecologie Fonctionnelle (J.E.F.), 01 - 04 Avril 2008, La grande Motte – France.**

T able des matières

<i>Remerciements</i>	- i -
<i>Liste des abréviations</i>	- ii -
<i>Publications et communications scientifiques</i>	- iii -
<i>Table de matières</i>	- iv -
INTRODUCTION GÉNÉRALE	- 1 -
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 6 -
CHAPITRE I : La plasticité et la croissance	- 6 -
I. La Plasticité	- 6 -
<i>I.1. Plasticité et norme de réaction : définitions</i>	- 6 -
<i>I.2. Etude de la plasticité en écologie</i>	- 7 -
<i>I.3. Rôle écologique – plasticité adaptative</i>	- 9 -
II. Croissance, développement et plasticité	- 10 -
<i>II.1. Plasticité ontogénétique</i>	- 10 -
<i>II.2. Analyse de la croissance</i>	- 11 -
CHAPITRE II : Interaction de la fixation de l'azote avec les nutriments minéraux	- 14 -
I. Importance agro-écologique de la fixation du diazote atmosphérique	- 14 -
II. Bases morphologiques et biochimiques de la fixation de l'azote atmosphérique ...	- 15 -
<i>II.1. La symbiose fixatrice</i>	- 15 -
<i>II.2. Mesure de la fixation du N₂ chez les Fabacées</i>	- 15 -
II.2.1. Méthode d'Activité de Réduction d'Acétylène de la nitrogénase.....	- 15 -
II.2.2. Utilisation de ¹⁵ N.....	- 15 -
<i>II.3. Morphogénèse des nodules</i>	- 16 -
II.3.1. Initiation et formation des nodules.....	- 16 -
<i>II.4. Réduction du diazote atmosphérique</i>	- 17 -
II.4.1. Structure de la nitrogénase.....	- 17 -
II.4.2. Réaction catalysée par la nitrogénase.....	- 18 -
II.4.3. Alimentation en substrats carbonés des nodules.....	- 18 -
II.4.4. Devenir du NH ₄ ⁺ dans les nodules.....	- 19 -

II.5. Rôle de l'oxygène et mécanisme de régulation de l'approvisionnement en O_2 dans le nodule.....	- 19 -
III. Effet de l'alimentation en ammonium (NH_4^+) et en nitrate (NO_3^-) sur la fixation de l'azote.....	- 21 -
III.1. Effet sur la nodulation.....	- 21 -
III.2. Effet sur le fonctionnement du nodule.....	- 21 -
IV. Effet de l'alimentation en phosphate, potassium sur la fixation de l'azote.....	- 22 -
IV.1. Effet de l'alimentation en phosphate (PO_4^{2-}) sur la fixation de l'azote.....	- 22 -
IV.1.1. Effet sur la nodulation.....	- 22 -
IV.1.2. Effet sur le fonctionnement du nodule.....	- 23 -
IV.2. Effet de l'alimentation en potassium (K^+) sur la fixation de l'azote.....	- 23 -
V. Effet de l'alimentation en soufre sur la fixation de l'azote.....	- 24 -
V.1. Effet de l'alimentation en S sur la croissance et la nodulation des Fabacées.....	- 24 -
V.2. Effet sur le fonctionnement du nodule.....	- 25 -
CHAPITRE III : Acquisition et métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs.-	- 26 -
I. Les rôles du S dans le métabolisme des plantes.....	- 26 -
II. Acquisition et transport du soufre.....	- 26 -
II.1. Absorption du soufre par voie racinaire.....	- 26 -
II.1.1. Soufre dans le sol.....	- 26 -
II.1.2. Absorption racinaire du sulfate.....	- 27 -
II.1.3. Flux de transport et de stockage du sulfate.....	- 28 -
II.2. Dépôt foliaire de soufre.....	- 29 -
II.2.1. La phytotoxicité du S atmosphérique.....	- 29 -
II.2.2. Mécanismes impliqués dans le dépôt foliaire de S.....	- 29 -
III. Assimilation du sulfate.....	- 30 -
III.1. Voie réductrice plastidiale du SO_4^{2-}	- 30 -
III.2. Voie Non réductrice du SO_4^{2-} par sulfatation dans le cytosol.....	- 32 -
IV. Coordination et régulation des métabolismes C, N, S en condition de carence en S.....	- 32 -
IV.1. Effet du métabolisme du soufre sur la photosynthèse.....	- 32 -
IV.2. Coordination du métabolisme du soufre et de l'azoté.....	- 32 -
IV.3. Régulation de la nutrition soufrée.....	- 34 -
IV.3.1. Régulation de l'absorption du sulfate.....	- 34 -
IV.3.2. Régulation de l'assimilation.....	- 34 -
V. Etat des lieux des carences en soufre.....	- 35 -

<i>V.1. Origines des carences en soufre</i>	- 35 -
<i>V.2. Impacts des carences en soufre sur les grandes cultures</i>	- 36-
<i>V.3. Impacts des carences en soufre sur les prairies</i>	- 36-
RÉSULTATS	- 38 -
CHAPITRE I : Functional plasticity of <i>Trifolium repens</i> L. in response to Sulphur and Nitrogen availability	- 38-
<i>Préambule</i>	- 39 -
<i>Abstract</i>	- 40 -
I. Introduction	- 41 -
II. Materials and Methods	- 42 -
<i>II.1. Plant material and culture conditions</i>	- 42 -
<i>II.2. Functional traits</i>	- 43 -
<i>II.3. Data analysis</i>	- 44 -
III. Results	- 44 -
<i>III.1. Potential competitive ability, photosynthesis, vegetative and sexual reproduction</i>	- 45 -
<i>III.2. Nitrogen acquisition</i>	- 45 -
<i>III.3. Sulphur acquisition</i>	- 47 -
IV. Discussion	- 47 -
<i>IV.1. Fertilisation effects on sulphur and nitrogen acquisition</i>	- 47 -
<i>IV.2. Fertilisation effects on potential competitive ability, photosynthesis and sexual and vegetative reproduction</i>	- 48 -
<i>IV.3. White clover behaviour in a context of sulphur impoverishment versus fertilisation in grassland soils</i>	- 50 -
Acknowledgements	- 50 -
CHAPITRE II : How does sulphur availability modify N acquisition of White Clover (<i>Trifolium repens</i> L.) ?	- 51 -
<i>Préambule</i>	- 52 -
<i>Abstract</i>	- 53 -

I. Introduction.....	54 -
II. Materials and Methods.....	55 -
<i>II.1. Plant material, Clone production and Growth conditions.....</i>	<i>55 -</i>
<i>II.2. Root and Nodule morphological analysis.....</i>	<i>56 -</i>
<i>II.3. Isotopic analysis.....</i>	<i>56 -</i>
<i>II.4. Extraction and quantification of proteins from nodules.....</i>	<i>56 -</i>
<i>II.5. SDS PAGE and two dimensional electrophoresis (2-DE).....</i>	<i>57 -</i>
<i>II.6. Western blotting and immunodetection of nitrogenase and Leghaemoglobin.....</i>	<i>58 -</i>
<i>II.7. Protein identification by LC MS/MS.....</i>	<i>58 -</i>
<i>II.8. Amino acid extraction and analysis.....</i>	<i>59 -</i>
<i>II.9. Data analysis.....</i>	<i>60 -</i>
III. Results.....	60 -
<i>III.1. Growth parameters.....</i>	<i>60 -</i>
<i>III.2. Nitrogen acquisition.....</i>	<i>60 -</i>
<i>III.3. Nodulation parameters.....</i>	<i>60 -</i>
<i>III.4. Nodule proteins.....</i>	<i>61 -</i>
<i>III.5. Nodulated root amino acids.....</i>	<i>61 -</i>
IV. Discussion.....	62 -
Acknowledgements.....	65 -
CHAPITRE III : Does the white clover response to sulphur availability correspond to phenotypic or ontogenetic plasticity ?.....	
66 -	
<i>Préambule.....</i>	<i>67 -</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>68 -</i>
I. Introduction.....	69 -
II. Materials and Methods.....	70 -
<i>II.1. Plant material and growth conditions.....</i>	<i>70 -</i>
<i>II.2. Plant trait measurements.....</i>	<i>71 -</i>
<i>II.3. Data analysis.....</i>	<i>72 -</i>
III. Results.....	72 -
<i>III.1. S availability effect on performance.....</i>	<i>72 -</i>
<i>III.2. S availability effect on S and N acquisition.....</i>	<i>72 -</i>
<i>III.3. Phenotypic or ontogenetic plasticity ?.....</i>	<i>73 -</i>
IV. Discussion.....	74 -
V. Conclusion.....	76 -
Acknowledgements.....	76 -

CHAPITRE IV : Use of a ^{34}S dilution method to study the contribution of foliar deposition of atmospheric S to S nutrition in white clover ?.....- 77 -

<i>Préambule</i>	- 78 -
Abstract	- 79 -
I. Introduction	- 80 -
II. Materials and Methods	- 82 -
<i>II.1. Plant material, Clone production and Growth conditions</i>	- 82 -
<i>II.2. Preparation of $^{34}\text{SO}_4^{2-}$</i>	- 82 -
<i>II.3. Plant harvest and traits measurement</i>	- 83 -
<i>II.4. Data analysis</i>	- 83 -
III. Results	- 84 -
IV. Discussion	- 85 -
Acknowledgements	- 88 -

DISCUSSION GÉNÉRALE.....- 89 -

I. Effet du S sur la croissance du trèfle blanc	- 92 -
<i>I.1. Le fonctionnement du trèfle est modulé par la concentration en soufre du substrat</i>	- 93 -
I.1.1. Plasticité des fonctions liée à la nutrition soufrée.....	- 93 -
I.1.2. Effet direct du S et effet indirect via l'acquisition de l'N.....	- 93 -
I.1.3. Aptitude potentielle à la compétition.....	- 94 -
I.1.4. Reproduction.....	- 94 -
I.1.5. Photosynthèse.....	- 95 -
<i>I.2. Plasticité phénotypique et non pas ontogénétique exprimée chez le trèfle blanc</i>	- 95 -
I.2.1. Plasticité phénotypique chez le trèfle blanc.....	- 95 -
I.2.2. Période optimale pour la fertilisation en S chez le trèfle blanc.....	- 96 -
<i>I.3. Dépôt foliaire de S chez le trèfle blanc</i>	- 96 -
I.3.1. Teneur en S.....	- 96 -
I.3.2. Utilisation du S atmosphérique par le trèfle.....	- 97 -
<i>I.4. Dilution du S chez le trèfle blanc</i>	- 98 -

II. Lien entre l'acquisition du S et de l'N chez le trèfle blanc confronté aux variations nutritionnelles soufrées.....	- 98 -
<i>II.1. Variation du rapport S/N dans le temps et selon les traitements N et S.....</i>	<i>- 98 -</i>
<i>II.2. Effet non spécifique du S sur l'absorption de l'N par l'intermédiaire de la croissance racinaire.....</i>	<i>- 99 -</i>
<i>II.3. Effet sur la fixation du diazote chez le trèfle blanc.....</i>	<i>- 100 -</i>
III. Mécanismes impliqués dans l'effet du Soufre sur la fixation du N₂.....	- 101 -
<i>III.1. Effet du S sur la Nodulation</i>	<i>- 101 -</i>
<i>III.2. Effet du S sur la synthèse des protéines du nodule.....</i>	<i>- 102 -</i>
<i>III.3. Adaptation des nodules de trèfle face à la disponibilité en S.....</i>	<i>- 103 -</i>
CONCLUSION & PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	- 105 -
Références bibliographiques.....	- 109 -
Tables des illustrations.....	- 130 -

Introduction générale

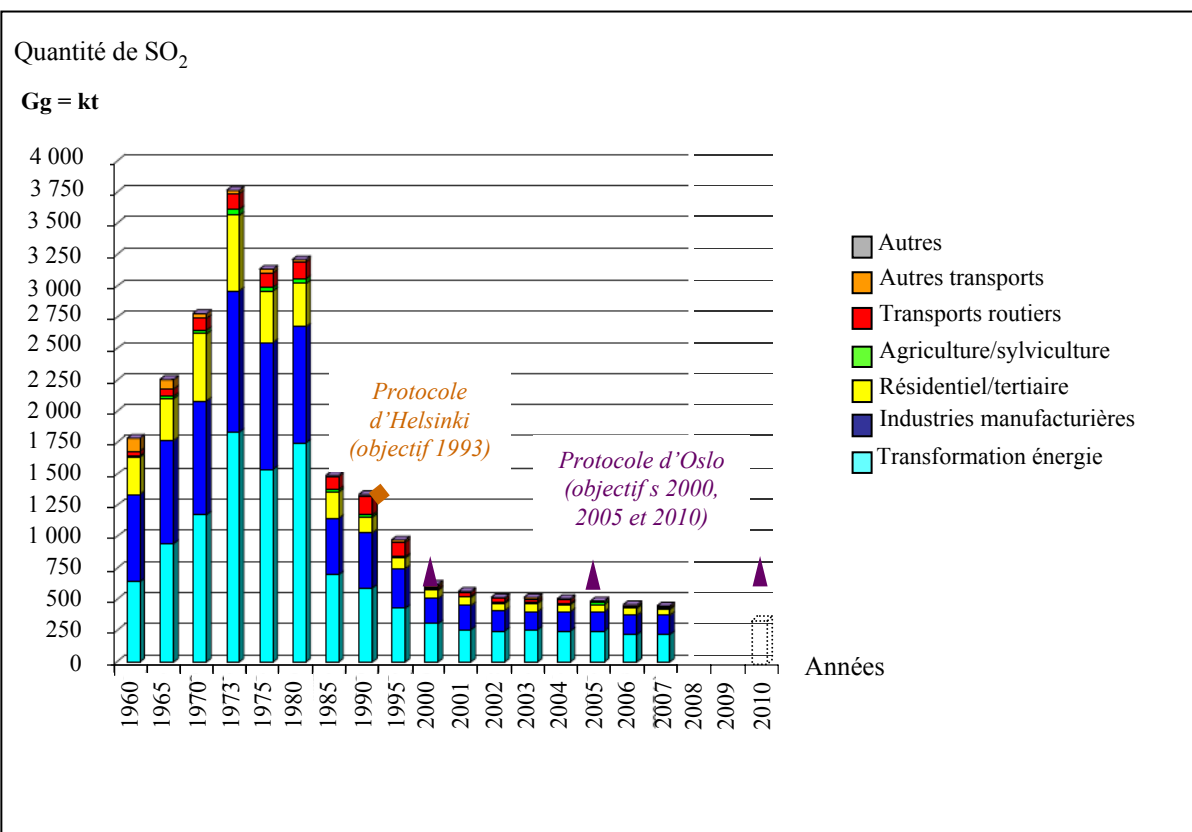


Figure 1. Evolution des quantités de dioxyde de soufre (SO₂) dans l'air (en kt) et origines des émissions de SO₂ de 1960 à 2007 en France métropolitaine. Entre 1973 et 2004, les émissions de SO₂ ont chuté de plus de 86 %. (d'après le Citepa, Mai 2008).

Introduction générale

Avec la révolution industrielle, les activités humaines croissantes, l'urbanisation et l'industrialisation ont entraîné, notamment par l'utilisation des combustibles fossiles, des pollutions qui ont modifié profondément la biosphère. De telles modifications se sont déjà produites dans le passé mais jamais avec une telle rapidité (Mann *et al.*, 1998). L'ensemble des modifications regroupées sous le terme de changements globaux, concerne les modifications des cycles géochimiques avec l'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (CO₂) et autres gaz à effet de serre, les retombées de polluants minéraux, les changements dans l'utilisation des terres agricoles et l'érosion de la biodiversité (Lavorel *et al.*, 1997 ; Chapin *et al.*, 2000). L'impact de ces changements globaux, particulièrement l'augmentation de la température et des teneurs en CO₂, est devenu un thème majeur en écologie. Parmi les impacts des activités humaines, la modification de la composition chimique de l'atmosphère se traduit par l'augmentation des teneurs en polluants azotés et soufrés tels que le dioxyde de soufre ou le sulfure d'hydrogène. Ainsi, la teneur en dioxyde de soufre (SO₂) de l'atmosphère a augmenté de 114 % entre 1960 et 1975 en France métropolitaine (Figure 1). Ces composés entraînent une acidification de l'atmosphère qui peut provoquer des pluies acides, particulièrement toxiques pour les végétaux (Malcolm & Garforth, 1977 ; De Kok, 1990 ; Hedin & Likens, 1996).

En 1992, lors du « sommet de la terre » organisé par les Nations Unies à Rio, deux conventions sont adoptées, l'une sur la biodiversité et l'autre sur le climat. Cette dernière engage les états signataires à stabiliser ou réduire les émissions de gaz carbonique et autres gaz à effet de serre et fixe des seuils de pollution à ne pas dépasser. Ces engagements ont été renouvelés lors du « Sommet Mondial sur le Développement Durable » de Johannesburg en 2002. La mise en place des mesures en découlant, si elle n'a pas permis un recul majeur de l'ensemble de la pollution atmosphérique, s'est avérée efficace dans le cas du soufre atmosphérique (Figure 1).

Paradoxalement, alors que le soufre (S) atmosphérique peut être phytotoxique à forte concentration, la baisse des polluants soufrés a entraîné une baisse des rendements dans le cas de certaines cultures. En effet, les retombées atmosphériques soufrées permettaient, jusqu'ici, de compenser les exportations de S par les cultures, puisque le soufre était jusqu'ici rarement

intégré dans les fertilisants. Cette chute des retombées atmosphériques conjuguée à l'intensification de la production agricole a entraîné une baisse des teneurs en soufre des sols à un niveau qui peut devenir limitant pour la croissance des plantes (Schnug & Evans, 1992 ; Ceccotti, 1996 ; Ceccotti & Messick, 1997). Cette tendance à la baisse devrait se poursuivre au cours des prochaines années (Scherer, 2001). La baisse des rendements s'explique par le rôle primordial du S dans le développement des plantes. Cet élément entre, comme l'azote (N), dans la composition des protéines et représente entre 0,1 et 0,6 % de la matière sèche des végétaux (Heller, 1984). Les deux acides aminés soufrés, cystéine et méthionine, permettent l'arrangement tridimensionnel des protéines dans l'espace par la formation de ponts disulfures et entrent dans la composition du site catalytique de nombreuses enzymes. Le S intervient dans la défense antioxydante via le glutathion réduit (γ -glutamyl-cystéine-glycine), les thiorédoxines et les peroxyrédoxines (Rausch & Wachter, 2005). Enfin, le soufre entre dans la composition de produits secondaires (comme les glucosinolates et les sulfolipides), de vitamines et de co-facteurs (biotine, thiamine, Coenzyme A, etc.) (Saito, 2004 ; Rausch & Wachter, 2005).

Des déficiences en soufre, apparues sur les différents continents, ont d'abord été observées dans les cultures les plus exigeantes telles que les Brassicacées comme le colza et les Poacées comme le blé (Schung & Evans, 1992 ; Ceccotti, 1996a, 1996b ; Ceccotti & Messick, 1997 ; Wang *et al.*, 2005). Depuis quelques années, des déficiences sont observées dans les prairies européennes (Murphy & Boggan, 1988 ; Grünhage *et al.*, 1998 ; Mathot *et al.*, 2008).

Les prairies constituent un modèle d'étude intéressant tant pour les agronomes que pour les écologues. Ce sont des agrosystèmes qui représentent 60% de la Surface Agricole Utile (SAU) en Normandie. Semées (temporaires) ou permanentes (semi-naturelles), elles sont utilisées pour l'alimentation du bétail directement par le pâturage ou indirectement par la distribution du fourrage. L'association de Fabacées aux Poacées y est généralement recherchée. En effet, une partie de l'N fixé par les Fabacées prairiales constitue une source d'azote pour les plantes voisines, Poacées en particulier. Ce phénomène de fertilisation naturelle constitue un avantage économique important pour l'exploitant agricole lié à une réduction d'apports d'engrais azotés industriels. Cet engrais vert présente également l'avantage de limiter les problèmes liés à la pollution nitrique des eaux, par les engrais azotés.

Pour les écologues, les prairies désignent une formation herbacée naturelle ou résultante de l'action de l'homme (Ramade, 1993). Selon les pratiques de gestion elles

peuvent être paucispécifiques ou au contraire très diversifiées (Clergue *et al.*, 2005 ; Knop *et al.*, 2006 ; Andrieu *et al.*, 2007 ; Pywell *et al.*, 2007 ; Kirkham *et al.*, 2008). Trois groupes fonctionnels principaux sont généralement identifiés dans les prairies : le groupe des Poacées, le groupe des fixatrices d'azote (Fabacées) et le groupe des dicotylédones non fixatrices (Tilman *et al.*, 1997 ; Reich *et al.*, 2001). Les interactions entre les fixatrices d'azote et les espèces non fixatrices constituent des éléments clefs de l'équilibre des espèces et donc de la richesse spécifiques de ces prairies (Tilman *et al.*, 1997 ; Benizri & Amiaud, 2005). Si les prairies productives sont généralement les moins diversifiées (Jouven & Baumont, 2008), certains auteurs rapportent une augmentation de la productivité lorsque la diversité augmente (Bullock *et al.*, 2007) notamment grâce à la présence d'espèces très productives comme les Fabacées (Thompson *et al.*, 2005) et l'utilisation complémentaire des ressources par différentes espèces (Hooper *et al.*, 2005).

Les communautés végétales peuvent être appréhendées comme un assemblage d'espèces en équilibre dans une niche écologique donnée. Un changement dans l'équilibre et la disponibilité en nutriments modifie l'équilibre compétitif entre les espèces et provoque un changement de la structure des communautés (Mountford *et al.*, 1996 ; Marissink & Hansson, 2002 ; Benizri & Amiaud, 2005). Parmi les espèces d'une communauté, certaines ont un rôle central. Ce sont des espèces « clefs » ou « clefs de voûte » dans le sens où leur impact sur leur communauté est étendu et disproportionnellement large par rapport à leur abondance ou biomasse (Power *et al.*, 1996). Lorsqu'une espèce clef est régulée par un facteur du milieu, la conséquence sur la communauté est importante ; l'étude d'une telle espèce constitue une des voies d'approche du fonctionnement des communautés. C'est la démarche que nous avons choisi d'adopter dans cette thèse centrée sur l'étude de la réponse du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) à un appauvrissement en soufre du sol. L'analyse de l'impact de l'appauvrissement en soufre du sol sur le trèfle a été entreprise par une approche fonctionnelle. Elle est basée sur l'évaluation des fonctions biologiques des organismes en interaction avec le milieu par des « traits fonctionnels » (Noble & Slatyer, 1980 ; Weiher *et al.*, 1999 ; Violle *et al.*, 2007). Ces traits sont des caractéristiques physiologiques ou morpho-anatomiques des organismes et leur variation rend compte de la plasticité de l'espèce.

Le trèfle blanc constitue une espèce clef des prairies tempérées. C'est une des Fabacées les plus abondantes dans les communautés prairiales naturelles ou semées en raison de ses aptitudes à la compétition et de son rôle trophique d'espèce fixatrice d'N (Williams, 1987 ; Simon *et al.*, 1997). Il est essentiel au maintien et renouvellement des stocks d'azote

dans les sols prairiaux et sa contribution peut atteindre 545 kg d'N fixé par hectare et par an (Gylfadóttir *et al.*, 2007). Pour ces raisons, le trèfle blanc est un modèle qui a été largement étudié. Il est maintenant bien caractérisé du point de vue agronomique (Haynes, 1980 ; Boller & Nösberger, 1987) ou écophysiologique (Gordon *et al.*, 1990 ; Gordon & Kessler, 1990 ; MacDuff & Jackson, 1992 ; Bailey & Laidlaw, 1999 ; Goulas *et al.*, 2002).

A partir du XVIII^{ème} siècle, dans de nombreux pays Européens, l'intégration du trèfle blanc dans la composition des semis a été encouragée (Guckert & Hay, 2001). Cette Fabacée est particulièrement difficile à maintenir dans les prairies à forte production, la fertilisation azotée tend en effet à réduire les proportions de trèfle dans les prairies au détriment de Poacées, telles que le ray-grass, espèce plus compétitive pour l'absorption de l'azote minéral (Haynes, 1980 ; Soussana & Hartwig, 1995 ; Murphy & Quirke, 1997 ; Simon *et al.*, 1997 ; Mosquera-Losada *et al.*, 2004). C'est pourquoi la production de trèfle blanc a régressé lors de l'intensification de l'agriculture, et seule l'apparition de variétés plus compétitives a permis un regain de son utilisation à la fin du 20^{ème} siècle (Guckert & Hay, 2001).

La croissance du trèfle est dépendante de l'éclairement (MacDuff & Jackson, 1992), du piétinement, du stress salin ou hydrique (Serraj *et al.*, 1999). Du point de vue de la nutrition minérale, l'impact de l'azote est bien documenté, de même que celui du phosphate (Almeida *et al.*, 2000 ; Høgh-Jensen *et al.*, 2002) et du potassium (Høgh-Jensen, 2003) mais très peu de données concernent le soufre (Walker & Adams, 1958 ; Tallec *et al.*, 2008). Quelques études ont montré que les Fabacées sont particulièrement sensibles à la nutrition soufrée (Scherer & Lange, 1996). La forte sensibilité des Fabacées à la déficience en S semble s'expliquer par une diminution de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Walker *et al.*, 1956a, 1956b ; DeBoer & Duke, 1982 ; Scherer & Lange, 1996 ; Zhao *et al.*, 1999a, 1999b ; Habtemichial & Singh, 2007 ; Scherer *et al.* 2008), mais les mécanismes impliqués ne sont pas clairement déterminés. La relation étroite entre l'alimentation en S et la fixation symbiotique de l'azote pourrait résulter d'un effet général du S sur la croissance de la plante ou d'un effet plus spécifique sur la fixation.

L'objectif de ce projet de thèse est donc de comprendre **pourquoi, comment et à quel stade de croissance, le trèfle blanc, espèce fixatrice d'azote, est particulièrement sensible à la disponibilité en soufre du milieu**. Mon travail de thèse a consisté à étudier la plasticité fonctionnelle, phénotypique ou ontogénétique, du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.), en réponse à la disponibilité en soufre. J'ai tenté de répondre à quatre questions. i) Quelles sont les fonctions biologiques les plus modulées par la disponibilité en S ? ii) Comment le soufre stimule-t-il la fixation de l'azote ? iii) Le soufre stimule-t-il la production de biomasse ou accélère-t-il la croissance ? iv) Le trèfle peut-il compenser une faible disponibilité en soufre du substrat par l'absorption foliaire de soufre ?

Ce manuscrit est organisé en trois grandes parties. Dans une première partie, une analyse bibliographique présente l'état des connaissances sur (i) la plasticité des espèces et leur croissance, sur (ii) l'effet de la nutrition minérale sur la fixation de l'azote atmosphérique et sur (iii) l'absorption et le métabolisme du S. Dans une deuxième partie, les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont reportés en quatre chapitres, exposés sous la forme de publications scientifiques. Une discussion générale ainsi qu'une conclusion et les perspectives de recherche découlant de ce travail constituent la troisième partie.

Aanalyse Bibliographique

**«La connaissance est le début de l'action ;
l'action l'accomplissement de la connaissance.»
(Wang-Yang-Ming)**

**« Ecouter et choisir entre les avis, voilà le
premier pas de la connaissance ; voir et
réfléchir sur ce qu'on a vu, voilà le second pas
de la connaissance. »
(Confucius)**

Chapitre :

1

La plasticité et la croissance

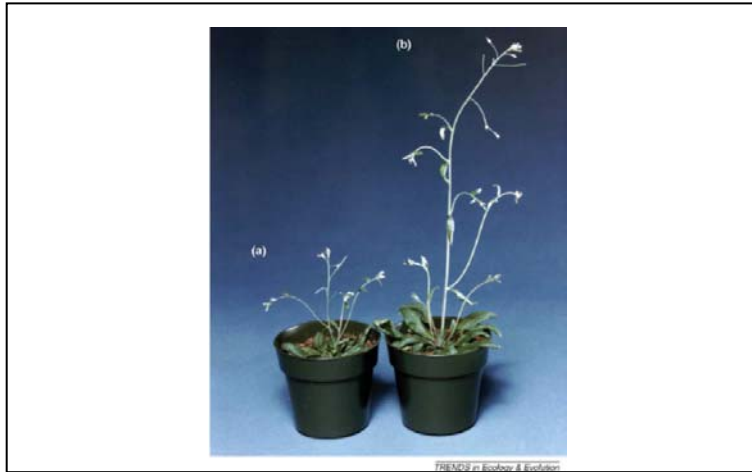


Figure 2. Confrontation de deux plants d'*Arabidopsis thaliana* ayant le même génotype. Ils n'ont pas le même phénotype lorsqu'ils sont soumis à des environnements différents : (a) stimulation mécanique (b) pas de stimulation. (Pigliucci, 2005).

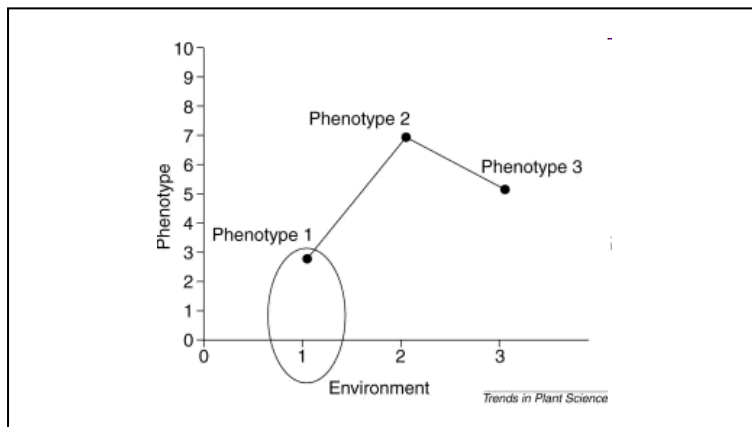


Figure 3. Variation de l'expression du génotype (production de différents phénotypes) en fonction des variations de l'environnement. (Sultan, 2000).

La Plasticité et la Croissance

I. La Plasticité

1.1. Plasticité et norme de réaction : définitions

Le développement d'une plante ne suit pas un plan rigide prédéfini mais est continuellement sujet à modifications pour répondre aux modifications de l'environnement (Bradshaw, 1965). Une espèce peut tolérer divers environnements par le biais de la variabilité génétique à l'échelle des populations et par le biais de la plasticité à l'échelle de l'individu. La plasticité est généralement définie comme l'ensemble des réponses des organismes aux conditions ou aux stimuli environnementaux (Bradshaw, 1965 ; Schlichting, 2002 ; Pigliucci, 2005). La plasticité peut intervenir à différentes échelles : au niveau de la cellule et de l'organe, on parlera de plasticité génétique, biochimique, physiologique, métabolique et anatomique ; au niveau de la plante entière, on identifie la plasticité structurale, morphologique et architecturale (Pigliucci, 2006a, 2006b). Le Phénotype résulte de l'interaction du génotype et des facteurs du milieu. Ainsi, deux plantes possédant le même génotype peuvent avoir des phénotypes contrastés lorsqu'elles sont soumises à des stimuli environnementaux contrastés. La Figure 2 confronte deux plants d'*Arabidopsis thaliana* ayant le même génotype, mais se développant dans des conditions différentes, l'une est soumise à une stimulation mécanique reproduisant l'effet du vent, l'autre n'est pas soumise à cette stimulation (Pigliucci, 2005). La plante ayant subi la simulation du vent est beaucoup plus petite et possède une hampe florale plus réduite que la plante non contrainte. Par le biais de la plasticité chaque génotype peut produire différents phénotypes en fonction des caractéristiques de l'environnement (Figure 3), la plasticité est ainsi à l'origine d'une diversité phénotypique importante (Sultan, 2000).

La mise en évidence de cette plasticité a conduit à la redéfinition du génotype en tant que répertoire des possibilités phénotypiques dans l'environnement (Sultan, 2000). L'ensemble des phénotypes produits par un génotype dans différents scénarios écologiques correspond à sa « norme de la réaction » (Stearns, 1989 ; Via *et al.*, 1995). Elle correspond à la trajectoire des phénotypes produits en réponse aux variations des facteurs de

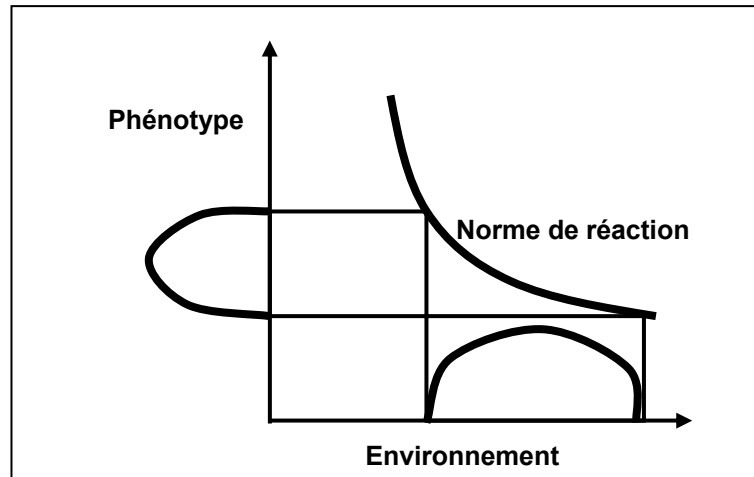


Figure 4. La norme de réaction est un miroir qui réfléchit l'environnement sur le phénotype. (Stearns, 1989).

l'environnement. Stearn (1989) l'a interprété comme un miroir qui réfléchit les effets de l'environnement sur le phénotype (Figure 4).

1.2. Etude de la Plasticité en écologie

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses disciplines plus ou moins proches de l'écologie se sont intéressées à la plasticité avec des objectifs et donc des conclusions très variables. Les bases génétiques de la plasticité, domaine des biologistes moléculaires restent à élucider. Selon Pigliucci (2005), l'interprétation génétique de la plasticité est si complexe et les théories si difficiles à vérifier, qu'elle relève du paradigme. « L'Eco Devo », pour « Ecological Development », étudiant les mécanismes induisant la plasticité dite développementale, est en plein essor (Novoplansky, 2002 ; Schlichting, 2002 ; Sultan, 2004, 2005). La recherche est orientée sur les moyens qu'ont les plantes de percevoir les informations provenant de l'environnement, et sur la régulation des gènes liée à des mécanismes physiologiques au cours du développement. La plasticité peut aussi être appréhendée comme un processus développemental facilitant l'évolution (de Jong, 2005 ; Garland & Kelly, 2006). La compréhension de la sélection naturelle de la plasticité se développe également aujourd'hui en écologie évolutive (DeWitt, 1998 ; DeWitt *et al.*, 1998 ; Pigliucci, 2005). Elle se focalise sur les notions de coûts et de bénéfices pour les espèces à conserver une plasticité importante en fonction par exemple de la stabilité du milieu.

Si les mécanismes sous-jacents à la plasticité et son rôle évolutif ne sont pas encore élucidés, elle est un des mécanismes incontournables dans l'analyse de la réponse des plantes aux variations du milieu en écologie des populations et des communautés.

L'écologie est l'étude des relations réciproques entre les organismes et leur environnement. A l'échelle des populations, la variation des phénotypes peut être mise en relation avec la variation des facteurs du milieu. La plasticité est généralement étudiée par une étude comparative d'un ensemble de traits fonctionnels d'individus échantillonnés au sein de populations naturelles, et soumis à différentes disponibilités en eau, nutriments ou lumière (Crick & Grime, 1987 ; Navas & Garnier, 2002 ; Elberse *et al.*, 2003 ; Shen *et al.*, 2006 ; Portsmouth & Niinemets, 2007). De telles études présentent l'avantage d'être réalistes et permettent une interprétation des observations de terrain. En revanche la variabilité observée relève plus d'un ajustement plastique que d'une plasticité dans la mesure où les populations intègrent différents génotypes. Guntrip et Sibly (1998), à travers l'analyse des normes de réaction distinguent trois scénarios en fonction des interactions entre génotype et

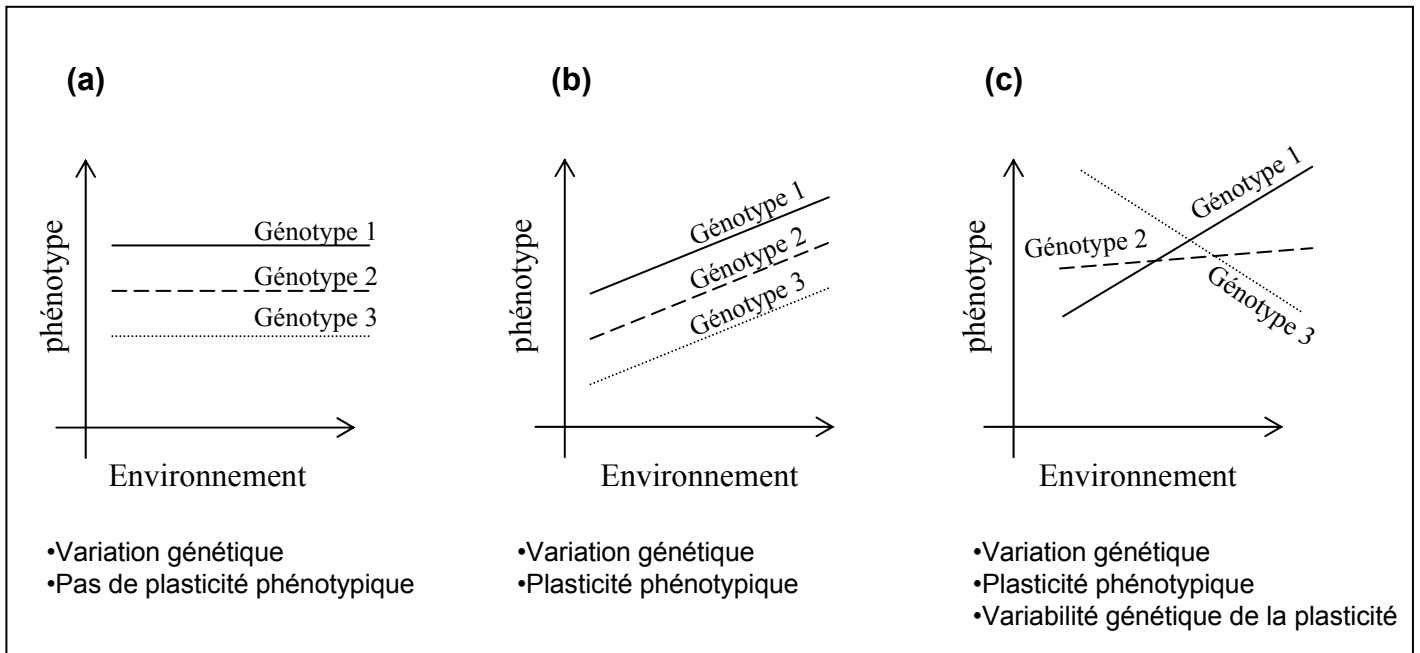


Figure 5. Trois scénarios d'interaction génotype – environnement mis en évidence par la norme de réaction des génotypes : (a) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique (b) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique et à la plasticité phénotypique, (c) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique et à la plasticité phénotypique à leur interaction. (D'après Guntrip & Sibly, 1998).

environnement (Figure 5). Dans un premier scénario, les génotypes d'une espèce donnée ne présentent pas de variabilité en fonction de l'environnement, la diversité phénotypique au sein de la population correspond alors exclusivement à la variabilité génétique (Figure 5a). Dans un second scénario, les génotypes présentent une plasticité, et leurs normes de réactions sont parallèles (Figure 5b). La variabilité phénotypique correspond alors à la fois à la variabilité génétique et à la plasticité phénotypique. Enfin, dans un troisième scénario, la norme de réaction peut varier en fonction du génotype (Figure 5c). La variabilité phénotypique de l'espèce est liée à la diversité génétique, à la plasticité phénotypique et à la variation génétique de la plasticité. Dans cette dernière situation la confrontation des phénotypes avec la variation d'un facteur de l'environnement est difficilement interprétable. Expérimentalement, il est possible d'avoir accès à la plasticité en limitant la variabilité génétique, en employant des populations à faible diversité génotypique telles que des variétés sélectionnées (Frankow-Lindberg, 1999), des descendants d'une plante mère autogame (Hermanutz & Weaver, 1996 ; Volis *et al.*, 2002), des lignées autofécondes (Pigliucci, 1997 ; Moriuchi & Winn, 2005), ou encore des répliques clonales (Cheng *et al.*, 1989 ; Welham *et al.*, 2002).

A l'échelle d'une communauté, les espèces peuvent être comparées sur le critère de la plasticité alors considérée comme un trait (Weiher *et al.*, 1999). Il existe un grand nombre d'indices de plasticité, allant des coefficients de variation, aux calculs des pentes de normes de réaction ou encore aux distances phénotypiques entre individus (de Jong, 1990 ; Scheiner, 1993 ; Valladares *et al.*, 2006). Les espèces les plus plastiques sont généralement des espèces euryèces ou généralistes, tandis que les espèces dont la plasticité est limitée, sont sténoèces ou spécialistes, possédant des niches écologiques étroites (Sultan, 2000). Ainsi, les travaux de Williams *et al.* (1995) et ceux de Hermanutz et Weaver (1996) ont montré que les espèces répandues et possédant de fortes aptitudes colonisatrices sont souvent caractérisées par une plasticité phénotypique élevée. De la même manière, l'aspect invasif de certaines plantes peut être mis en relation avec une importante plasticité phénotypique (Sexton *et al.*, 2002 ; Richards *et al.*, 2006).

La plasticité phénotypique est un processus essentiel pour les espèces soumises à des modifications brutales de l'environnement telles que les changements globaux liés aux activités humaines (Valladares *et al.*, 2007 ; Morin *et al.* 2008). Ces changements pourraient, en effet, être trop rapides pour permettre une réponse évolutive (Sultan, 2004). Morin *et al.*

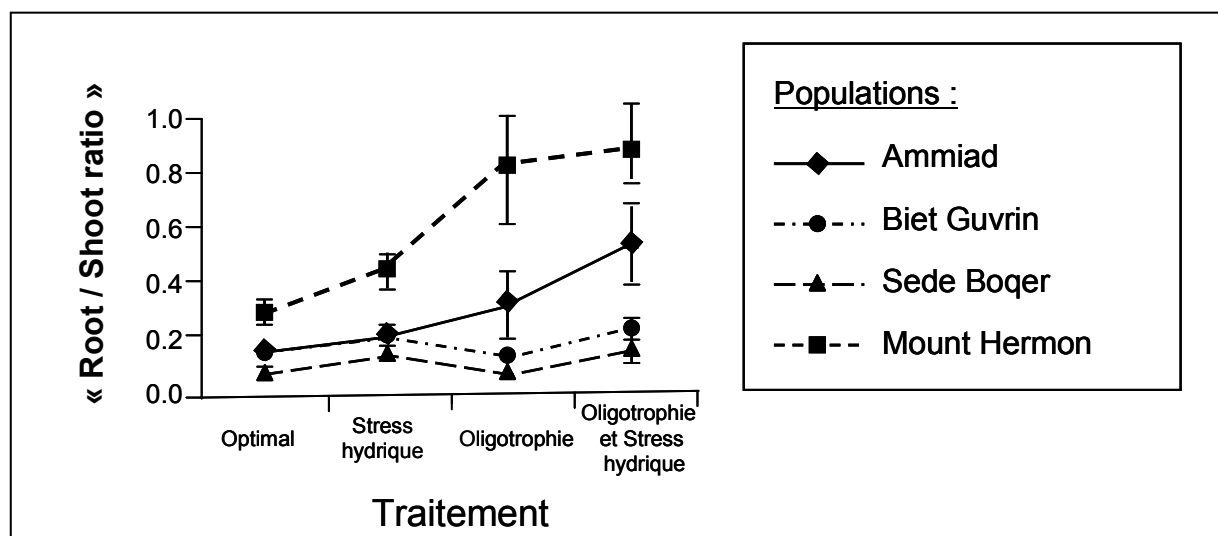


Figure 6. Le rapport biomasse racinaire / biomasse aérienne (Root/Shoot ratio) est modifié chez quatre populations d'*Hordeum spontaneum* selon les traitements : optimal, stress hydrique, oligotrophie, oligotrophie et stress hydrique. (Volis *et al.*, 2002).

(2008), par la prise en compte de la plasticité dans l'adaptation des espèces aux changements globaux dans leur modèle, modèrent ainsi les prévisions alarmistes sur l'érosion de la biodiversité. La plasticité est aujourd'hui prise en compte dans l'étude de la réponse des espèces face aux changements globaux comme l'augmentation de la température (Potvin & Tousignant, 1996 ; Lessmann *et al.*, 2001 ; Rehfeldt *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2005 ; Atkin *et al.*, 2006) de la sécheresse (Martinez-Meier *et al.*, 2008) ou de la teneur en CO₂ (Potvin & Tousignant, 1996 ; Drennan & Nobel, 1998).

1.3. Rôle écologique : Plasticité adaptative

La plasticité, ajustant les phénotypes face à un environnement hétérogène peut accroître la tolérance d'un génotype aux conditions du milieu, et donc lui permettre de s'adapter. Une modification du phénotype ou d'un trait particulier pouvant conférer à un individu une meilleure croissance, survie ou fécondité, bref, une meilleure « fitness » correspond à une plasticité adaptative (de Jong, 2005). Selon Grime *et al.* (1986) la plasticité est un mécanisme majeur dans l'adaptation des plantes à leur milieu. Elle leur permet notamment de contrôler l'effort de reproduction et la capture des ressources dans l'environnement. La plasticité en tant que tactique adaptative a été souvent mise en évidence face à un gradient de disponibilité en nutriments (Grime & Mackey, 2002). De nombreuses plantes ajustent leurs capacités d'absorption à la disponibilité en nutriments du milieu par des modifications morphologiques ou physiologiques du système racinaire. Elles peuvent augmenter le volume de sol prospecté en attribuant une proportion plus importante de biomasse aux racines (Schlichting, 1986 ; Gedroc *et al.*, 1996 ; Johnson & Biondini, 2001 ; Volis *et al.*, 2002 ; Hodge, 2004). La variation du rapport root/shoot de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne a ainsi été mise en évidence sur des populations d'orge prélevées dans des environnements contrastés en Israël par Volis *et al.* (2002). Ce rapport augmente avec les stress nutritifs et hydriques, et il apparaît que certaines populations sont plus plastiques et possèdent donc de plus amples capacités à s'adapter aux modifications de l'environnement (Figure 6) (Volis *et al.*, 2002). De la même manière, face à l'hétérogénéité de la distribution des nutriments dans le sol, certaines espèces peuvent modifier leur architecture racinaire (Schlichting, 1986 ; Crick & Grime, 1987 ; Gedroc *et al.*, 1996 ; Johnson & Biondini, 2001 ; Hodge, 2004). Dans une expérience menée sur des plants d'orge dont les racines sont soumises à des apports localisés en nutriments, Drew (dans Hodge, 2004) a montré que la prolifération des racines pouvait être drastiquement orientée par l'hétérogénéité des

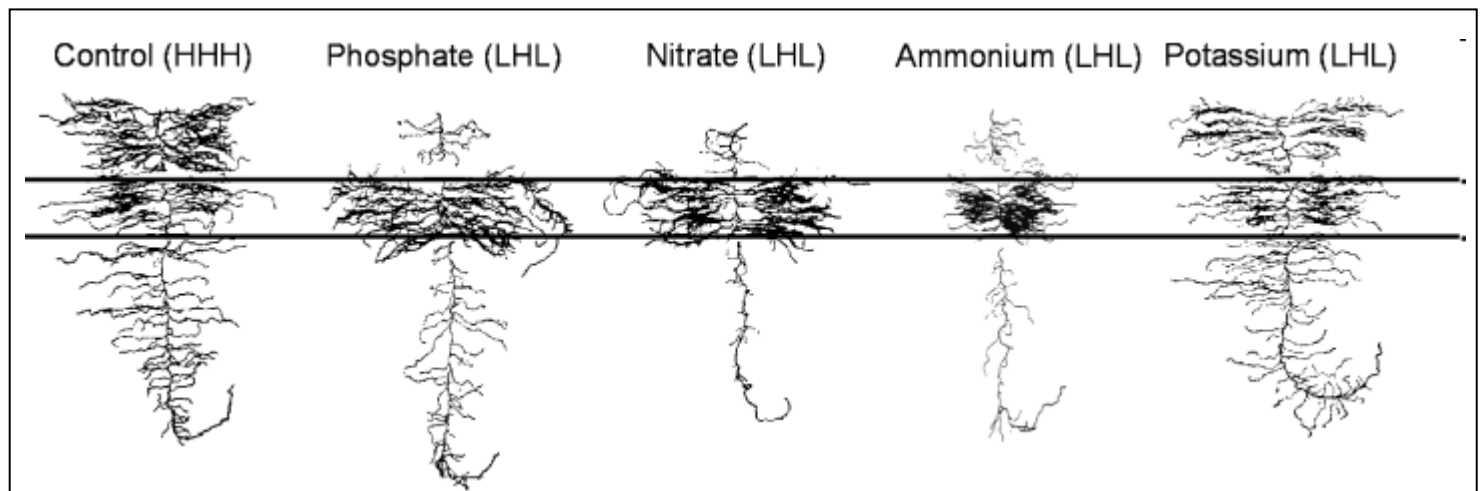


Figure 7. Plasticité de la prolifération racinaire de l'Orge. Des plants cultivés en solution nutritive avec une portion des racines exposée à une concentration 100 fois supérieure en phosphate, nitrate, ammonium et potassium à la concentration du reste du substrat sont comparés à un plant témoin pour lequel les nutriments sont concentrés dans tout le profil racinaire. (LHL (Low High Low) et HHH (High High High) font référence aux concentrations en nutriments dans les trois portions du substrat). (D'après Drew (1975) dans Hodge 2004).

ressources dans le substrat (Figure 7). A plus court terme, les plantes peuvent ajuster la synthèse et l'activité des transporteurs impliqués dans l'absorption des éléments minéraux (Hawkesford *et al.*, 1993 ; Forde & Lorenzo, 2001). Les Fabacées qui fixent l'azote atmosphérique peuvent ainsi ajuster leur demande en N en fonction des conditions du milieu, soit en modifiant le nombre et la masse des nodosités fixatrices formées, soit en régulant l'activité de la nitrogénase (Forde & Lorenzo, 2001).

Les réponses plastiques peuvent permettre l'expression de phénotypes avantageux dans différents contextes écologiques (Bradshaw, 1965 ; Schlichting, 1986 ; Via *et al.*, 1995 ; Sultan, 2005 ; Pigliucci *et al.*, 2006a, 2006b). Ainsi il a été montré que le trèfle blanc pouvait s'adapter à de nombreux scénarios écologiques tels que le froid (Frankow-Lindberg, 1999), les déficiences en potassium (Høgh-Jensen, 2003) et la variation de lumière bleue (Gautier *et al.*, 2001). Mais la plasticité n'est pas toujours adaptative (Scheiner, 1993 ; Sultan, 2000 ; Sultan, 2005 ; van Kleunen & Fischer, 2005 ; Pigliucci *et al.*, 2006a, 2006b). van Kleunen & Fischer (2005) considèrent d'ailleurs que la plupart des réponses plastiques correspondent plus à des conséquences qu'à des réponses. Ainsi, certains traits ne sont plastiques que parce que les conditions de vie sont limitantes pour la biochimie, la physiologie ou le développement des organismes (Sultan, 2000).

II. Croissance, développement et plasticité

II.1. Plasticité ontogénétique

La plasticité est souvent interprétée de manière instantanée en comparant différents individus du même âge produits à l'issue de conditions de vie contrastées. Mais la plasticité s'exprime au cours du temps, elle est dite « dynamique » (Sultan, 2004). Elle peut induire différentes trajectoires ontogénétiques, différentes configurations de développement et peut aussi ne pas être exprimée de manière constante au cours du développement (Pigliucci, 1997 ; Sultan, 2004, 2005). Les différences entre les individus observés peuvent évidemment correspondre à une plasticité phénotypique mais également à un décalage de croissance ou de développement appelé dérive ontogénétique (Coleman *et al.*, 1994 ; McConnaughay & Coleman, 1999 ; Moriuchi & Winn, 2005). Pour analyser exclusivement la plasticité phénotypique, il faut comparer des plantes, non pas au même âge mais au même stade ontogénétique.

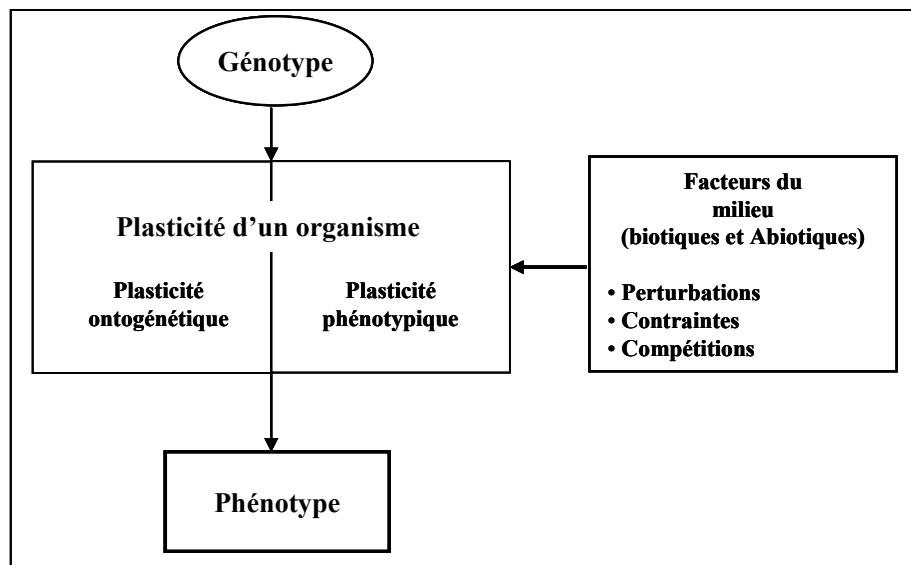


Figure 8. Schéma présentant les composantes de la plasticité (d'après Wright & McConnaughay, 2002).

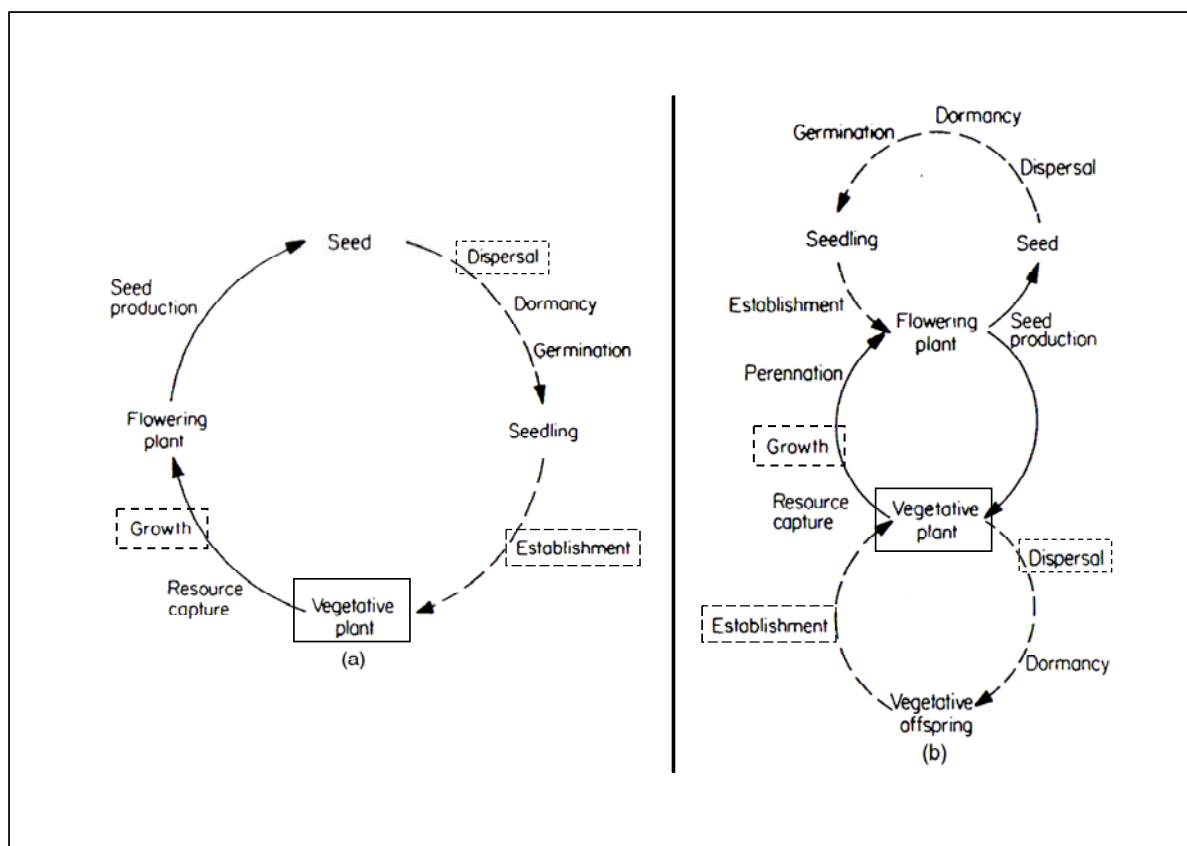


Figure 9. Schéma illustrant les trois phases de la vie d'une plante : a) annuel ; b) pérenne. (Grime *et al.*, 1988).

Wright et McConnaughay (2002) distinguent deux composantes de la plasticité : - la plasticité ontogénétique correspondant à la variation de la trajectoire ontogénétique d'un trait induite par l'environnement, et - la plasticité phénotypique correspondant à la variation d'un trait consécutive à une variation de la croissance induite par l'environnement (Figure 8). Le suivi des phénotypes au cours de la croissance donne accès à la nature de la plasticité et évite de surestimer ou sous-estimer la réponse plastique (Wright & McConnaughay, 2002).

II.2. Analyse de la croissance

La vie de la plante se décompose en trois phases : établissement, persistance et dispersion (Figure 9) (Grime *et al.*, 1988). Au cours de ce cycle, la plante se développe et croît, c'est l'ontogenèse. Le développement concerne toutes les modifications qualitatives et quantitatives qui ont lieu au cours du temps chez une plante c'est-à-dire de la germination à la mort du végétal. Les modifications qui ont lieu lors du développement, sont irréversibles. Le développement détermine le phénotype final du végétal. La croissance, faisant partie du développement, correspond à une augmentation permanente de taille, de masse et de nombre qui n'est pas obligatoirement associée à un changement de forme et d'anatomie (Heller, 1984 ; Cusset, 1991).

La croissance d'un organisme peut être évaluée par la variation de traits quantitatifs dans le temps, elle est généralement mesurée par l'augmentation de sa biomasse. De très nombreuses fonctions mathématiques ont été proposées pour modéliser la croissance (Hunt & Loomis, 1976 ; Buis, 1991 ; Cusset, 1991), mais aucune fonction paramétrique ne peut être généralisée à toutes les espèces et toutes les conditions environnementales (Shipley & Hunt, 1996). Les chercheurs ont donc recours aux techniques statistiques de régressions (Shipley & Hunt, 1996). Parmi les paramètres utilisés pour analyser la croissance des plantes, le taux relatif de croissance, RGR (Relative Growth Rate), est un trait central (Poorter & Remkes, 1990 ; Shipley & Hunt, 1996 ; Hoffmann & Poorter, 2002 ; Hunt *et al.*, 2002). Il a notamment une grande importance dans l'établissement de modèles de stratégies des plantes (Grime & Hunt, 1975 ; Grime *et al.*, 1988 ; Garnier, 1992 ; Tilman, 1998 ; Meziane & Shipley, 1999 ; Grime, 2001). C'est une mesure de l'efficacité de croissance du végétal, c'est-à-dire le taux auquel une quantité donnée de biomasse existante peut produire la nouvelle biomasse par unité de temps (Shipley & Hunt, 1996 ; Shipley, 2000).

Le RGR, dans une approche dite « classique », est obtenu par $RGR = (\ln M_2 - \ln M_1) / (t_2 - t_1)$ où M_1 et M_2 sont les masses sèches aux temps t_1 et t_2 (Fisher, 1921). Cette méthode, la plus

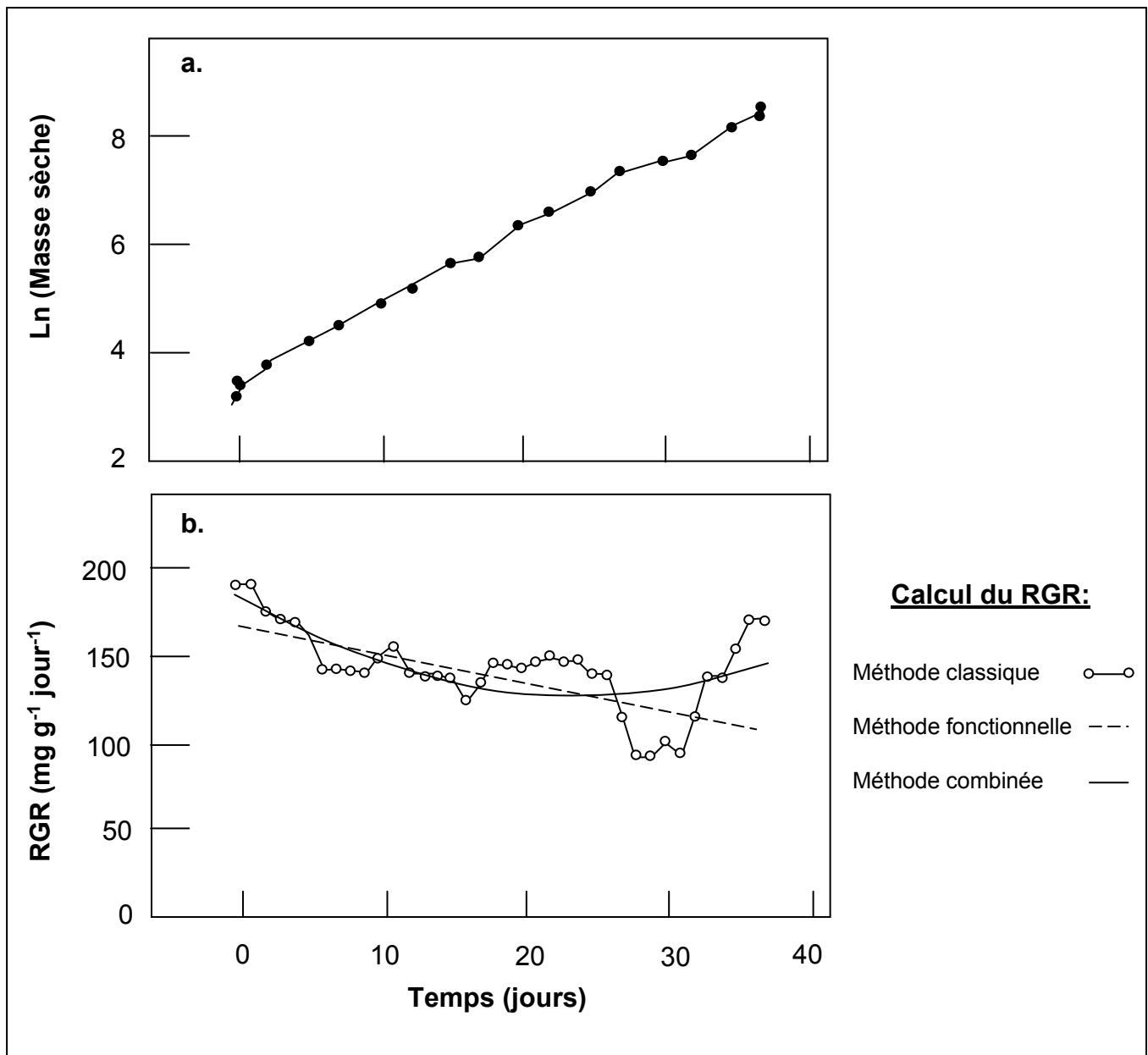


Figure 10. **a.** Variation au cours du temps de la masse sèche de *Carex flacca*. **b.** Variation au cours du temps du RGR calculé selon trois méthodes; l'approche classique via la moyenne de la biomasse produite dans un intervalle de temps, l'approche fonctionnelle, et une approche « combinée » des deux méthodes précédentes. (D'après Poorter, 1989).

ancienne, présente le désavantage de fixer une valeur de RGR dans un intervalle de temps alors que ce taux peut varier énormément entre deux récoltes (Poorter, 1989). L'approche « fonctionnelle », plus récente, du calcul du RGR est basée sur la régression polynomiale du logarithme des masses sèches en fonction du temps. L'équation du RGR est obtenue en dérivant l'équation de la courbe de croissance. Cette méthode a pour avantage de mettre en évidence les dérives ontogéniques (Poorter, 1989). En revanche, le choix du degré du modèle polynomial de la courbe de croissance rend subjective la détermination du RGR alors soit sous-estimé, soit surestimé (Poorter, 1989 ; Shipley & Hunt, 1996). Ainsi le choix d'une polynomiale de degré 1 pour modéliser la croissance impose une valeur constante au RGR (Poorter, 1989). Poorter (1989) propose une alternative au choix d'une méthode classique ou fonctionnelle en utilisant une régression polynomiale des RGR obtenus de manière classique (Figure 10).

Hoffmann et Poorter (2002) en confrontant les différentes méthodes de calcul du RGR, mettent en relief un biais important lié aux analyses de la croissance. Chez les végétaux, les mesures de biomasse sont destructives, ce ne sont donc pas les masses des individus qui sont mesurées au cours du temps mais bien les masses des individus provenant de récoltes différentes. Le calcul du RGR, selon l'approche classique implique donc l'appariement d'individus provenant de deux récoltes successives, et inclut donc une variabilité supplémentaire. C'est pourquoi, Hoffman et Poorter (2002) et Hunt *et al.* (2002) choisissant l'approche classique, proposent de calculer le RGR à partir de la moyenne des logarithmes des masses sèches des plantes :

La méthode de Hoffmann et Poorter (2002) présente l'avantage de ne pas nécessiter d'apparier les individus. Elle soustrait le logarithme de la moyenne des masses des deux périodes de temps :

$$RGR = \frac{(\overline{\ln M_2} - \overline{\ln M_1})}{(t_2 - t_1)}$$

Le RGR, ainsi calculé, est non biaisé comparativement aux estimateurs obtenus par les autres méthodes (Hoffmann & Poorter, 2002).

Le RGR peut être décomposé comme le produit du taux d'assimilation net, NAR (Net Assimilation Rate) et du rapport de surface foliaire, LAR (Leaf Area Ratio). NAR correspond à une variation de biomasse par unité de surface foliaire et par unité de temps et reflète l'efficacité de la photosynthèse à produire de la biomasse malgré les pertes par respiration,

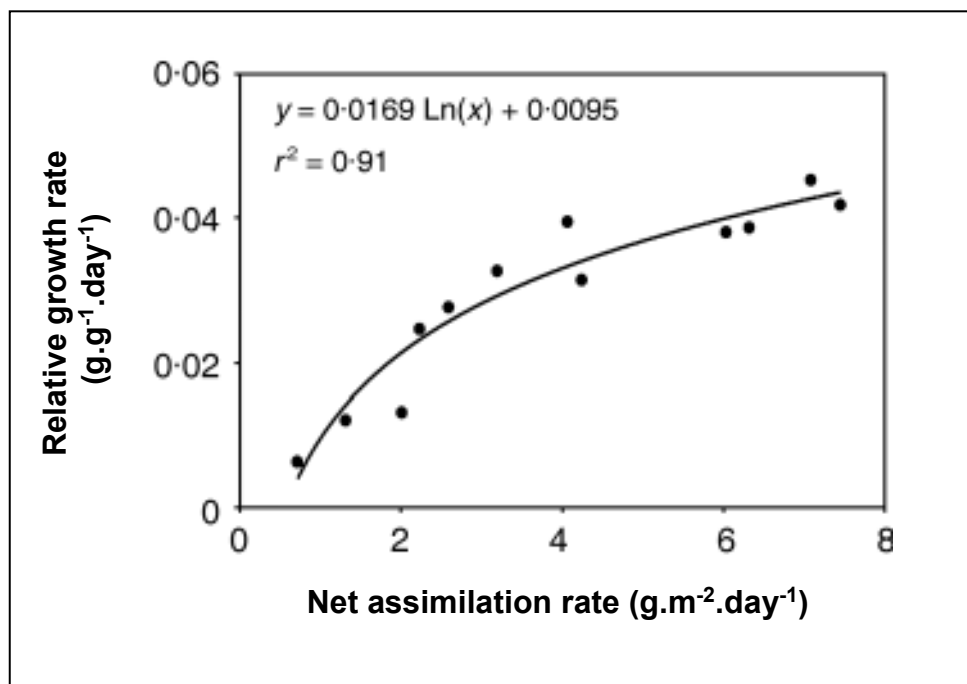


Figure 11. Chez l'érable à feuille de platane soumis à des variations de lumière et de disponibilité en nutriments, le RGR (Relative Growth Rate) est directement dépendant du NAR (Net Assimilation Rate). (Porthmuth & Niinemets, 2007).

exsudation ou volatilisation (Elberse *et al.*, 2003). Cette première composante est dite « physiologique ». LAR est la surface foliaire par unité de masse de la plante entière. Elle correspond au produit de deux composantes dites « morphologiques », la surface foliaire spécifique, SLA (Specific Leaf Area), qui correspond à la surface foliaire par unité de masse foliaire et le rapport de masse foliaire, LMR (Leaf Mass Ratio), qui rapporte la masse des feuilles à celle de la plante entière.

$$\text{RGR} = \underbrace{\frac{dM}{dt} \times \frac{1}{LA}}_{\text{NAR}} \times \underbrace{\frac{LA}{LM}}_{\text{SLA}} \times \underbrace{\frac{LM}{M}}_{\text{LMR}}$$

LAR

(M : masse de la plante entière, LA (Leaf Area) : surface foliaire, LM (Leaf Mass) : masse de la plante)

Les relations entre le RGR et ses composantes NAR, SLA et LMR ont été analysées dans divers contextes écologiques, en situation de contraintes nutritives (Meziane & Shipley, 1999 ; Elberse *et al.*, 2003 ; Portsmouth & Niinemets, 2007) de compétition (Kirongo & Mason, 2003), d'ombrage (Shipley, 2000) ou encore d'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ (Pardos *et al.*, 2006). Ils peuvent agir de manière compensatoire en tamponnant les variations de RGR liées aux variations des facteurs du milieu (Meziane & Shipley, 1999). Les différentes composantes du RGR peuvent être plus ou moins plastiques selon les espèces et les conditions environnementales. Portsmouth et Niinemets (2007) se sont intéressés à la plasticité de cinq espèces arborescentes face à des variations de lumière et de disponibilité en nutriments. Ils ont mis en évidence chez l'érable à feuilles de platane, une relation très forte entre le RGR et le NAR (Figure 11). Cette espèce tolérante à l'ombre, ne modulerait que très peu ses paramètres structurels (SLA et LMR), contrairement aux espèces moins tolérantes comme le bouleau pubescent ou le peuplier tremble. Dans la plupart des études, il apparaît que les variations du RGR sont principalement dues aux variations du NAR, sa composante physiologique (Elberse *et al.*, 2003 ; Kirongo & Mason, 2003 ; Pardos *et al.*, 2006 ; Shipley, 2006 ; Portsmouth & Niinemets, 2007).

Chapitre :

2 Interaction de la fixation de l'azote avec les nutriments minéraux

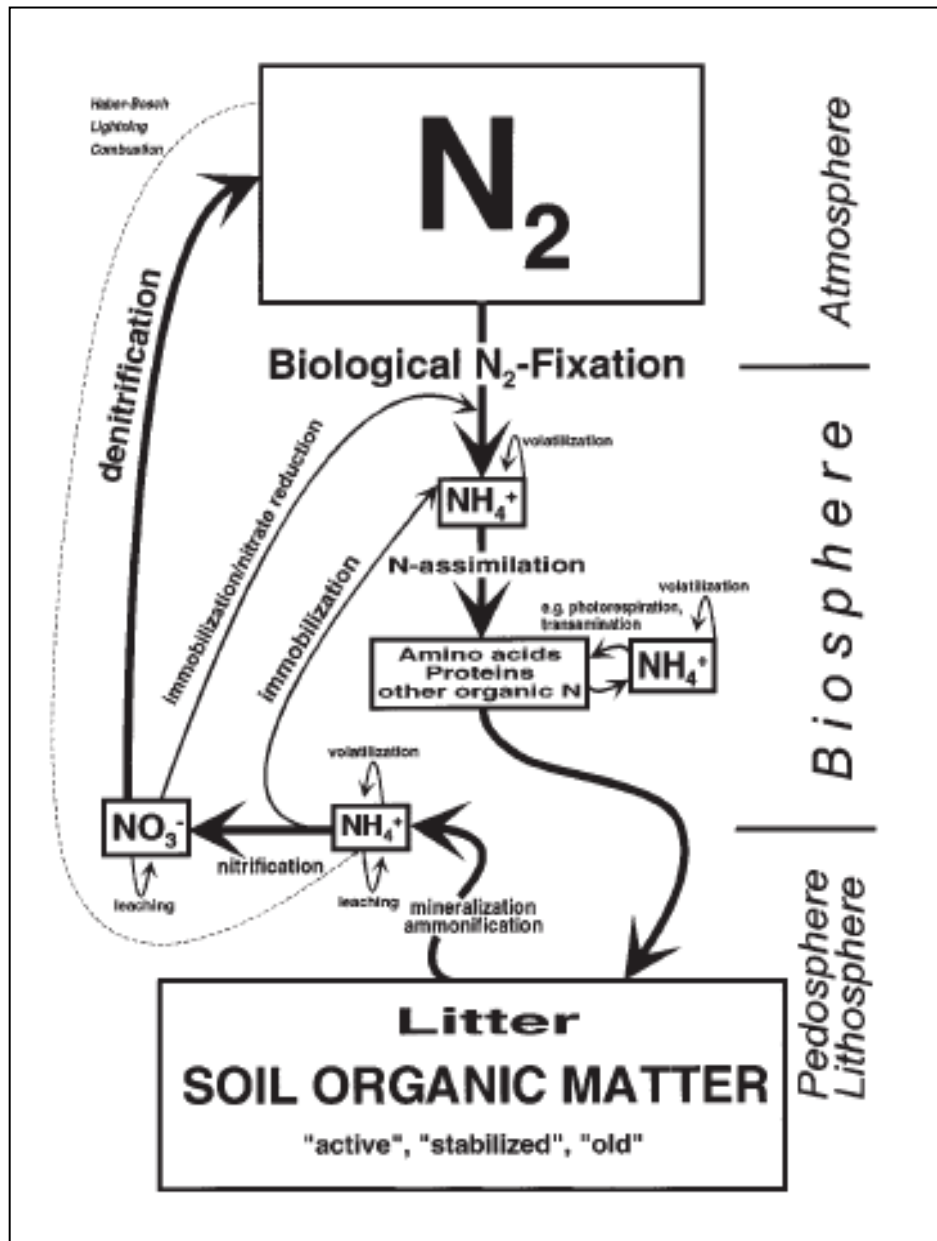


Figure 12. Description schématique du flux d'azote entrant dans l'écosystème terrestre basé sur l'atmosphère, la biosphère, le concept de la pédosphère. (Hartwig, 1998).

Interaction de la fixation de l'azote avec les nutritions minérales

I. Importance agro-écologique de la fixation de l'azote atmosphérique

L'azote (N) est le quatrième élément le plus abondant dans la biomasse des végétaux après le carbone (C), l'hydrogène (H) et l'Oxygène (O) (Larcher, 1995). Malgré son abondance dans l'atmosphère (79% de l'azote est sous forme de diazote atmosphérique), l'azote constitue le principal facteur limitant la croissance des plantes dans de nombreux écosystèmes. 99,9% de l'N est sous forme gazeuse alors que seulement 0,00001% est sous une forme combinée (nitrate, ammonium ou organique) et peut être absorbé par les plantes dans la biosphère (Hartwig, 1998). La fixation biologique de l'azote, qui permet la réduction de l'N atmosphérique en ammonium, représente la principale voie d'introduction de l'N dans la biosphère (Figure 12) (Hartwig, 1998). Elle constitue l'un des principaux processus de soutien de la vie car il est établi qu'entre 80 et 90 % de l'N disponible dans les écosystèmes provient de ce processus (Falkowski, 1997 ; Cumino *et al.*, 2007).

Dans les prairies, le trèfle des prés (*Trifolium pratense*) peut fixer jusqu'à 373 Kg N.ha⁻¹.an⁻¹ et le trèfle blanc jusqu'à 545 Kg N. ha⁻¹.an⁻¹ (Høgh-Jensen & Schjoerring, 2001 ; Carlson & Huss-Danell, 2003). Pour des raisons économiques et environnementales, l'utilisation de plantes fixatrices constitue une très bonne alternative à l'utilisation d'engrais azotés. En effet, une partie de l'azote fixé par les Fabacées est rhizodéposée dans le sol et peut profiter aux plantes compagnes ou aux cultures suivantes (Paynel *et al.*, 2001 ; Wichern *et al.*, 2008).

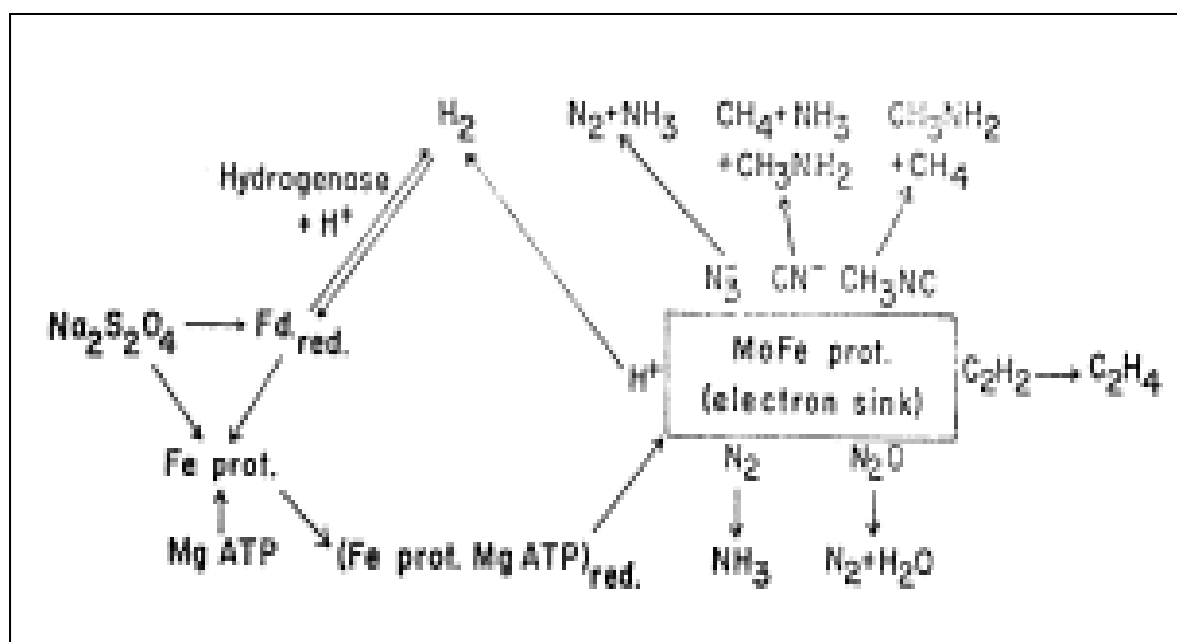


Figure 13. Mécanisme actuellement proposé pour la fixation biologique de N_2 et de ces différents substrats alternatifs. La ferrédoxine réduite ou le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ réduit la Fe-protéine de la nitrogénase. La Fe-protéine réduite est liée au MgATP, son potentiel est abaissé environ à -490 mV, et acquiert le potentiel réducteur pour réduire la MoFe-protéine du complexe nitrogénase. La MoFe-protéine réduite sert de siphon électronique et de site catalytique permettant la réduction des divers substrats. La MoFe-protéine est ensuite oxydée. Les quatre côtés du rectangle schématisant la nitrogénase illustrent les sites enzymatiques utilisés par les substrats alternatifs de cette enzyme par exemple le N_2 et les N_2O concourent pour un emplacement commun, et N_3^- , CN^- , et CH_3NC concourent pour un emplacement commun et enfin l'acétylène C_2H_2 molécules concurrent qui est utilisé dans la méthode ARA. L'évolution de la production du H_2 est prise en charge par l'intermédiaire de l'hydrogénase enzyme n'exigeant pas d'ATP. (Burris, 1974).

II. Bases morphologiques et biochimiques de la fixation de l'azote atmosphérique

II.1. La symbiose fixatrice

Les organismes diazotrophes, capables de réduire l'azote atmosphérique sont tous des procaryotes qui fixent l'azote gazeux grâce à une enzyme anaérobie : la nitrogénase. Parmi ces procaryotes, certains, tels que les bactéries de la famille des Rhizobiacées ou certaines cyanobactéries, sont capables de former des symbioses avec des plantes supérieures. Dans le cas de la symbiose formée entre les Rhizobiacées et les Fabacées, la fixation résulte d'interactions morphologiques et physiologiques finement régulées au sein d'organes spécialisés : les nodules racinaires ou nodosités.

II.2. Mesure de la fixation du N_2 chez les Fabacées

Les Fabacées fixatrices d'azote utilisent pour leur croissance deux sources d'azote : l'azote soluble provenant du sol (et éventuellement de l'engrais) et l'azote atmosphérique. Plusieurs méthodes ont été développées pour distinguer la contribution de chacune de ces deux sources dans la croissance de la Fabacée.

II.2.1. Méthode d'Activité de Réduction d'Acétylène de la nitrogénase

La méthode d'A.R.A. (Acetylene Reduction Activity) se fonde sur le fait que la nitrogénase réalise la catalyse de plusieurs substrats alternatifs autre que le N_2 (Figure 13) (Burris, 1974 ; Hopmans *et al.*, 1983). Parmi ces substrats alternatifs, l'enzyme a une affinité élevée pour l'acétylène (C_2H_2) qu'elle peut réduire en éthylène (Barney *et al.*, 2004). Ainsi, l'ARA mesure l'activité de réduction de l'acétylène en éthylène. Pour ce faire, les nodules ou les racines nodulées sont placés dans une atmosphère contenant environ 10% d'acétylène. La production d'éthylène au cours du temps est mesurée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (Hopmans *et al.*, 1983 ; Ledgard & Steele, 1992). La méthode est relativement bon marché et donne des résultats rapides, par rapport aux méthodes isotopiques, mais ne permet pas de quantifier l'azote fixé sur un cycle de croissance.

II.2.2. Utilisation de ^{15}N

Les techniques qui utilisent l'isotope stable ^{15}N de l'azote pour mesurer la fixation de l'azote atmosphérique sont basées soit sur les différences d'abondance naturelles en ^{15}N entre

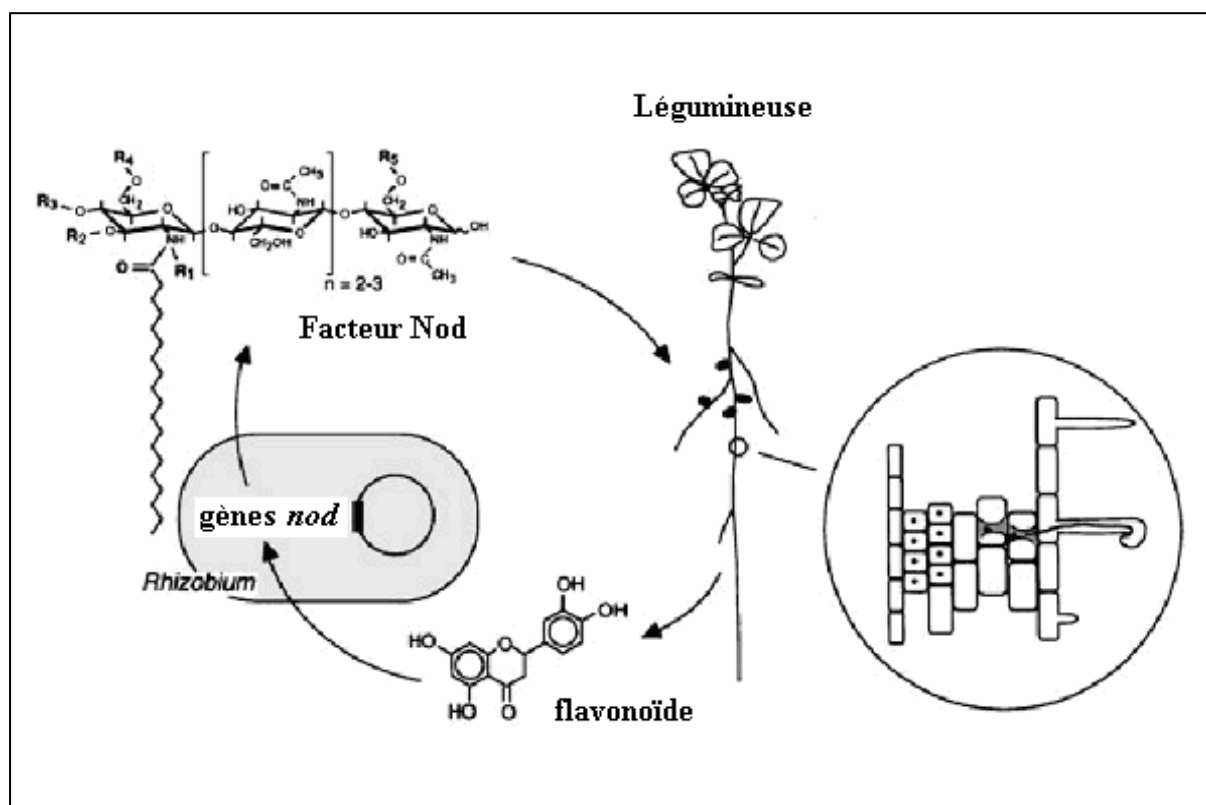


Figure 14. Echange moléculaire entre la légumineuse et la bactérie symbiotique (*Rhizobium*) durant la symbiose fixatrice du N_2 . Les flavonoïdes produits par la légumineuse induisent la production des facteurs de nodulation (facteurs Nod) issue de l'activation des gènes de nodosités (*nod*). Ces facteurs de nodulation (facteurs Nod) sont des lipochitooligosaccharides (LCOs). Ils sont modifiés et spécifiques de l'espèce bactérienne impliquée dans la symbiose. Les différents substituant possible sont : en R1 : méthyl ; R2 et R3 : carbamyl ; R4 acétyl ou carbamyle ; R5 : sulfate, acétyl, D-arabinose et différents fucoses. L'agrandissement montre un cordon d'infection passant dans la racine induisant la division cellulaire chez la plante qui va former un nodule primaire. (Shultze & Kondorosi, 1998).

l'azote de l'air et l'azote du sol, soit sur des enrichissements en ^{15}N de l'une de ces deux sources.

Il est possible d'utiliser l'abondance naturelle en ^{15}N des sols. En effet, les sols ont généralement une abondance naturelle en ^{15}N plus élevée que l'atmosphère. La fixation de l'azote atmosphérique peut donc être estimée indirectement par la différence d'abondance isotopique de l'N entre une plante non fixatrice qui n'utilise que l'N du sol et une plante fixatrice (Høgh-Jensen, 2006). La précision de la mesure est améliorée lorsqu'on enrichit le sol en ^{15}N minéral par l'utilisation de la méthode dite de la dilution isotopique du ^{15}N soluble par l'N atmosphérique pauvre en ^{15}N . Une plante non fixatrice du N_2 cultivée sur la même solution doit être utilisée pour estimer l'excès isotopique de l'azote soluble disponible pour les plantes grâce à l'équation (Ledgar & Steele, 1992) :

$$\% \text{Ndfa} = (1 - (\text{Excès Isotopique plante fixatrice} / \text{Excès Isotopique plante fixatrice})) \times 100$$

(Ndfa : N derived from the atmosphere)

La fixation de l' N_2 peut être mesurée directement en fournissant du $^{15}\text{N}_2$ gazeux soit au compartiment racinaire soit à la plante entière (Voisin *et al.*, 2003 ; Lesuffleur, 2007). La mesure de l'excès isotopique permet alors d'estimer directement la quantité d'azote fixé par la Fabacée en un temps donné. Cette méthode donne une très bonne estimation de la quantité d'N fixé dans les conditions réelles mais est relativement coûteuse et est difficilement applicable à grande échelle pour évaluer les quantités totales d'N fixé le long d'un cycle de culture.

II.3. Morphogénèse des nodules

II.3.1. Initiation et formation des nodules

La formation des nodules racinaires est initiée par un dialogue moléculaire entre la plante hôte (Fabacée) et le micro-symbiote (Rhizobium) (Figure 14) (Schultze & Kondorosi, 1998). Les Rhizobiums répondent par chimiotactisme positif aux exsudats racinaires de la plante en migrant vers les racines (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). La formation des nodules est induite par des flavonoïdes, tels que la génistéine du soja (Mulder *et al.*, 2005) et des lectines (Dazzo & Hubbell, 1975) telles que la trifoliine du trèfle (Dazzo *et al.*, 1978), qui sont excrétées dans la rhizosphère par les racines des Fabacées (Schultze & Kondorosi, 1998 ; D'Haese & Holsters, 2002). Ces composés activent chez les Rhizobium les gènes Nod, qui induisent la synthèse de lipo-chito-oligosaccharides nommés facteurs Nod (Figure 14) (Schultze & Kondorosi, 1998). La spécificité de l'hôte est déterminée par l'ensemble de ces

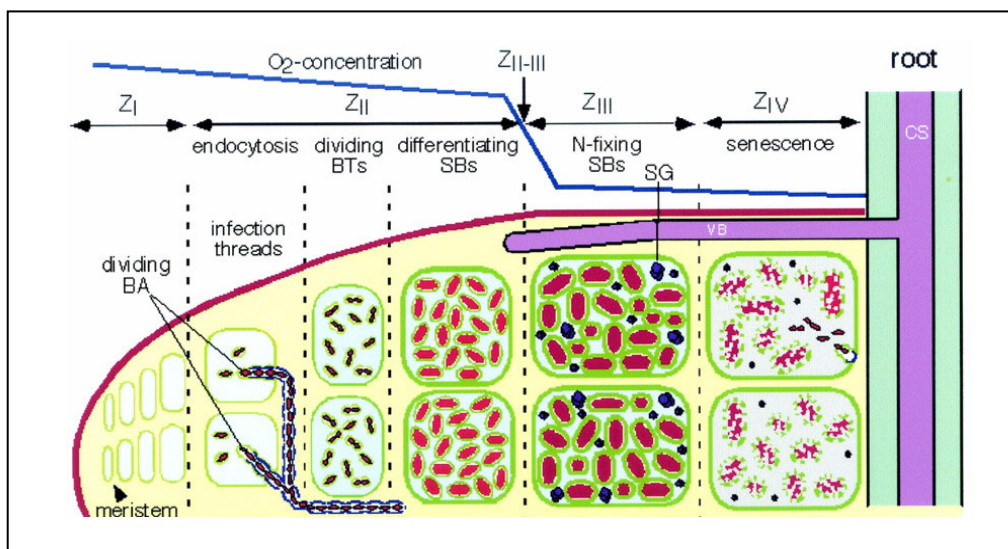


Figure 15. Présentation schématique de l'élargissement d'un nodule indéterminé, BA, bactérie; BTs, bactéroïdes; SBs, symbiosomes; SG, grain d'amidon; CS, stèle centrale; VB, vascularisation. Les différentes zones nodulaires (z) impliquées dans l'élargissement. (Patriarca *et al.*, 2002).

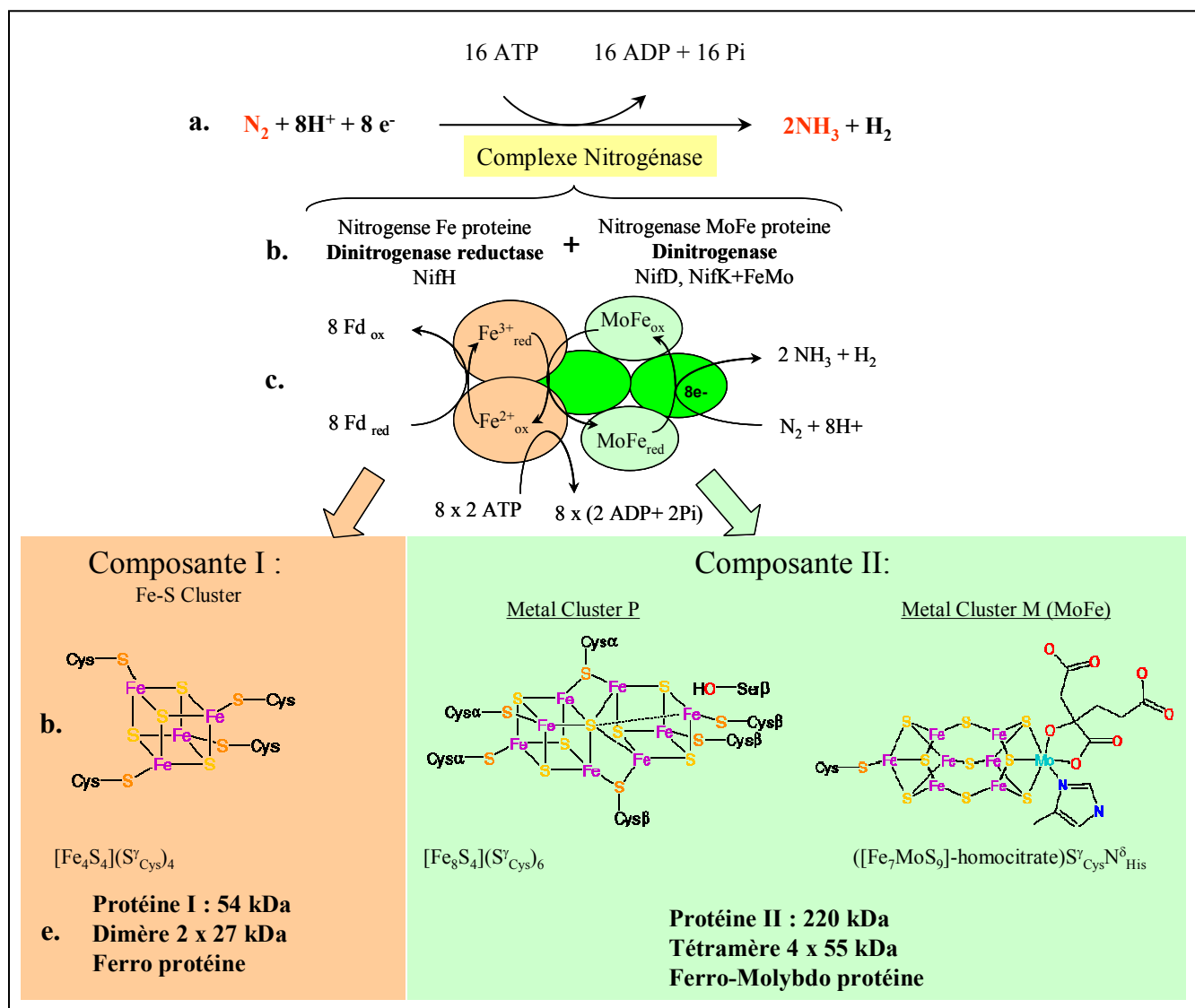


Figure 16. Présentation : **a.** du bilan réactionnel de la fixation du N₂, **b.** du détail de cette réaction catalysée par la nitrogénase et **c.** de la structure de la nitrogénase. **b.** La ferrédoxine réduit la Fe protéine en se liant à celle-ci et permet l'hydrolyse de l'ATP au niveau de la Fe protéine, ce qui provoque un changement de conformation facilitant les réactions redox. La Fe protéine réduit la MoFe protéine. Puis, la MoFe protéine réduit le N₂. Il est possible que deux Fe protéines se lient en même temps à la MoFe protéine. (Les flèches présentent le transfert des électrons lors de la réaction). **d.** et **e.** Description de la nitrogénase qui est composée de plusieurs sous-unités codées par les gènes *nifD*, *nifH* et *nifK*. La transcription de ces gènes est contrôlée par le régulateur NifA. **e.** Elle comprend deux composantes à centre fer/S. (d'après Halbleid & Ludden, 2000 ; Howard & Rees, 2006 ; Lee & Holm, 2003 ; Syrtosa *et al.*, 2006).

molécules, et en particulier par la structure des facteurs Nod (Philip-Hollingsworth *et al.*, 1989 ; D'Haeze & Holsters, 2002). Le facteur Nod induit à son tour un certain nombre de réponses spécifiques dans la racine telles que la déformation des poils absorbants ou la synthèse de protéines spécifiques, appelées nodulines. Certaines nodulines précoces, telles que la dd23b du trèfle qui contient une cystéine dans son centre actif (Crockard *et al.*, 2002), sont également impliquées dans la formation de la symbiose, alors que les nodulines tardives, telles que la nitrogénase sont impliquées dans son fonctionnement. Dans la nodosité, les bactéries sont entourées d'une membrane pér bactéroïdienne (ou symbiosome) et forment des îlots appelés bactéroïdes (Patriarca *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2007). Les nodosités indéterminées formées sur les Fabacées d'origine tempérée comme le trèfle sont caractérisées par une activité méristématique persistante, qui donne une forme ovale aux nodules (Figure 15) alors que les Fabacées d'origine tropicale donnent des nodules plus arrondis et sont caractérisées par une activité méristématique déterminée (Patriarca *et al.*, 2002).

La formation des nodosités résulte donc d'un processus complexe et de la synthèse de nombreuses molécules impliquées dans le dialogue moléculaire entre les deux partenaires.

II.4. Réduction du diazote atmosphérique

II.4.1. Structure de la nitrogénase

La nitrogénase (EC 1.18.6.1) est l'enzyme clef de la fixation de l' N_2 , elle catalyse la réduction du N_2 atmosphérique en NH_4^+ dans les bactéroïdes. Cette enzyme est un complexe de deux métalloprotéines : la Fe-protéine ou dinitrogénase réductase et la MoFe-protéine ou dinitrogénase (Burris, 1974 ; Dean *et al.*, 1993 ; Halbleid & Ludden, 2000 ; Lee & Holm, 2003 ; Howard & Rees, 2006 ; Syrtsova *et al.*, 2006) (Figure 16). La dinitrogénase réductase est un homodimère d'environ 50 à 60 kDa qui contient un centre fer/soufre simple ($[Fe_4S_4](S^{\gamma}Cys)_4$). La MoFe-protéine est un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ d'environ 220 kDa contenant un centre Fe/S ($[Fe_8S_4](S^{\gamma}Cys)_6$) et un centre MoFe/S ($[Fe_7MoS_9]$ -homocitrate) $S^{\gamma}CysN^{\delta}His$). Cet hétérotétramère contient un complexe molybdothiol, comprenant du molybdène et des liaisons thiols provenant de la L(+) cystéine. Il s'agit du centre catalytique qui réduit le diazote en présence de pouvoir réducteur et d'une source d'énergie, l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Le S, du fait de la présence de la cystéine, le Fe et le Mo sont donc des composants essentiels de la structure de la nitrogénase.

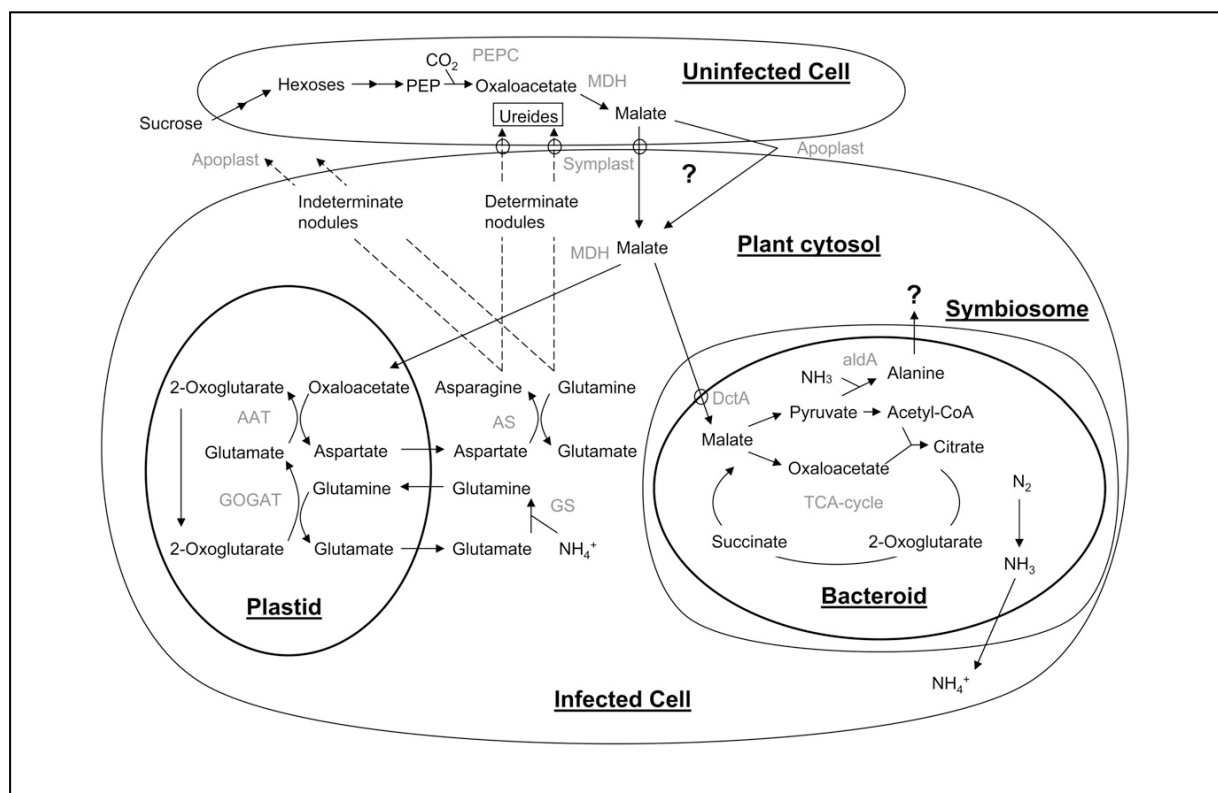


Figure 17. Présentation des échanges d'éléments nutritifs et moléculaires au sein des nodules de Fabacées. Dans les nodules déterminés, il y a habituellement plusieurs bactéroïdes inclus dans la membrane du symbiosome à la différence du bactéroïde simple des nodules indéterminés. La synthèse d'uréides se produit seulement dans des cellules non infectées des nodules déterminées. (White *et al.*, 2007).

II.4.2. Réaction catalysée par la nitrogénase

La réaction (Figure 16) débute par la réduction de la Fe-protéine par les donneurs d'électrons que sont la ferrédoxine ou la flavodoxine (Yoch & Carithers, 1979 ; Howard & Rees, 2006). Les ferrédoxines sont des protéines acides, de faible masse moléculaire, solubles et à centre fer-soufre. Les électrons sont ensuite transférés à partir de la Fe protéine vers la MoFe-protéine grâce à un processus qui implique l'hydrolyse de MgATP. 16 moles d'ATP sont nécessaires à la réduction d'une mole de N_2 en condition réelle de fixation (Bergersen, 1991). Un quart des électrons impliqués dans la réaction sont employés pour produire du dihydrogène H_2 à partir de proton H^+ . Certaines bactéries utilisent une hydrogénase qui catalyse l'oxydation du H_2 en H_2O (Burris, 1974) en produisant une molécule d'ATP. Cette hydrogénase permet donc de recycler une partie du H_2 produit et de limiter les pertes d'énergie (Burris, 1974 ; Simpson, 1987).

II.4.3. Alimentation en substrats carbonés des nodules

L'alimentation en substrats carbonés du nodule est cruciale pour le fonctionnement de la nitrogénase d'une part en raison du coût énergétique de l'activité nitrogénase et d'autre part en raison de la nécessité de fournir des squelettes carbonés nécessaires à l'assimilation de l'ammonium. Les composés carbonés doivent traverser les membranes du symbiosome et des bactéroïdes (Figure 17) (White *et al.*, 2007). La forte vascularisation des nodosités permet la fourniture de saccharose issu de la photosynthèse (Gordon *et al.*, 1999 ; White *et al.*, 2007). Il est largement admis que des acides carboxyliques tels que le malate et non les sucres comme le saccharose sont fournis aux bactéroïdes (Colebatch *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 2007). L'hydrolyse du saccharose par une Sucrose Synthase (SuSy) ou une invertase, la glycolyse, puis l'action séquentielle de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCase) et la malate déshydrogénase (MDH) permettent ainsi la conversion de glucides issus de la photosynthèse en oxaloacétate puis malate (Vance & Heichel, 1991 ; Chopra *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2007). L'activité de la PEPCase et de la MDH augmentent pendant le développement des bactéroïdes (Appels & Haaker, 1988 ; Colebatch *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 2007). Chez les Rhizobium, le cycle des acides tricarboxyliques est la voie métabolique centrale. Il peut utiliser le malate introduit dans le bactéroïde grâce à un transporteur DctA (Figure 17) (White *et al.*, 2007). L'oxydation des composés par l'intermédiaire du cycle de Krebs fournit des Coenzymes réduits, de l'ATP, et des métabolites nécessaires à la production d'acides aminés ou à d'autres voies biosynthétiques.

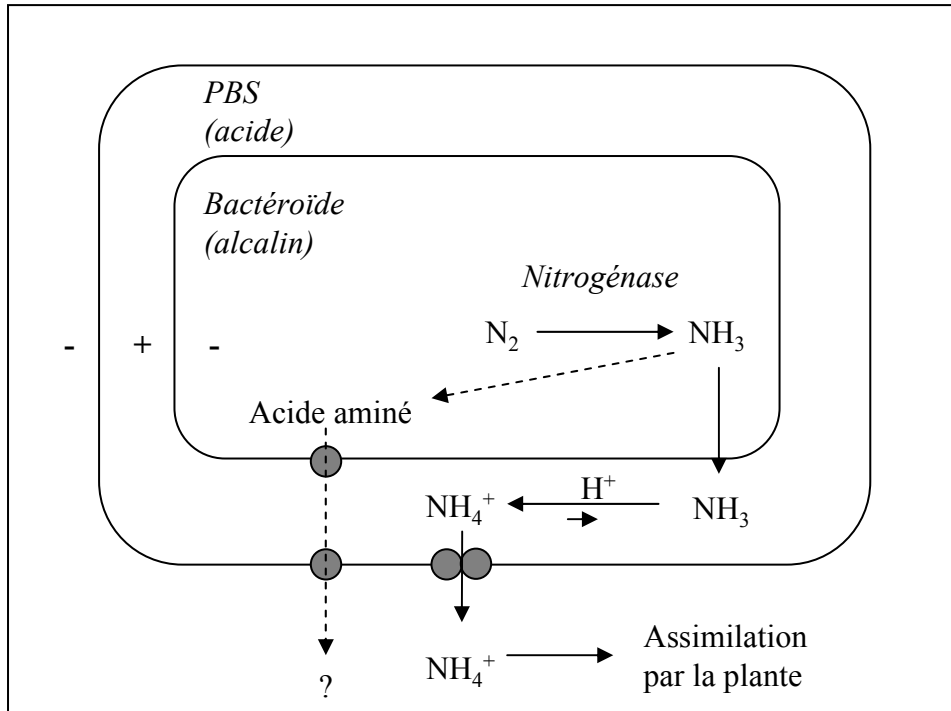


Figure 18. Transport de l'Ammonium dans le bactéroïde. L'ammoniaque produit dans le bactéroïde se diffuse dans l'espace pér bactéroidien (PBS). La molécule est protonée dans l'environnement acide de cet espace. La suppression de l'ammonium empêche le recyclage de l'ammonium dans le bactéroïde. Le mouvement des ions ammonium dans le cytoplasme des cellules infectées de la Fabacée exige le fonctionnement d'un canal ionique. L'assimilation d'ammoniaque en acide aminé se produit dans les bactéries du bactéroïde et également dans les cellules végétales infectées. (d'après Day *et al.*, 2001).

II.4.4. Devenir du NH_4^+ dans les nodules

L'ammoniaque exporté du bactéroïde vers le cytoplasme des cellules de la Fabacée est rapidement transformé en ammonium grâce à la forte disponibilité en H^+ de l'espace pér bactéroïdien, dont le pH est acide (Figure 18) (Day *et al.*, 2001) et est exporté dans la plante. Les travaux de Waters *et al.* (1998) montrent que l'azote réduit peut également être exporté du bactéroïde sous forme d'alanine, chez le soja. Le métabolisme complexe qui va permettre la synthèse des acides aminés ou d'uréides fait intervenir plusieurs échanges de composés N réduits entre les deux partenaires (Figure 17) (White *et al.*, 2007). Dans les Fabacées tempérées, l'ammonium libéré par les bactéroïdes est assimilé en glutamine puis glutamate par l'intermédiaire de la voie de Gln synthétase / Glu synthase (GS/GOGAT) (Patriarca *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2007). Les nodosités des Fabacées tempérées exportent principalement de l'asparagine (Asn) vers les autres organes de la plante hôte, tandis que les Fabacées tropicales exportent surtout des uréides (Figure 17) (Goggin *et al.*, 2003 ; White *et al.*, 2007).

II.5. Rôle de l'oxygène et mécanismes de régulation de l'approvisionnement en O_2 dans le nodule

L'oxygène joue un rôle double dans le fonctionnement de la symbiose, puisque c'est à la fois le substrat respiratoire qui fournit l'énergie nécessaire à la réduction du N_2 et un puissant inhibiteur qui dénature la nitrogénase (Dixon & Wheeler, 1986). Ainsi, la fixation biologique du N_2 se produit dans des conditions anaérobies ou plus précisément microaérobies dans une gamme de concentrations comprises entre 3 et 30 nM (Bergersen, 1982 ; Witty *et al.*, 1987 ; Sprent & Sprent, 1990) bien que les nodules doivent maintenir un flux important d' O_2 . L'apport d'oxygène au bactéroïde est donc finement régulé, et constitue un des principaux mécanismes de régulation de la fixation par les facteurs externes. Les nodules développent des structures et différents mécanismes permettant la gestion de l'approvisionnement régulier et efficace en O_2 dans la zone infectée.

En premier lieu, cet apport est régulé au niveau d'une barrière de résistance à la diffusion de l' O_2 constituée par 1 à 3 assises cellulaires au niveau du parenchyme cortical qui entoure la zone centrale infectée des nodules (Hunt & Layzell, 1993 ; Neo & Layzell, 1997). Les mécanismes permettant de réguler la perméabilité au gaz restent encore controversés. Plusieurs mécanismes ont été proposés, ils incluent notamment des changements de la teneur en eau des espaces intercellulaires du parenchyme du nodule dus à des osmotocums ou des

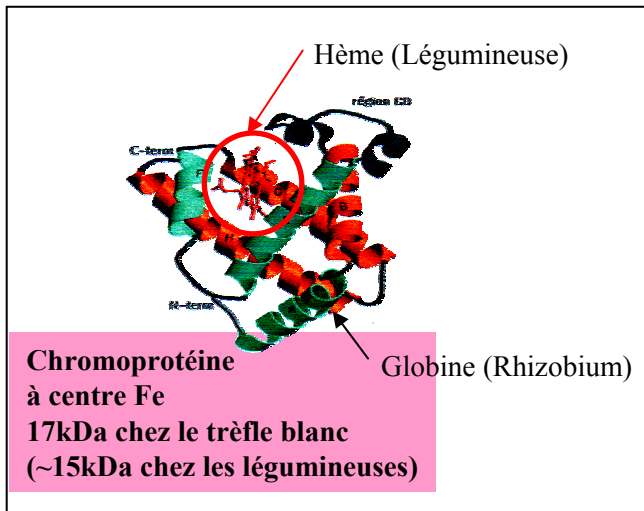


Figure 19. La léghémoglobine est une protéine d'environ 15 kDa. Elle fait partie de la super famille des hémoglobines dont l'hème ferrique est produit par la légumineuse et la globine par la bactérie symbiotique (Rhizobium). (Santana *et al.*, 1998 ; Labarre, 2006).

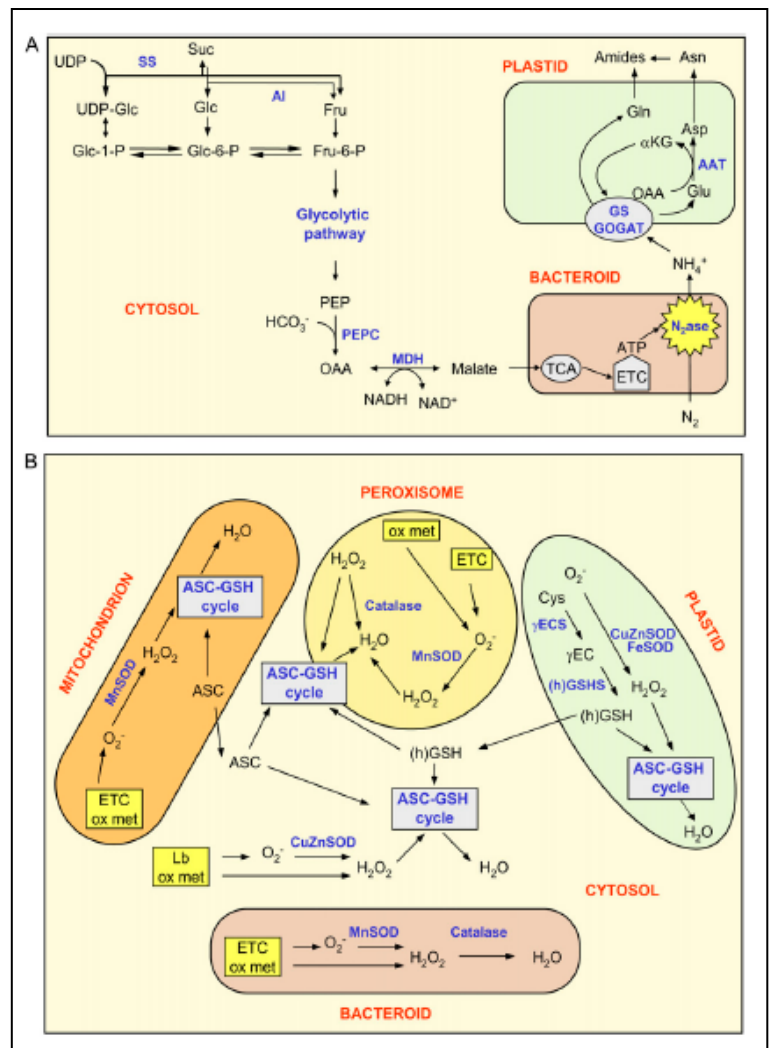


Figure 20. Schéma de quelques itinéraires métaboliques du nodule impliquant la Léghémoglobine (Lb), le Glutathion (GSH) et les ROS. A) Métabolisme du carbone et de l'azote dans les nodules d'une Fabacée productrice d'amides tel que la luzerne. B) Production de ROS et quelques systèmes antioxydants importants des nodules de légumineuse. AAT, Asp aminotransférase ; ASC, ascorbate ; Etc., chaîne de transfert d'électron ; GS, Gln synthétase ; OAA, oxaloacétate ; le ox met, métabolisme oxydant ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase ; MDH, malate déshydrogénase ; TCA, cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs. (Naya *et al.*, 2007).

protéines spécifiques qui contrôlent la diffusion de l'O₂ (VandenBosch *et al.*, 1994 ; Denison & Kinraide, 1995). La dépolarisation rapide et réversible des membranes (Denison & Kinraide, 1995) peut également modifier la diffusion de l'O₂.

En second lieu, le puits intense pour l'O₂ constitué par la chaîne respiratoire permet d'établir un gradient de concentration en O₂ intracellulaire (Thumfort *et al.*, 1999), tout en produisant de l'ATP par phosphorylation oxydative. Les mitochondries des cellules infectées sont distribuées principalement autour de la périphérie du bactéroïde et à proximité de la paroi cellulaire et des espaces aériens intercellulaires (Bergersen, 1982).

Enfin, la légghémoglobine (Lb) transporte l'O₂ et assure la diffusion de l'O₂ du cytosol vers les bactéroïdes tout en protégeant la nitrogénase des dommages de l'oxygène (Kawashima *et al.*, 2001). Cette protéine monomérique, de 15 à 17 KDa de la famille des hémoglobines, est produite par la bactérie dans le nodule mais contient un hème ferrique provenant de la Fabacée (Harutyunyan *et al.*, 1995 ; Santana *et al.*, 1998 ; Labarre, 2006) (Figure 19). Chez le pois, cinq isoformes différentes classées en deux types (Lb A et Lb B) ont été identifiées (Kawashima *et al.*, 2001). Le type Lb A montre une affinité plus élevée pour l'O₂. Elle facilite la diffusion de l'O₂ dans les cellules infectées de sorte qu'un flux élevé contrôlé d'O₂ de concentration régulée se produise rapidement au sein du bactéroïde pour maintenir sa respiration (Appleby, 1992 ; Kuzma *et al.*, 1993). La réaction $Lb + O_2 \rightarrow LbO_2$ présente un K_m d'environ 37mM (Bergersen, 1982). Lb est produit en forte quantité et concentration dans le cytosol des cellules infectées de la plante hôte (Appleby, 1984 ; Hunt & Layzell, 1993 ; Arredondo-Peter *et al.*, 1998). Chez le soja, la concentration en Lb dans le cytosol est estimée à 3mM (Bergersen, 1982). Par ailleurs, la Lb est encline à l'auto-oxydation favorisée par le pH acide du cytosol, et à la présence de radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Naya *et al.*, 2007). Chez le soja (*Glycine max* L.), la Lb agit en association avec les mécanismes Ascorbate/GSH et protège le nodule contre les ROS (Figure 20) (Puppo *et al.*, 1993 ; Naya *et al.*, 2007).

L'alimentation en O₂ des nodules apparaît donc comme centrale dans la régulation de la fixation.

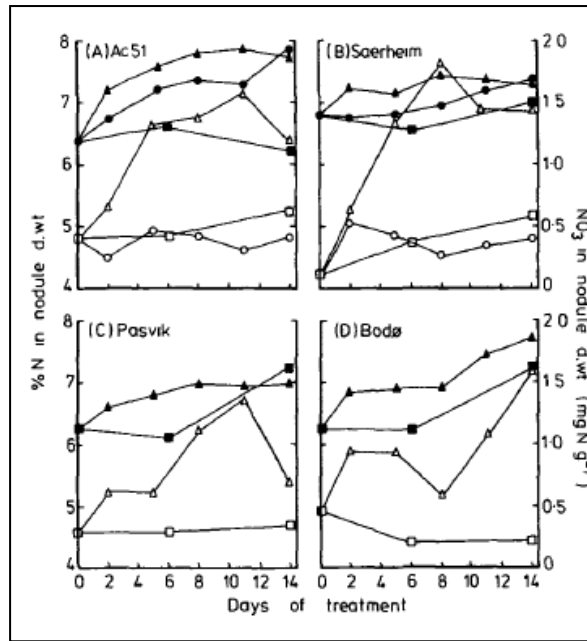


Figure 21. Modification des concentrations en N total (symboles noirs) et en NO₃⁻ (symboles blancs) dans la matière sèche des nodules pendant les 14 jours suite à l'apport de NH₄⁺ (cercle) ou NO₃⁻ (triangle), comparé à une plante contrôle pour la fixation du N₂ (carré) chez des trèfles blancs de quatre origines géographiques. (Svenning *et al.*, 1996).

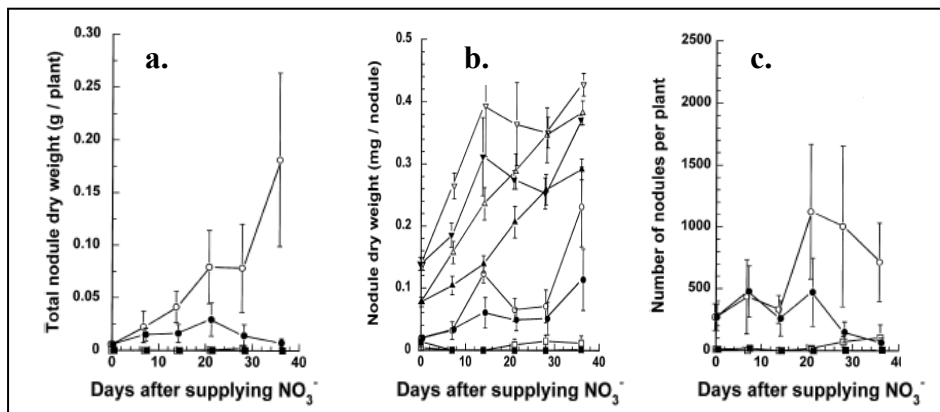


Figure 22. Modification au cours du temps : **a.** du poids sec de nodule total par plante, **b.** de la masse moyenne d'un nodule et **c.** du nombre de nodules par plante pour quatre lignées de trèfle blanc après un approvisionnement de 20 μM de NO₃⁻ (symboles noirs) comparé aux plantes dépendant seulement de la fixation de N₂ (symboles blancs). (i) Lignée A (rond), lignée B (triangle), lignée C (triangle inversé) et D (carré). (ii) Moyennes et erreurs standards (n=4). (Abberton *et al.*, 1998).

III.Effet de l'alimentation en ammonium (NH_4^+) et en nitrate (NO_3^-) sur la fixation de l'azote

III.1. Effet sur la nodulation

Le développement des nodules fixateurs est régulé par les facteurs du milieu (Walsh *et al.* 1995 ; Schultze & Kondorosi, 1998 ; Forde & Lorenzo, 2001). De nombreuses contraintes telles que les stress hydriques, salins ou les stress nutritifs réduisent le nombre et la masse des nodules formés (Walsh *et al.*, 1995). L'alimentation en N minéral réduit également la nodulation. Ainsi, le nitrate inhibe spécifiquement la nodulation sans modifier la croissance des autres organes (Forde & Lorenzo, 2001 ; Forde, 2002a, 2002b). L'ammonium entraîne également une réduction de la formation des nodules. Ainsi, chez le trèfle blanc, l'apport régulier de nitrate ou d'ammonium réduit fortement le nombre et la biomasse des nodules formés (Figures 21 et 22) (Svenning *et al.*, 1996 ; Abberton *et al.*, 1998). La sensibilité de la nodulation à l'N minéral apparaît fortement dépendante de l'espèce et même de la variété, chez les espèces cultivées (Walsh *et al.* 1995 ; Svenning *et al.*, 1996). L'étude de Heidstra *et al.* (1997) concernant la fève, montrent que l'alimentation en NH_4^+ et NO_3^- réduit la nodulation en modifiant les premières étapes de l'infection racinaire. Le nitrate inhibe la nodulation par un effet localisé et un effet systémique sur l'ensemble des racines (Forde & Lorenzo, 2001 ; Forde, 2002a, 2002b). Cet effet systémique implique un signal foliaire qui est transporté par le phloème et qui pourrait être le saccharose ou des acides aminés (Purcell & Sinclair, 1994).

III.2. Effet sur le fonctionnement du nodule

De nombreux travaux ont établi que l'activité nitrogénase peut également être réduite en présence de NH_4^+ ou d' NO_3^- (Faurie & Soussana, 1993 ; Svenning *et al.*, 1996). Le nitrate réduit plus fortement que l'ammonium, à long terme, l'activité spécifique de la nitrogénase du trèfle (Svenning *et al.*, 1996). Toutefois, il a été montré que ces deux ions peuvent stimuler à court terme (entre 1 et 7 jours) cette activité lorsqu'ils sont apportés en faible dose (Svenning *et al.*, 1996). L'azote combiné apporté sous forme d'urée ou d'asparagine réduit également l'activité nitrogénase (Vadez *et al.*, 2000).

Un certain nombre de mécanismes ont été proposés pour expliquer cette réduction de l'activité nitrogénase par l'N minéral. Chez la bactérie libre fixatrice *Rhodobacter capsulatus* une modification à très court terme par l'ammonium (< 10 minutes) de la conformation de la

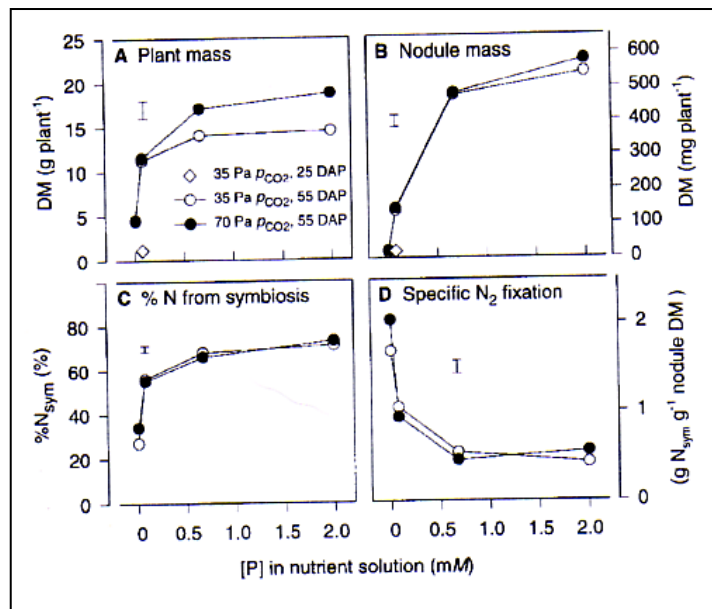


Figure 23. Masse sèche totale (A), Masse de nodule par plante (B), Pourcentage d’N issu de la symbiose fixatrice du N₂ (C), et Taux spécifique de fixation du N₂ (D) chez le trèfle blanc cultivée pendant 30 jours sur quatre solutions nutritives de concentration en phosphate (PO₄²⁻) différentes (0.0027, 0.0075, 0.67 et 2 mM) et à deux pCO₂ atmosphériques 35 Pa (cercle blanc) et 70 Pa (cercle noir). Moyennes et erreurs standards (n=4). (Almeida *et al.*, 2000).

dinitrogénase réductase a été mise en évidence (Yakumin & Hallenbeck, 1998). Dans les symbioses fixatrices, de nombreux résultats expérimentaux montrent que la réduction pourrait être due à une augmentation de la résistance à l'O₂ au niveau de la barrière corticale de diffusion de l'O₂. Plusieurs types de mécanismes ont été proposés pour expliquer cette augmentation de la résistance. Ainsi, le nitrate pourrait, en s'accumulant, provoquer une sortie d'eau des cellules corticales vers les espaces intercellulaires et diminuer ainsi la diffusion de l'O₂ dans les espaces intercellulaires. D'autres études ont montré que la réduction de la diffusion d'O₂ dans les nodules des plantes fortement alimentées en nitrate est liée à une réduction de l'approvisionnement des nodules en sève élaborée (Faurie & Soussana, 1993). Enfin, l'augmentation en acides aminés dans le phloème (particulièrement asparagine et glutamine) permettrait un rétrocontrôle phloémique induisant un déclin de l'activité de la nitrogénase en augmentant la résistance à la diffusion en O₂ du nodule (Hartwig *et al.*, 1994 ; Neo & Layzell, 1997 ; Vadez *et al.*, 2000). Ceci permettrait une régulation du métabolisme du nodule et de l'activité nitrogénase des cellules infectées par les bactéries (Parsons *et al.*, 1993).

IV. Effet de l'alimentation en phosphore, potassium sur la fixation de l'azote

IV.1. Effet de l'alimentation en phosphate (PO₄²⁻) sur la fixation de l'azote

IV.1.1. Effet sur la nodulation

La fixation de l'N₂ atmosphérique est fortement consommatrice en énergie, fournie essentiellement sous forme d'ATP. Il n'est donc pas surprenant que le phosphate stimule fortement cette fonction. Israel (1987) et Olivera *et al.* (2004) ont ainsi montré que la fixation de l'N atmosphérique est optimale pour une teneur plus forte en P que pour d'autres fonctions affectant la croissance. La déficience en phosphate (PO₄²⁻) réduit la croissance de l'ensemble des organes des Fabacées, mais c'est le développement des nodules qui semble le plus affecté (Figure 23) (Israel, 1987 ; Almeida *et al.*, 2000 ; Schultze & Drevon, 2005). La stimulation spécifique de la nodulation par le PO₄²⁻ a été démontrée chez le soja (Israel, 1987), le haricot (Oliveira *et al.*, 2004), la luzerne (Schulze & Drevon, 2005), le lupin (Le Roux *et al.*, 2008), le trèfle des prés (Hellsten & Huss-Danell, 2000 ; Høgh-Jensen *et al.*, 2003) et chez le trèfle blanc (Høgh-Jensen & Schjoerring, 2000). Les plants de soja (Israel, 1987) et de luzerne

(Schulze & Drevon, 2005), forment moins de nodules et des nodules plus petits lorsque PO_4^{2-} est fourni en concentration insuffisante, alors que le trèfle blanc cultivé en hydroponie en absence de PO_4^{2-} ne forme pas du tout de nodules (Figure 23) (Almeida *et al.*, 2000).

La réduction de la croissance du trèfle blanc sous-alimenté ou privé de PO_4^{2-} ne résulte pas d'une réduction de la fixation et pourrait constituer une réponse adaptative liée à l'ajustement des besoins en N chez les plantes déficientes en PO_4^{2-} (Almeida *et al.*, 2000 ; Høgh-Jensen *et al.*, 2002). La plasticité phénotypique permet au trèfle de s'adapter à la déficience en PO_4^{2-} du milieu en allouant plus de biomasse aux racines pour aller prélever le PO_4^{2-} et moins aux nodules spécialisés dans l'acquisition de l'N.

IV.1.2. Effet sur le fonctionnement du nodule

La déficience en PO_4^{2-} entraîne dans certains cas, en plus d'une réduction de la nodulation, une réduction de l'activité de la nitrogénase, mais cette réponse dépend des espèces. Ainsi, chez la luzerne déficiente en PO_4^{2-} , Schultze et Drevon (2005) ont observé une réduction de l'activité de fixation par gramme de nodule. A l'inverse, l'activité spécifique de la nitrogénase est maintenue ou même stimulée chez le trèfle blanc alimenté très faiblement ou privé totalement en PO_4^{2-} . Almeida *et al.*, (2000) et Høgh-Jensen *et al.*, (2002) ont observé une augmentation de l'activité spécifique des nodules formés chez les trèfles déficients en phosphate (Figure 23). Cependant, une privation prolongée peut, chez cette espèce, provoquer l'accumulation d'acides aminés tels que l'asparagine qui peuvent inhiber la fixation par un processus de rétrocontrôle (Almeida *et al.*, 2000). Chez le lupin déficient en PO_4^{2-} , Le Roux *et al.* (2008) n'ont pas observé d'accumulation d'aides aminés mais ont observé une forte accumulation d'acides organiques qui peut inhiber la fixation.

IV.2. Effet de l'alimentation en potassium (K^+) sur la fixation de l'azote

Des travaux sur la fève, le haricot et le trèfle blanc montrent que la fixation de l'azote est également dépendante de la nutrition potassique (K^+), mais les mécanismes impliqués semblent encore une fois variables selon les espèces (Sangakkara *et al.*, 1996 ; Høgh-Jensen, 2003). Chez la fève ou le haricot, contrairement à la fixation, l'absorption de l'azote minéral semble plus affectée par la nutrition potassique. Chez ces deux espèces, l'utilisation de cultures sur sable a permis de montrer que des plantes cultivées avec une alimentation très faible en K^+ ne forment pas de nodules (Sangakara *et al.*, 1996). En revanche, lorsque

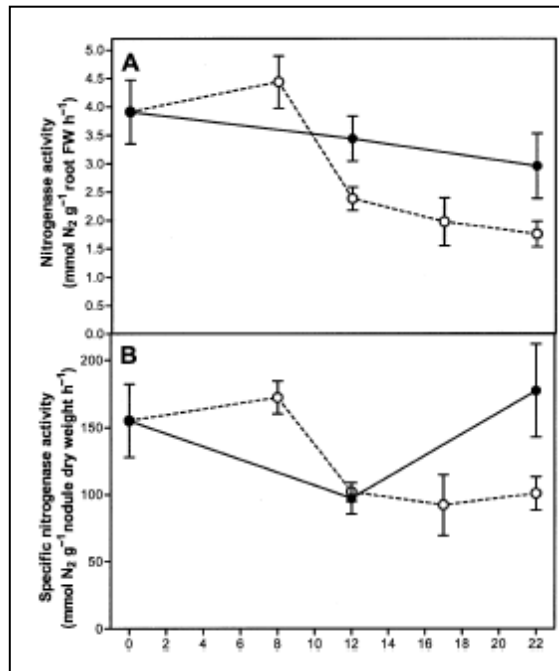


Figure 24. Activité de la Nitrogénase par unité de matière fraîche de racine (A) et par unité de matière sèche de nodule (B) chez le trèfle blanc cultivé en condition de fertilisation en potassium (cercle noir) et en déficience en potassium (cercle blanc). Moyennes et erreurs standards (n=4). (Høgh-Jensen, 2003).

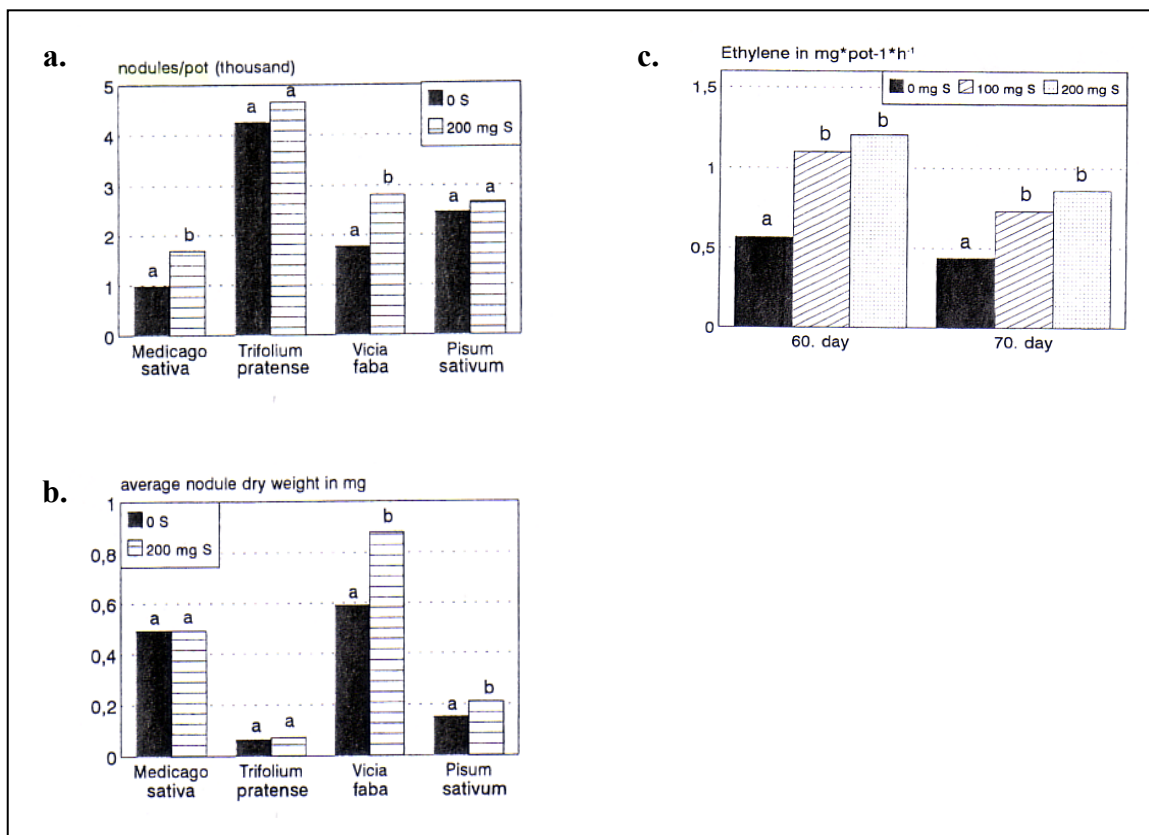


Figure 25. Influence de la fertilisation en S sur : **a.** le Nombre de nodules par pot. et **b.** sur la Masse sèche d'un nodule moyen chez *Medicago sativa* L., *Trifolium pratense* L., *Vicia faba* L. et *Pisum sativum* L.; Effet d'approvisionnement en S sur **c.** l'activité de nitrogénase de *Medicago sativa* L.. Les différentes lettres indiquent la différence significative existant entre les moyennes pour un P<0.05 suite à une ANOVA. (Scherer & Lange, 1996).

l'alimentation en K^+ est suffisante pour permettre aux plantes de former des nodules, l'activité de la nitrogénase est indépendante du K^+ . Chez le trèfle blanc, Høgh-Jensen (2003) a pu montrer que les mécanismes impliqués dans la régulation de la fixation de l'N sont différents à court et à long terme. Ainsi, la suppression brutale du K^+ dans la solution nutritive entraîne une réduction de la fixation due à une baisse de l'activité spécifique de la nitrogénase (Figure 24), alors que la masse de nodules augmente (Høgh-Jensen *et al.*, 2003). Cette réduction de la fixation ne correspond pas à un effet spécifique du K^+ sur la fixation, mais pourrait répondre à une réduction de la demande en N consécutive à la réduction de croissance provoquée par l'arrêt de l'apport en K^+ . Lorsque le K^+ est apporté en continu à différentes concentrations, Høgh-Jensen n'a pas mis non plus en évidence d'effet spécifique du K^+ sur la fixation de l'N.

V. Effet de l'alimentation en soufre sur la fixation de l'azote

V.1. Effet de l'alimentation en S sur la croissance et la nodulation des Fabacées

Ce sont d'abord les études montrant que la croissance des Fabacées fixatrices est particulièrement dépendante du soufre qui ont suggéré que le S stimule la fixation de l'N atmosphérique (Anderson & Spencer, 1950 ; Aulakh & Arora, 1976). Cette stimulation de croissance par le S a été observée en particulier chez la fève, le pois, la luzerne, le trèfle semeur et le trèfle des prés (Scherer & Lange, 1996 ; Zhao *et al.*, 1999). Les cultures plurispécifiques en mésocosmes ont également montré que le trèfle blanc est plus sensible à la teneur en S du sol que certaines Poacées prairiales (Tallec *et al.*, 2008).

La déficience en S entraîne une réduction des teneurs en N des parties aériennes due à une baisse de la fixation (Anderson & Spencer, 1950 ; Walker & Adams, 1958 ; Scherer & Lange, 1996 ; Zhao *et al.*, 1999). Comme le P et le K, le S stimule la nodulation en accroissant la quantité de nodules et leur masse fraîche (Habtemichial *et al.*, 2007). Chez le trèfle des prés, le pois, la fève et la luzerne, cette stimulation de la nodulation s'explique par une moindre croissance des parties souterraines et résulte d'une augmentation du nombre et de la matière sèche moyenne des nodules (Figure 25a,b) (Scherer & Lange, 1996).

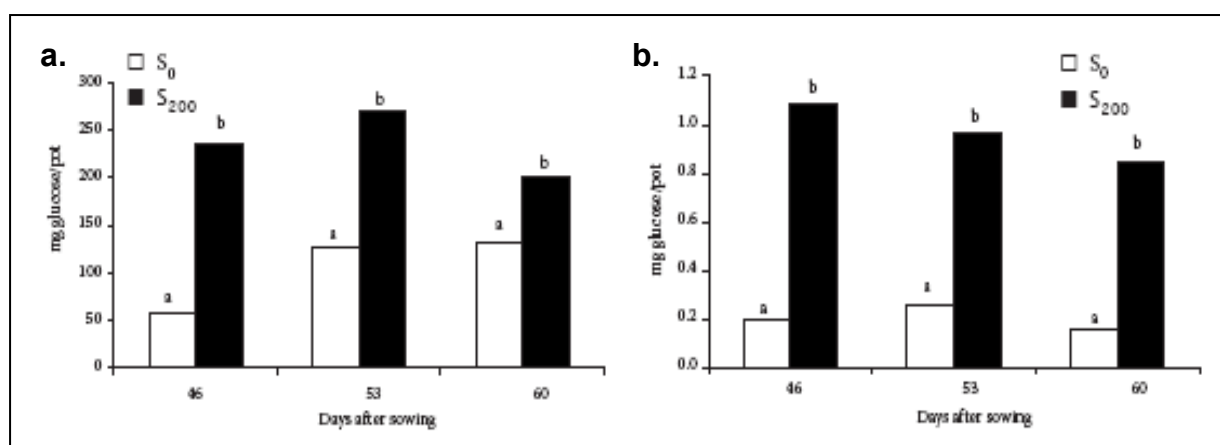


Figure 26. Quantité de glucose disponible **a.** dans les parties aériennes et **b.** dans les nodules du pois. Les différents lettres indiquent une différence significative pour un $p < 0.05$ suite à une ANOVA. (Scherer *et al.*, 2006).

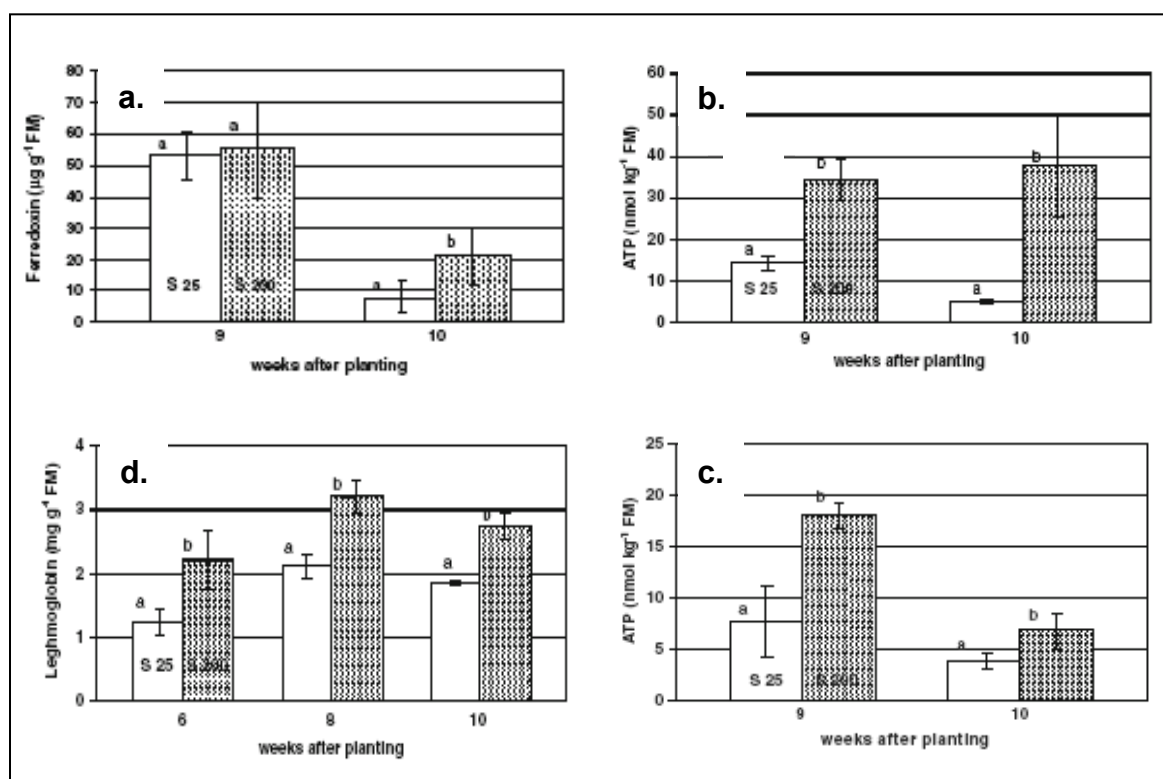


Figure 27. **a.** Teneur en ferrédoxine ($\mu\text{g g}^{-1}$ matière fraîche) des bactéroïdes nodulaires du pois. **b.** Teneur en ATP (nmol kg^{-1} matière fraîche) des bactéroïdes nodulaires du pois. **c.** Teneur en ATP (nmol kg^{-1} matière fraîche) des mitochondries des nodules du pois. **d.** Teneur en Légghémoglobine (mg g^{-1} matière fraîche) des nodules du pois. Les différentes lettres indiquent la différence significative pour un $P < 0.05$ via une ANOVA ; Les barres d'erreurs représentent les écarts types. (Scherer *et al.*, 2008).

V.2. Effet sur le fonctionnement du nodule

Les bactéroïdes nodulaires ont un très fort besoin en S (Gordon *et al.*, 1990 ; Moran *et al.*, 2000 ; Krusell *et al.*, 2005). La réduction de l'alimentation en S entraîne une diminution de l'activité de la nitrogénase (Figure 25c) (Lange, 1998 ; Scherer *et al.*, 2008). Un certain nombre d'auteurs a proposé que cette réduction de l'activité nitrogénase est principalement due à une réduction de l'approvisionnement énergétique du nodule (Deboer & Duke, 1982 ; Scherer *et al.*, 2006). Ainsi Pacyna *et al.* (2006) ont observé que la réduction de l'alimentation en S entraînait une réduction des teneurs en ATP et en glucose des nodules. La réduction de la photosynthèse chez les plantes déficientes en S peut expliquer cette baisse de l'approvisionnement énergétique des nodules (Figure 26) (Deboer & Duke, 1982 ; Scherer *et al.*, 2006). Elle pourrait résulter d'une forte réduction de la concentration en chlorophylle (Friedrich & Shrader, 1978 ; Deboer & Duke, 1982), ou des teneurs en protéines foliaires (Deboer & Duke, 1982). La réduction de l'approvisionnement en pouvoir réducteur des nodules chez les Fabacées insuffisamment alimentées en S peut également se traduire par une baisse des teneurs en Ferrédoxine, qui est la protéine donneuse d'électrons à la nitrogénase ou une baisse de la teneur en légghémoglobine (Figure 27) (Scherer *et al.*, 2008). Malgré l'importance des acides aminés S dans la structure et le fonctionnement des nodules, très peu d'études se sont penchées sur l'effet de la disponibilité en S sur la synthèse des protéines du nodule, la nitrogénase en particulier.

Chapitre :

3

Acquisition et métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs

Acquisition et métabolisme du soufre chez les végétaux supérieurs

I. Les rôles du S dans le métabolisme des plantes

Le soufre fait partie des 6 macroéléments (C, H, O, N, P, S) indispensables aux végétaux. Bien que présent en faible concentration dans la plante, il ne constitue que 3 à 6% de la matière sèche. Son rôle est vaste et prépondérant dans le végétal. Les deux acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine, ayant un groupement thiol (-SH), sont indispensables pour l'arrangement tridimensionnel de nombreuses protéines par la formation de ponts disulfures, et par conséquent pour la fonction de ces protéines. Ils entrent souvent dans la composition du centre catalytique des enzymes. Par l'intermédiaire de la cystéine, le soufre intervient dans la défense antioxydante via le glutathion réduit (γ -glutamyl-cystéine-glycine), la thiorédoxine, la peroxyrédoxine. Ces molécules permettent à la plante de lutter contre les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent endommager les membranes et les protéines. Elles préservent l'intégrité cellulaire et le statut redox de la cellule. Le glutathion sert également à détoxifier les xénobiotiques (composés polluants) et les métaux lourds. Les Fabacées contiennent, un tripeptide thiol particulier, l'homoglutathion, qui remplace en partie ou en totalité le glutathion, en particulier dans les nodules (Moran *et al.*, 2000). Le soufre entre également dans la composition de produits secondaires (comme les glucosinolates et les sulfolipides), de vitamines et de co-facteurs (biotine, thiamine, Coenzyme A, etc.) (Saito, 2004 ; Rausch & Wachter, 2005).

II. Acquisition et transport du soufre

II.1. *Absorption du soufre par voie racinaire*

II.1.1. Le soufre dans le sol

Au sein des écosystèmes terrestres, la teneur moyenne en S total du sol se situe entre 0.02 et 0.2% en grande majorité sous forme organique (Friend, 1973).

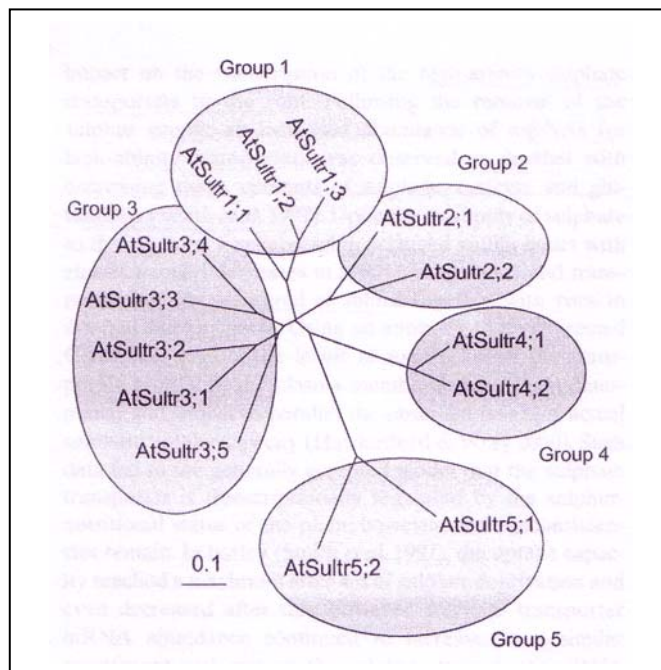


Figure 28. Arbre phylogénétique représentant les cinq familles de gènes de transporteurs du sulfate chez *Arabidopsis thaliana* L.. (Hawkesford & De Kok, 2006).

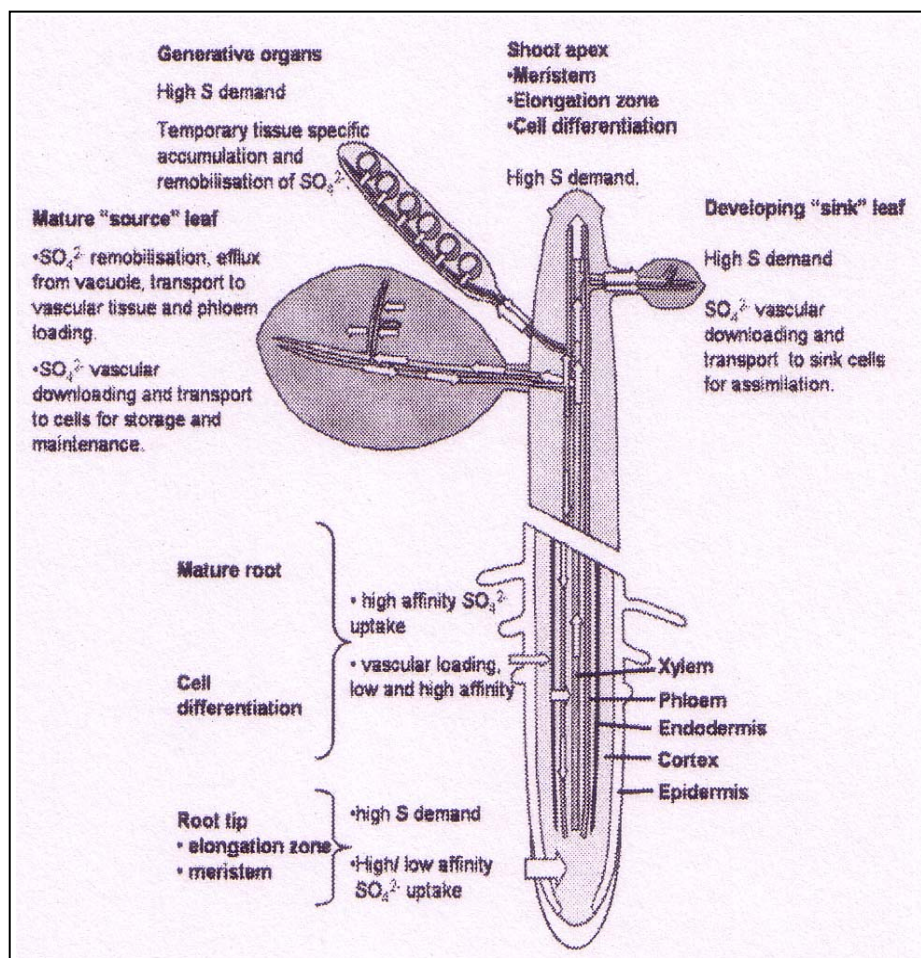


Figure 29. Modèle d'absorption et des mouvements de sulfate au niveau de la plante entière. Illustration de l'absorption, de la distribution, de l'importation, de la remobilisation, et de l'exportation du sulfate qui est proposée en fonction du type de tissu et de la demande spécifique en soufre au cours du développement de la plante. Les flèches présentent l'absorption et les mouvements xylémique et phloémique potentiels du sulfate dans le végétal. (Buchner *et al.*, 2004).

Les formes organiques du soufre représentent plus de 95% du soufre total du sol (Scherer, 2001) et sont généralement subdivisées en 3 groupes : Le S « HI-réductible » (principalement des esters sulfates), les acides aminés soufrés et le S résiduel lié au C (principalement des sulfonates et du S hétérocyclique) (Kertesz & Mirleau, 2004). Ce S organique n'est disponible pour les racines des plantes que par l'intermédiaire d'enzymes hydrolytiques : les sulfatases (Scherer, 2001). Ces sulfatases sont principalement microbiennes et la mieux caractérisée est l'aryl-sulfatase qui hydrolyse les esters-S en sulfate (Vong *et al.*, 2007). Les composés exsudés par certaines plantes dont le colza stimulent l'activité aryl-sulfatase microbienne (Dedourge *et al.*, 2004).

D'après Bohn *et al.* (1986), dans la plupart des terres agricoles, le soufre minéral représente une part inférieure à 5 % du S présent dans le sol. Le soufre minéral est présent essentiellement sous trois formes dans ce compartiment : le sulfate (SO_4^{2-}) de la solution du sol, le sulfate adsorbé sur le complexe argilo-humique du sol et le soufre solide. Sous sa forme solide, c'est-à-dire sous forme de sulfate de calcium (CaSO_4) essentiellement dans les roches sédimentaires, il est très peu accessible pour la croissance des organismes. Le sulfate présent dans la solution du sol est en équilibre avec les formes adsorbées ; une augmentation de la teneur en sulfate de la solution du sol engendre une augmentation de sulfate adsorbé (Scherer, 2001). Le sulfate adsorbé est très peu disponible pour la plante car il est retenu par des minéraux insolubles à forte charge positive, notamment des hydroxydes d'aluminium et de fer, mais peut être désorbé en présence de phosphate (Scherer, 2001). Cette adsorption est également fortement dépendante du pH. Elle est forte à pH acide et devient négligeable pour un pH supérieur à 6.5 (Curtin & Syers, 1990 ; Hu *et al.*, 2005). Le S peut être accumulé sous forme de métaux soufrés tel que la pyrite ou sous forme précipitée avec le CaSO_4 dans les sols calcaires.

II.1.2. Absorption racinaire du sulfate

L'absorption du sulfate correspond à un flux net, bilan de deux flux unidirectionnels opposés à travers la membrane plasmique des cellules racinaires : l'influx et l'efflux (Cram, 1983 ; Bell *et al.*, 1995). L'influx se fait contre un gradient électrochimique grâce à un symport $1\text{SO}_4^{2-} / 3\text{H}^+$ et nécessite un gradient de protons maintenus par une pompe H^+/ATP asique. (Clarkson *et al.*, 1989 ; Leustek & Saito, 1999). Un certain nombre de transporteurs à forte affinité ou à faible affinité a été mis en évidence chez les plantes supérieures (Leustek & Saito, 1999). Les transporteurs de sulfate possèdent 12 domaines transmembranaires et sont codés par une même famille de gènes (Smith *et al.*, 1997 ;

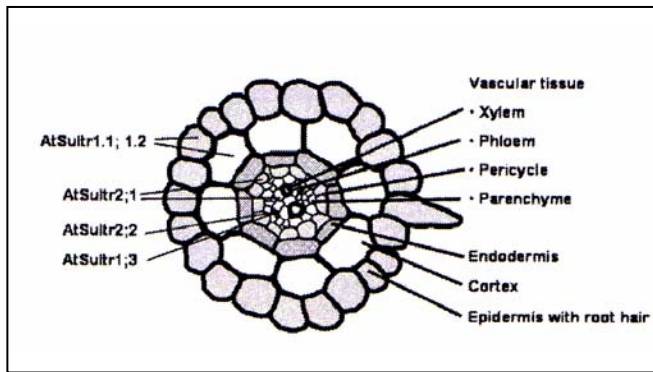


Figure 30. Section transversale simplifiée de racine d'*Arabidopsis thaliana* présentant la spécificité cellulaire des transporteurs de sulfate. (Buchner *et al.*, 2004).

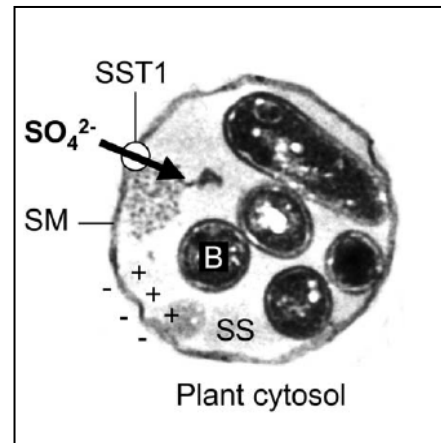


Figure 31. Rôle proposé de SST1 dans le transport du sulfate chez le bactéroïde (B) du nodule de soja. SST1 est un transporteur du sulfate présent dans la membrane pér bactéroïdienne permettant le transport du sulfate du cytoplasme de la cellule hôte vers le symbiosome (SS), où la disponibilité en soufre permet la fixation de l'azote (B). Le transport est favorisé par la charge nette positive de la surface intérieure de la membrane pér bactéroïdienne (SM), qui est produit par une H^+ -ATPase. (Krusell *et al.*, 2005).

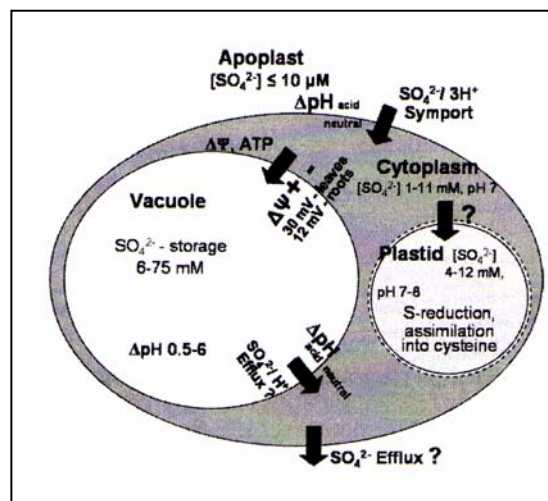


Figure 32. Présentation des mouvements transmembranaires du sulfate, des forces d'entraînement, des mécanismes adaptés : au cytoplasme, à la vacuole et au plaste (concentrations en sulfate dans le plaste, pH, et forces d'entraînement tonoplastique et mécanisme d'absorption membranaire plasmique). Les flèches indiquent des flux transmembranaires en sulfate. (Buchner *et al.*, 2004).

Hawkesford, 2003). Les relations phylogéniques (Figure 28) entre la séquence protéique de ces systèmes de transport, leur fonction et distribution (Figure 29), ont permis de les classer en cinq groupes (Buchner *et al.*, 2004 ; Hawkesford & De Kok, 2006). Des représentants de chacun de ces groupes ont été caractérisés dans les plantes supérieures et en particulier *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.*, 2004) et *Stylosanthes hamata* (Smith *et al.*, 1997). Les transporteurs des groupes 1, 2 et 3 sont localisés dans la membrane plasmique, tandis que les transporteurs des groupes 4 et 5 sont localisés dans la membrane tonoplastique. Les transporteurs du groupe 1 sont impliqués dans le prélèvement du sulfate de la solution du sol. Ils ont une forte affinité pour le sulfate et sont principalement exprimés dans les racines (Figure 30) (Leustek & Saito, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2000 ; Buchner *et al.*, 2004). Lorsque que le milieu s'appauvrit en sulfate, la synthèse de ces transporteurs est fortement stimulée (Hawkesford *et al.*, 1993).

Le premier transporteur de sulfate dans le nodule qui a été identifié chez Lotier du Japon appartient au groupe 3 (Krusell *et al.*, 2005). Ce transporteur, SST1, localisé dans la membrane pér bactéroïdienne, est responsable du transport du sulfate du cytoplasme de la cellule hôte vers le bactéroïde (Figure 31) (Krusell *et al.*, 2005). SST1 présente la particularité de ne pas posséder de mécanisme de cotransport H^+/SO_4^{2-} . En effet, l'importation de sulfate serait favorisée d'une part par la différence de potentiel positive à l'intérieur de la membrane pér bactéroïdienne et, d'autre part, par la forte absorption active par les bactéroïdes qui représentent un fort puits métabolique pour le sulfate (Krusell *et al.*, 2005).

II.1.3. Flux de transport et de stockage du sulfate

Une faible proportion du sulfate est assimilée dans les racines (Saito, 2004). Le sulfate peut être stocké dans les vacuoles au niveau des racines ou transporté principalement sous forme de sulfate *via* le xylème vers les parties aériennes où il est assimilé en S organique ou bien également stocké dans les vacuoles (Figure 32) (Buchner *et al.*, 2004). Ce transfert du sulfate des racines vers les parties aériennes, où il est réduit et assimilé, implique le passage de multiples membranes et un transport à longue distance dans le xylème (Clarkson *et al.*, 1989). Le flux transpiratoire est la force motrice de transport du SO_4^{2-} vers les feuilles (Rennenberg *et al.*, 1979 ; Rennenberg & Polle, 1994), lieu où le sulfate est déchargé dans les cellules du mésophylle (Figure 29 et 33) (Rennenberg & Polle, 1994 ; Buchner *et al.*, 2004). Une partie du sulfate absorbé par les racines est également exporté sous forme de cystéine vers les parties aériennes (Zhao *et al.*, 1999).

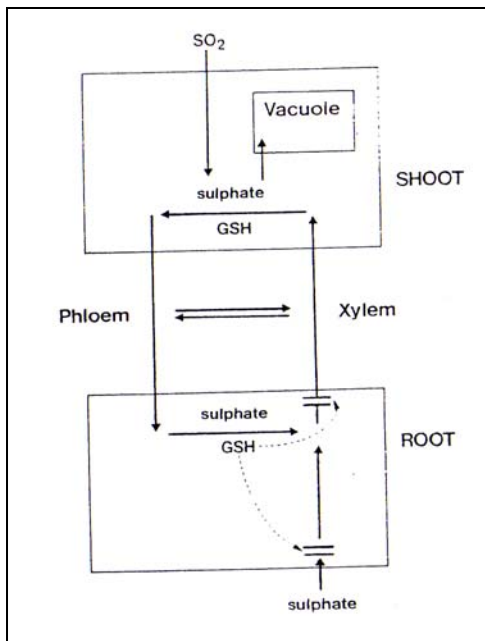


Figure 33. Régulation inter-organes des mouvements du soufre en présence du SO_2 atmosphérique. Les flèches en pointillés présentent l'action du glutathion (GSH) sur des points de régulation des mouvements du sulfate. (Rennenberg & Polle, 1994).

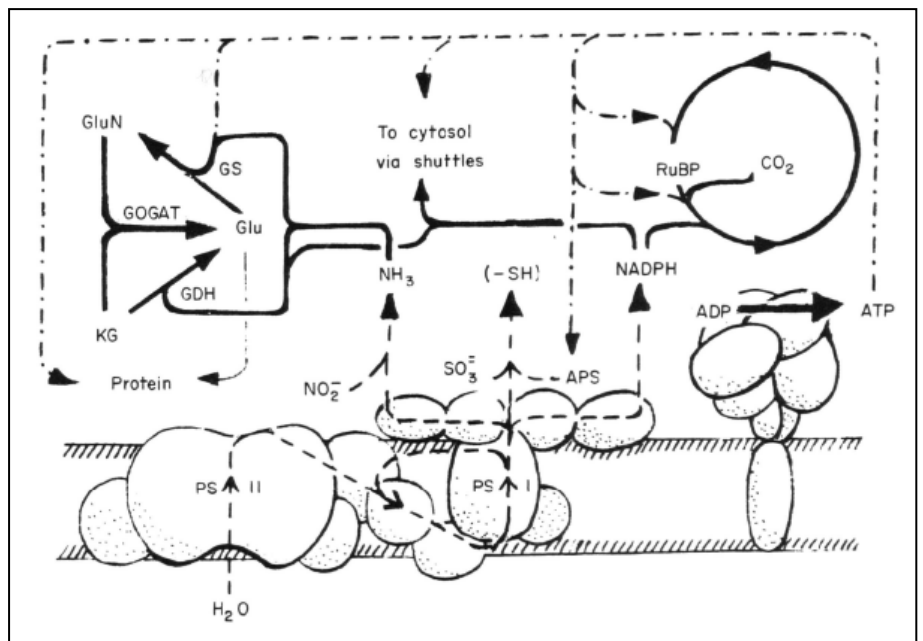


Figure 34. Schéma illustrant: i) les diverses destinations pour les électrons de la membrane photosynthétique ($\rightarrow$), ii) certaines utilisations des produits réduits et la participation de l'ATP dans divers processus dépendant de la photosynthèse ($\rightarrow$). Les gaz polluants peuvent exercer leurs effets simultanément sur plusieurs parties des processus photosynthétiques. (Wellburn *et al.*, 1981).

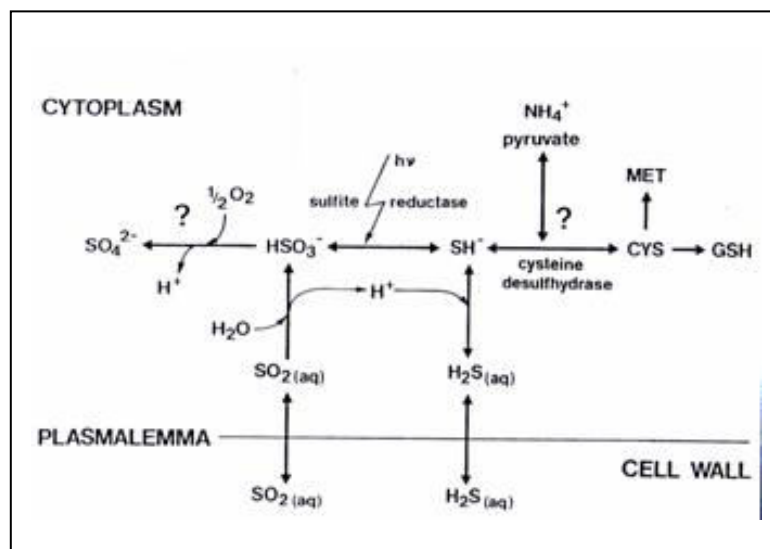


Figure 35. Conversion métabolique du SO_2 dans le cytoplasme des cellules foliaires. (Rennenberg & Polle, 1994).

II.2. Dépôt foliaire de soufre

Le soufre atmosphérique, phytotoxique à forte concentration (Welburn *et al.*, 1981 ; Van Der Kooij *et al.*, 1997 ; De Kok, 2007), constitue néanmoins la première source de soufre pour la croissance des plantes, indirectement à travers les dépôts qui vont enrichir le sol en S, ou directement sur les feuilles (Buchner *et al.*, 2004 ; De Kok *et al.*, 2007).

II.2.1. La phytotoxicité du S atmosphérique

Les effets phytotoxiques du soufre atmosphérique sont essentiellement dus au dioxyde de soufre (SO₂) et peuvent être observés dans les régions industrielles. L'effet négatif de ce gaz résulte de plusieurs mécanismes. Il contribue avec l'oxyde nitrique aux pluies acides, en réagissant avec l'eau et l'oxygène pour former de l'acide sulfurique. Cette oxydation du SO₂ en acide sulfurique peut entraîner l'acidification des tissus et perturber le métabolisme. Les dommages induits par l'assimilation du SO₂ lors de la production de bisulfite (HSO₃⁻), peuvent aussi résulter de la formation de ROS et de radicaux libres dans le chloroplaste (Peiser & Yang, 1977 ; Rennenberg & Polle, 1994). Les dommages incluent l'inhibition du photosystème II lorsque le SO₂ est assimilé au niveau du photosystème I (Figure 34), la peroxydation des lipides (Wellburn, 1981 ; Peiser & Yang, 1985) et la destruction de la chlorophylle (Peiser & Yang, 1977). Au pH du stroma chloroplastique (pH 8.0; Kurkdjian & Guern, 1989) le bisulfite (pKa 7.2) sera converti en sulfite (SO₃⁻). Enfin, l'exposition au SO₂ peut inhiber la photosynthèse en provoquant la fermeture des stomates et perturber le transport des électrons dans les chloroplastes.

L'émission du sulfure d'hydrogène (H₂S) par les tissus foliaires est un des mécanismes permettant aux plantes de limiter les dommages dus au SO₂ (Figure 35) (Sekiya *et al.*, 1982a, 1982b ; Taylor & Tingey, 1983 ; Rennenberg & Polle, 1994). Il faut cependant noter que le H₂S peut également être toxique car il perturbe le métabolisme de certains composés cellulaires tels que les métallo-enzymes (De Kok *et al.*, 2007).

II.2.2. Mécanismes impliqués dans le dépôt foliaire de S

Malgré cette toxicité à forte concentration, de nombreuses études ont montré que les plantes sont capables d'utiliser le SO₂ et le H₂S comme source de S pour la croissance (Cowling *et al.*, 1973 ; De Kok *et al.*, 2007). En utilisant du sulfate enrichi en ³⁵S, Bromfield a pu montrer que la moutarde pouvait puiser 50% de son S dans l'atmosphère. Le ray-grass ou le trèfle peuvent également utiliser le S atmosphérique, comme le montre l'augmentation des

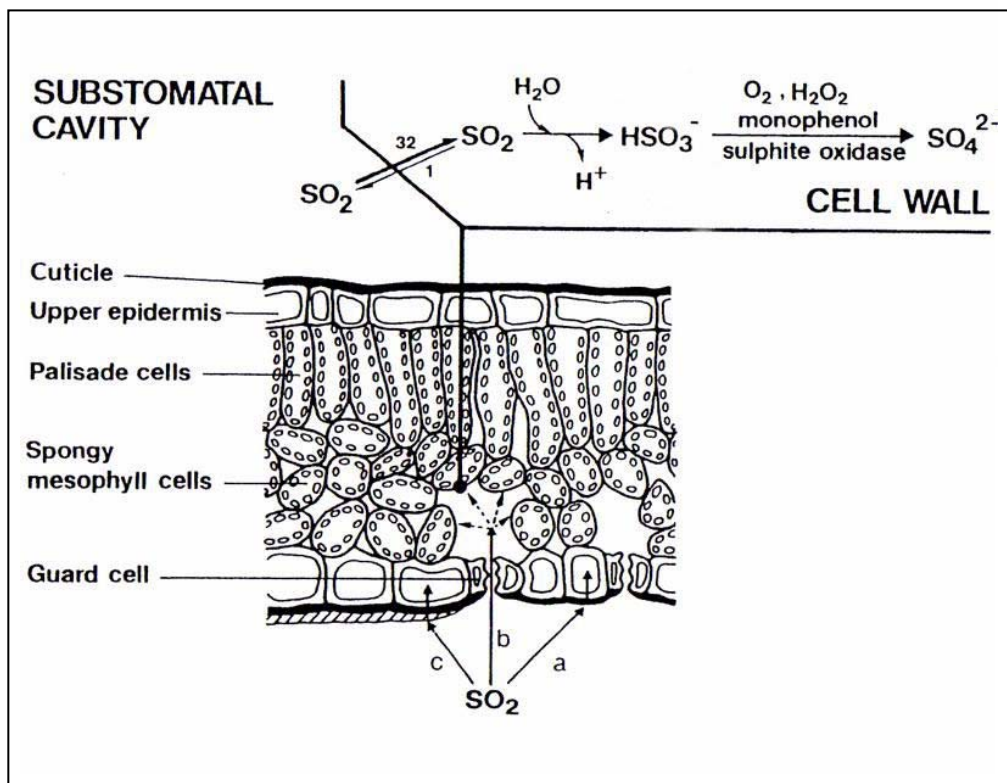


Figure 36. Flux de SO_2 dans les feuilles et conversion apoplastique du SO_2 (en haut à droite). Les lettres correspondent aux points d'entrées des différents types de dépôts foliaires de soufre. **a.** dépôt sec sur la surface des feuilles, **b.** diffusion par les stomates ; **c.** dépôt humide sur la surface des feuilles. (Rennenberg & Polle, 1994).

teneurs en S des plantes soumises à des expositions foliaires au SO₂ (Cowling *et al.*, 1973 ; Murray, 1985).

Le soufre atmosphérique peut se déposer sur la cuticule sous forme aqueuse (dépôt humide), ou pénétrer sous forme gazeuse par diffusion au niveau des stomates (dépôt sec) (Figure 36) (Rennenberg & Polle, 1994). Le dépôt sec de SO₂ qui pénètre dans la plante par les stomates représente entre 75 et 90% du S (Rennenberg & Polle, 1994).

Cette pénétration suit un rythme circadien en fonction du degré d'ouverture des stomates (Majernik & Mansfield, 1971). La force d'entraînement du flux diffusif du SO₂ de l'atmosphère dans la feuille est le gradient de concentration du SO₂ entre l'atmosphère et la cavité sous stomatique (Rennenberg & Polle, 1994 ; Van Der Kooij *et al.*, 1997). Le SO₂ et l'H₂S peuvent intégrer directement les voies d'assimilation du S pour permettre la synthèse de composés S organiques (Figure 35) (Rennenberg & Polle, 1994). L'H₂S peut ainsi être directement métabolisé en cystéine grâce à l'O-acétylserine lyase (Buchner *et al.*, 2004 ; De Kok *et al.*, 2007). Le SO₂ va quant à lui réagir avec l'eau dans l'apoplasme ou dans le cytoplasme pour donner du bisulphite HSO₃⁻ soluble (Figure 35) (Rennenberg & Polle, 1994). Une partie de ce bisulphite est oxydé en sulfate grâce à l'intervention de la sulfite oxydase, ou de façon non enzymatique, en raison de l'acidité de la paroi (Pfanzen *et al.*, 1987 ; Rennenberg & Polle, 1994). En règle générale environ 60% du SO₂ absorbé par les feuilles est oxydé en sulfate (Sekiya *et al.*, 1982 ; Filner *et al.*, 1984 ; Rennenberg & Polle, 1994). Une autre partie de ce bisulphite est converti en Hydrogènesulfure (SH⁻) puis en cystéine. Le chloroplaste est le compartiment majeur de cette réduction du SO₂ en sulfite où cette réaction est catalysée par la sulfite réductase plastidiale (Wellburn *et al.*, 1981 ; Rennenberg & Polle, 1994).

Une partie du S issue du dépôt foliaire est exportée par voie phloémique sous forme de sulfate ou de glutathion (Saito, 2004 ; De Kok, 2007).

III.Assimilation du sulfate

L'assimilation du sulfate peut se faire selon deux voies (Figure 37): la voie d'assimilation réductrice plastidiale, qui semble majoritaire, et la voie d'assimilation non réductrice cytosolique (Leusteck & Saito, 1999 ; Kopriva & Koprivova, 2004 ; Saito, 2004).

III.1. Voie réductrice plastidiale du SO₄²⁻

Cette réduction est fortement dépendante de l'intensité lumineuse et les enzymes catalysant cette réaction sont principalement localisées dans les chloroplastes. Les électrons

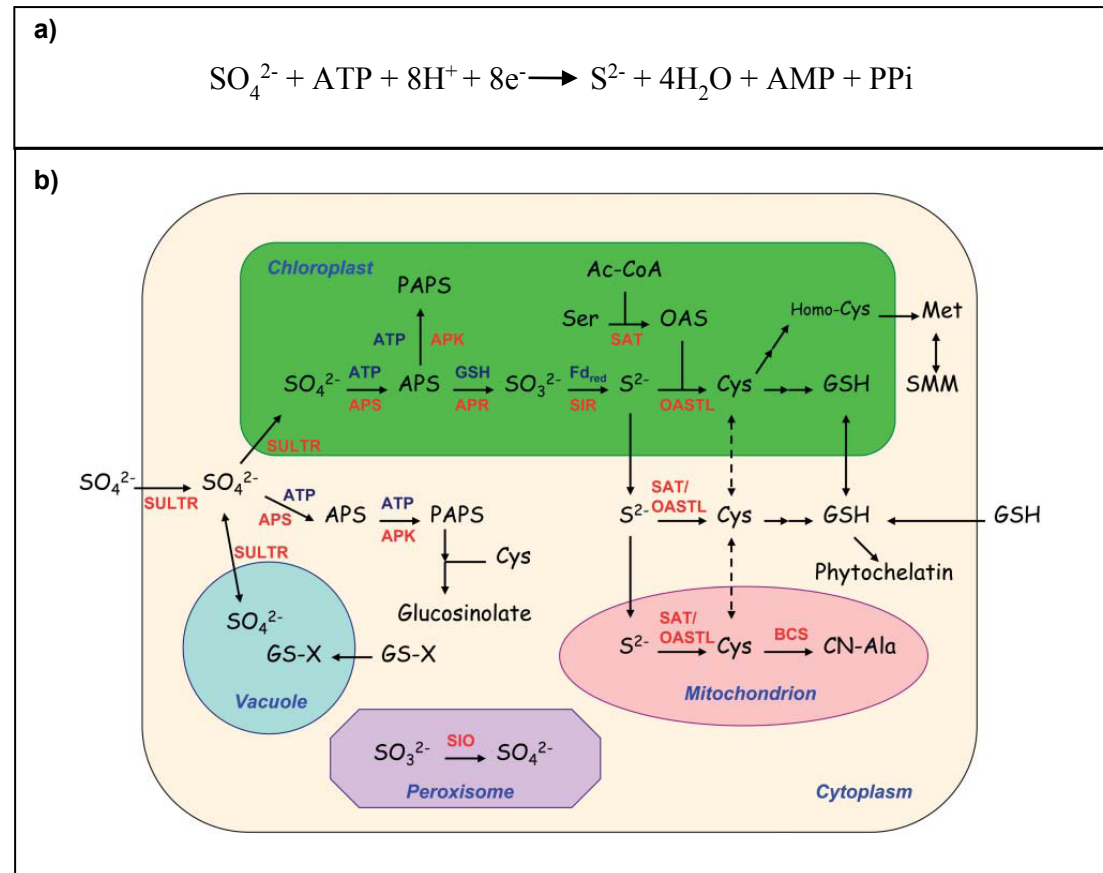


Figure 37. Métabolisme d'assimilation du soufre dans les compartiments sub-cellulaires des cellules végétales. a) réaction générale de la réduction du sulfate. b) Le noir indique le nom des métabolites : Ac-CoA, acetyl-CoA; APS, adenosine 5'-phosphosulfate; CN-Ala, b-cyano-Ala; GSH, glutathion réduit; GS-X, glutathion conjugué; OAS, O-acetyl-Ser; PAPS, 3'-phosphoadenosine-5' phosphosulfate (3'-phosphoadenylylsulfate); SMM, S-méthyl-Met. Le bleu indique des noms des cofacteurs : GSH, glutathion réduit ; Fd_{red}, ferrédoxine réduite. Le rouge indique le nom des enzymes : APK, APS kinase; APR, adenosine 5'-phosphosulfate reductase; APS, ATP sulfurylase; BCS, b-cyano-Ala synthase; OASTL, OAS(thiol)-lyase; SAT, Ser acetyltransferase; SIO, sulfite oxidase; SIR, sulfite reductase; SULTR, transporteur de sulfate. (Saito, 2004).

sont fournis par la ferrédoxine réduite. Contrairement au nitrate, le sulfate est un composé inerte qui doit être activé avant d'être réduit et métabolisé (Figure 37) (Saito, 2004). Cette réduction est catalysée par une ATP sulfurylase (ATPS) dans les plastes ou dans le cytosol (Leustek & Saito, 1999). Elle active le sulfate en le convertissant en adenosine-5'-phosphosulfate (APS) grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en pyrophosphate, lui-même hydrolysé en Pi dont l'énergie libérée entraîne la formation d'APS (Leustek & Saito, 1999 ; Scherer, 2001). Le sulfate actif présent sur l'APS, est ensuite transféré sur le groupement thiol du glutathion (GSH) via l'APS sulfotransférase ou APS réductase. Puis, en présence d'un excès de glutathion, il y a libération de sulfite libre (SO_3^{2-}). Le sulfite peut être directement utilisé comme source de S pour l'UDP-sulfoquinovose qui est le précurseur des sulfolipides (Rausch & Wachter, 2005). La réduction du SO_3^{2-} en ion sulfure (S^{2-}) est catalysée par la sulfite réductase en présence de 6 ferrédoxines. Cette voie est essentiellement chloroplastique. L'existence d'une deuxième voie de réduction appelée « carrier bound pathway » dans laquelle le sulfite n'est pas libre mais lié au groupement thiol d'un transporteur est toujours discutée (Leustek & Saito, 1999). Le sulfite est alors réduit en S lié par la thiosulfate réductase en présence de 6 ferrédoxines.

Le premier composé organique soufré synthétisé est la cystéine. Cet acide aminé sera à l'origine de tous les composés organiques soufrés (Rausch & Wachter, 2005) et pourra être synthétisé dans les plastes, le cytoplasme ou encore les mitochondries (Figure 37) (Saito, 2004). Sa synthèse implique 2 enzymes : la serine acetyl transferase (SAT) qui forme l'O-acetyl-L-serine (OAS) à partir de la sérine et de l'acétylCoA et l'O-acetylserine(thiol)lyase (OAS-TL) qui catalyse la synthèse de la cystéine, à partir de l'OAS et de l'ion sulfure. Ces deux enzymes peuvent agir de façon isolée ou sous forme de complexe appelé cystéine synthase, localisé à la fois dans les plastes, le cytosol et les mitochondries (Leustek *et al.*, 2000 ; Saito, 2004). L'ion sulfure libre peut donc être exporté hors du chloroplaste pour servir de substrat aux enzymes du cytosol et des mitochondries. La forme cytosolique permettrait de fournir de la cystéine pour alimenter les mécanismes de détoxification (Leustek & Saito, 1999). Le deuxième acide aminé soufré, la méthionine est issu de la cystéine à travers l'homocystéine (Figure 37) (Saito, 2004). La cystéine est également le précurseur de plusieurs autres composés organiques soufrés en particulier le glutathion, tripeptide composé de glycine, glutamate et cystéine. Puis, les protéines, sulfolipides et composés soufrés secondaires, sont synthétisés par des réactions qui ne sont pas spécifiques au règne végétal (Leustek & Saito, 1999 ; Saito, 2000, 2004 ; Droux, 2004 ; Hesse *et al.*, 2004). La cystéine

constitue donc le point d'entrée du soufre réduit (-SH) dans toutes les molécules organiques, comme le glutamate l'est pour l'azote réduit.

III.2. Voie non réductrice du SO_4^{2-} par sulfatation dans le cytosol

Dans le cytosol, la fixation d'un groupement phosphate en position 3' de l'APS sous l'action de l'APS kinase permet la formation du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (De Kok *et al.* 2005 ; Rausch & Wachter, 2005). Le PAPS constitue une source de sulfate activé pour les sulfotransférases qui catalysent la sulfatation d'un certain nombre de composés à l'origine de flavonoïdes, de sulfolipides, de glucosinolates (Figure 37) (Leustek & Saito, 1999 ; Saito, 2004).

IV. Coordination et régulation des métabolismes C, N, S en condition de carence en S

IV.1. Effet du métabolisme du soufre sur la photosynthèse

La carence en soufre se manifeste par une chlorose, en engendrant une inhibition de la photosynthèse, particulièrement chez les jeunes feuilles (Anderson & Spencer, 1950 ; Stewart & Porter, 1969). Cette inhibition est principalement due à la dégradation de métabolites soufrés secondaires tels que les sulfolipides (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003) et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages oxydatifs (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003) qui conduit à la destruction du photosystème II (May *et al.*, 1998). Chez le blé et la luzerne, cette baisse de la photosynthèse s'accompagne d'une baisse de la teneur en chlorophylle (Friedrich & Shrader, 1978 ; Deboer & Duke, 1982), car la synthèse de ce pigment nécessite l'intervention du S-adenosylméthionine (SAM) et de la méthionine comme précurseur. La carence en S engendre également une baisse de la quantité (Mertz & Matsumoto, 1956 ; Deboer & Duke, 1982) et de l'activité de la Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RubisCO) (Scherer & Lange, 1996 ; Gilbert *et al.*, 1997).

IV.2. Coordination du métabolisme du soufre et de l'azote

Comme l'assimilation du C, l'assimilation de l'N est fortement régulée par la disponibilité en S du milieu. Cette régulation intervient plus particulièrement au niveau des

premières étapes, telles que l'absorption et la réduction du nitrate. Cette régulation s'explique par l'importance des acides aminés soufrés dans le fonctionnement des enzymes.

La diminution de l'absorption du nitrate a été observée chez l'épinard privé en sulfate (Prosser *et al.*, 2001). Chez cette espèce, les teneurs en glutamine, arginine, asparagine, lysine et thréonine augmentent dans les jeunes feuilles et ont tendance à diminuer dans les racines (Prosser *et al.*, 2001). Une rétroinhibition de l'absorption du nitrate par ces acides aminés permettrait ainsi de co-réguler les deux métabolismes (Prosser *et al.*, 2001). L'accumulation très rapide de glutamine et d'asparagine a également été observée dans les racines d'orge, avant la diminution de la croissance ou de la synthèse de protéines (Karmoker *et al.*, 1991a, 1991b ; Deboer & Duke, 1982). Dans les cellules de tabac privées en sulfate, l'activité de la nitrate réductase baisse fortement (Reuveny *et al.*, 1980). La transcription de la nitrate réductase est réduite dans les jeunes feuilles d'épinard lors de la privation en sulfate (Prosser *et al.*, 2001).

L'OAS est un composé azoté à l'origine d'un grand nombre de composés soufrés organiques et plusieurs études montrent que cette molécule joue un rôle clef dans la co-régulation des métabolismes N et S (Hopkins *et al.*, 2005). Ainsi, la teneur en OAS augmente en cas de privation en S dans les racines de pomme de terre (Hopkins *et al.*, 2005), dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana* (Wirtz *et al.*, 2001), et dans les racines et les parties aériennes du colza (Buchner *et al.*, 2004). De plus, une étude sur les siliques d'*A. thaliana* a montré que la teneur en OAS augmente lorsque le ratio azote/soufre dans la plante augmente (Kim *et al.*, 1999).

Une application racinaire d'OAS provoque par ailleurs l'induction de la synthèse du transporteur à forte affinité HVST1 chez l'orge (Smith *et al.*, 1997) et la stimulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation du soufre chez *A. thaliana*. Le rôle de l'OAS en tant que régulateur de l'assimilation du soufre en relation avec le métabolisme azoté n'a cependant pas été confirmé chez la pomme de terre. Hopkins *et al.* (2005) ont montré, chez cette plante, que les variations de la concentration interne en OAS sont trop faibles pour induire la synthèse des transporteurs du sulfate. Saito (2004) suggère que la transcription des transporteurs et de l'APS réductase est régulée par le S via les pools en cystéine, glutathion et OAS (Figure 38).

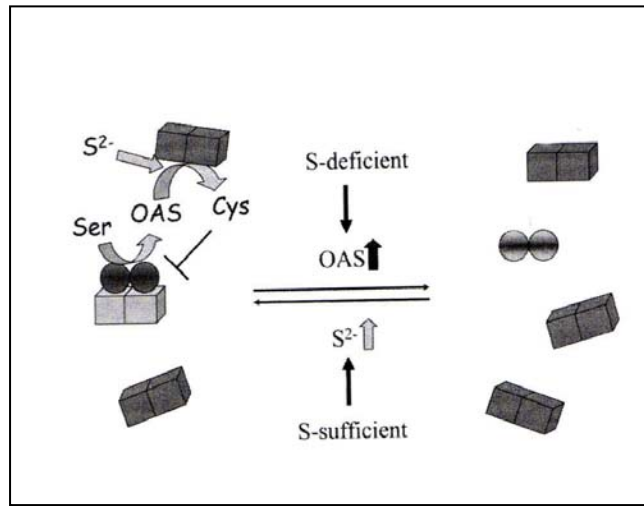


Figure 38. Circuit de régulation impliquant le complexe protéique de la Sérine acétyltransférase (sphères) et OAS(thiol)-lyase (carrés). Les concentrations en OAS(thiol)-lyase sont supérieures à celles de la Sérine acétyltransférase. Les OAS(thiol)-lyases liées sont positivement modulées par l'activité de la Sérine acétyltransférase présente dans le complexe protéique. La forme libre de l'OAS(thiol)-lyase catalyse la formation de la cysteine (Cys) par une répression de l'activité de la Sérine acétyltransférase. La déficience en soufre induit une augmentation d'OAS ayant pour conséquence la dissociation du complexe protéique. La forme libre de la sérine acétyltransférase a une activité limitée. Par ailleurs, l'offre importante du soufre accumulé sous forme de sulfure favorise la formation du complexe enzymatique. (Saito, 2004).

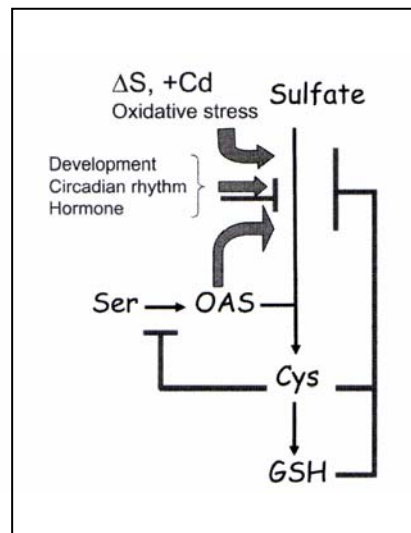


Figure 39. Schéma présentant la régulation positive et négative lors de l'assimilation du soufre. L'OAS agit en tant que facteur d'induction à effet positif. Le développement des plantes, les rythmes circadiens, et les hormones influencent le métabolisme du soufre de manière positive ou négative. La Cys et le GSH sont des régulateurs négatifs spécifiques de certaines étapes du métabolisme soufré. Les flèches indiquent un effet positif, et les barres indiquent un effet négatif. (Saito, 2004).

IV.3. Régulation de la nutrition soufrée

Les plantes limitent les effets négatifs d'une sous alimentation en S en stimulant les systèmes d'absorption ou en contrôlant l'assimilation réductrice du S (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003 ; Hawkesford, 2003 ; Hopkins *et al.*, 2005).

IV.3.1. Régulation de l'absorption du sulfate

Le transport actif du sulfate est sensible aux facteurs de l'environnement. En réponse à la privation en SO_4^{2-} , la plante augmente les capacités d'absorption en SO_4^{2-} et la synthèse des enzymes de la voie d'assimilation du soufre. Prosser *et al.* (2001) ont montré que chez l'épinard, l'absorption du sulfate marqué au ^{35}S est multipliée par 3 après 2 jours de privation. Cette stimulation est également observée chez l'orge, par augmentation de la transcription du transporteur à forte affinité HVST1 (Smith *et al.*, 1997). L'origine de cette régulation semble devoir être recherchée dans les feuilles, et non dans les racines alimentées par une solution nutritive dépourvue de sulfate. En effet, lors d'une étude en « split root » réalisée par Clarkson *et al.* (1983), la carence en soufre d'une partie du système racinaire de la Fabacée tropicale *Macroptilium atropurpureum* provoque une augmentation de l'absorption de sulfate de la partie du système racinaire normalement alimentée en S.

IV.3.2. Régulation de l'assimilation

En cas d'excès de soufre, la réduction du S en H_2S suivie de son émission dans l'atmosphère, constitue un moyen de détoxification (De Kok, 1990). L'absorption et l'assimilation du S sont régulées, à la fois dans les racines et dans les parties aériennes ; le Glutathion réduit (GSH) et l'OAS apparaissent comme les molécules clés de cette régulation (Hirai *et al.*, 2003 ; Saito, 2004) (Figures 38 et 39). Lorsque les plantes sont transférées sur un milieu dépourvu de sulfate, les concentrations en sulfate interne et en GSH diminuent tandis que la concentration en OAS augmente (Hirai *et al.*, 2003). Le GSH peut diminuer l'absorption et l'assimilation du soufre (Lappartient *et al.*, 1999). Quand la demande en S est satisfaite, l'effet inhibiteur du glutathion sur l'activité de l'ATP sulfurylase, s'accompagne d'une diminution de la quantité d'ATP sulfurylase et des quantités d'ARNm codant cette enzyme ainsi que des quantités d'ARNm codant un transporteur de sulfate racinaire (Lappartient & Touraine, 1996). L'APS sulfotransférase est inhibée par la cystéine (Brunold & Schmidt, 1978 ; Wyss & Brunold, 2006). A l'inverse, elle est régulée positivement par la carence en sulfate et par des conditions environnementales qui augmentent les besoins en soufre réduit de la plante.

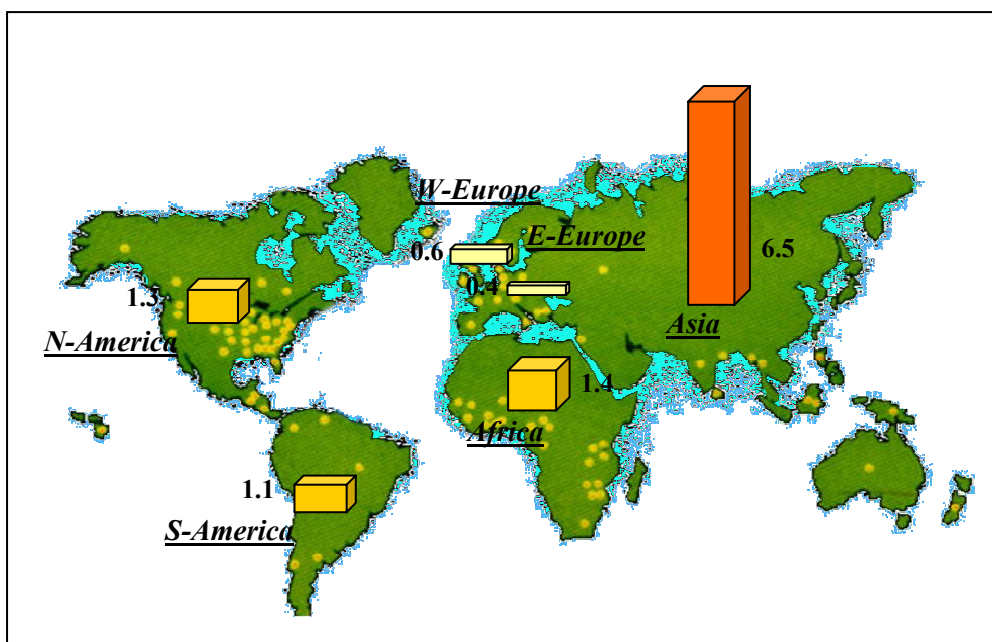


Figure 40. Prédiction des déficits en soufre pour 2010 dans le monde. ● (Zone d'apparition actuel de déficiences en soufre) ; () : Déficit < 1Mio t S/ans ; () : Déficit > 1Mio t S/ans ; () : Déficit > 5Mio t S/ans). (d'après Ceccotti, 1996 ; Ceccotti & Messick, 1997 ; Mc Neill *et al.*, 2005 ; Morris, 2007).

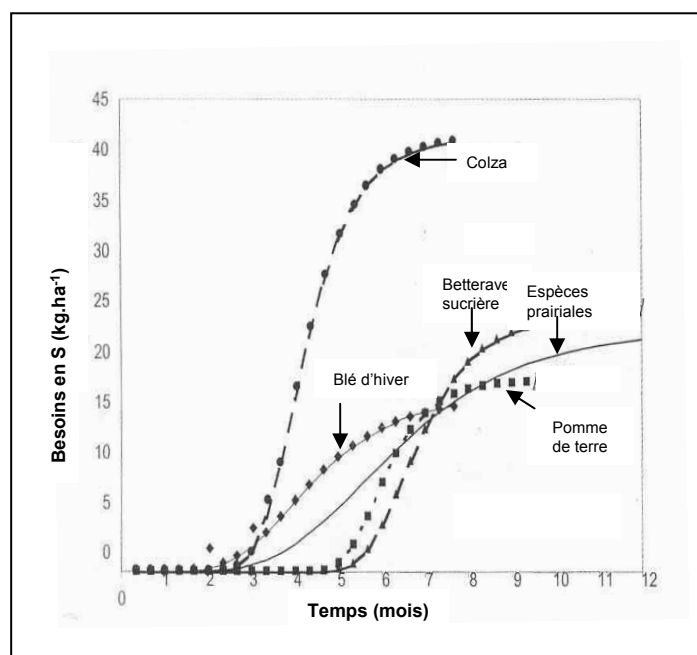


Figure 41. Cumul des besoins annuels minimums en S (en kg.ha^{-1}) chez différentes espèces végétales : le colza (rond), la betterave sucrière (triangle), la pomme de terre (carré), le blé d'hiver (losange), et les espèces prairiales (traits continus). Le colza est très exigeant en S au cours de son développement ($\sim 40 \text{ kg.ha}^{-1}$ de S) contrairement aux espèces prairiales ($\sim 20 \text{ kg.ha}^{-1}$). (Oenema & Postma, 2003 in Abrol & Ahmad, 2003).

V. Etat des lieux des carences en soufre

V.1. Origines et localisations des carences en soufre

Des déficiences en soufre ont été rapportées en Afrique, Amérique, Asie et Europe de l'Ouest au niveau d'un grand nombre d'agrosystèmes (Figure 40) (Ceccotti, 1996 ; Ceccotti & Messick, 1997 ; Mc Neill *et al.*, 2005 ; Morris, 2007). Elles sont la conséquence de l'association de quatre phénomènes : (i) la diminution des retombées atmosphériques soufrées liées au contrôle des pollutions atmosphériques, (ii) l'exportation croissante de biomasse soufrée non compensée issue de l'intensification de la production agricole, (iii) l'appauvrissement des engrais en S, (iv) la lixiviation du S des sols (Ceccotti & Messick, 1997 ; Scherer, 2001).

Dans les pays développés, l'intensification des systèmes culturels, liée à une nécessité d'augmentation des rendements, s'est faite d'une part grâce à l'utilisation de fertilisants riches en N, P, K et pauvres voire dépourvus en S (Murphy & Boggan 1988), et, d'autre part, par l'utilisation de variétés à haut rendement. Cette intensification a augmenté les exportations soufrées non compensées par l'apport d'engrais soufrés lors des récoltes (Ceccotti & Messick, 1997) et par conséquent a entraîné des prélèvements accrus du soufre des sols (Ceccotti & Messick, 1997). Par exemple, en Irlande, une prairie de Ray-Grass a un rendement annuel de 10 t.ha⁻¹ de matière sèche. Lorsqu'elle est stimulée par une fertilisation azotée, cela peut conduire à une récolte induisant une exportation de 30 kg de S.ha⁻¹ (Murphy & Boggan 1988). Entre 1985 et 2000, la consommation mondiale d'engrais azoté seul est montée de 73 à 87 millions de tonnes alors que celle du S est restée quasiment constante, aux environs de 10 millions de tonnes par an principalement réservés aux grandes cultures (Pasricha & Abrol, 2001). Ceci a progressivement conduit à partir de 1980, à une modification du rapport N/S des fertilisants en faveur de l'N.

Ces différents facteurs ont entraîné une baisse des teneurs en S des sols et ont provoqué des besoins accrus en fertilisants soufrés dans les cultures exigeantes comme celle du Colza (Fismes *et al.*, 2000) mais également dans les agroécosystèmes comme les prairies (Grünhage *et al.*, 1998 ; Oenema & Postma, 2003 in Abrol & Ahmad, 2003) (Figure 41). Or, L'intensification de la production agricole associée à une diminution des émissions de dioxyde de soufre entraîne des baisses de rendement et des diminutions de la qualité des récoltes (Ceccotti, 1996, Scherer, 2001 ; Murphy, 2002).

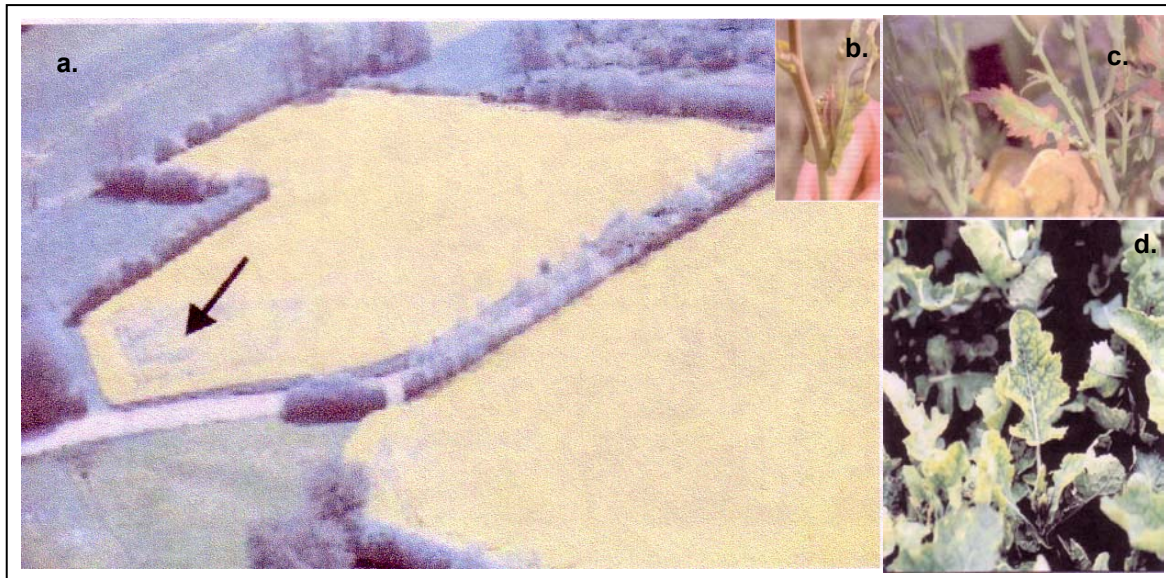


Figure 42. a. Zone de déficience en soufre sur une culture de colza aux champs (flèche) b. Effet d'une déficience en soufre sur les très jeunes feuilles de colza oléagineux, laissant des zones vertes le long des nervures et c. Enrichissement en anthocyanine des feuilles de colza suite à une déficience en soufre extrême. d. Déformations et marbrures dans des jeunes feuilles provoquées par l'insuffisance en soufre tôt dans la période de croissance du colza. (Schnug *et al.*, 2004).



Figure 43. Symptômes de la déficience en soufre chez blé sur une culture aux champs. (Zhao *et al.*, 2001).

V.2. Impacts des carences en soufre sur les grandes cultures

Une alimentation en S insuffisante chez le colza provoque une baisse du rendement en graines et de la qualité de l'huile produite (Figure 42) (Schnug *et al.*, 2004). En effet, certains acides gras indésirables comme l'acide palmitique qui est hyper cholestérolémique et l'acide érucique qui n'a aucune valeur nutritive voient leurs proportions augmentées (Ahmad & Abdin, 2000 ; Fismes *et al.*, 2000). Bien que leurs exigences en S soient moins importantes que celles des Brassicacées, les cultures céréalières comme le blé sont également touchées par les variations en soufre (Figure 43) (Zhao *et al.*, 2001). Outre la baisse du rendement, Tabe *et al.* (2002) ont montré que la qualité nutritionnelle de la farine de blé est affectée. En effet, de nombreux ponts disulfures sont impliqués dans le maintien de la structure et de la fonctionnalité de la protéine de gluten de blé. Une alimentation insuffisante en S entraîne une baisse de la synthèse protéique par manque d'acides aminés soufrés comme la cystéine et la méthionine (Mortensen & Erikson, 1994). Chez la betterave sucrière, une alimentation soufrée insuffisante peut affecter la capacité de stockage du saccharose dans les racines (Hoffmann *et al.*, 2004). Ainsi, le soufre présente un rôle essentiel du point de vue de la qualité des produits végétaux produits.

V.3. Impacts des carences en soufre sur les prairies

Contrairement à certaines grandes cultures, pour lesquelles les déficiences en S sont maintenant compensées par des engrais, les prairies sont très rarement amendées en S. Les études scientifiques concernant l'impact de la disponibilité en S sur les prairies sont peu nombreuses, néanmoins il a été montré que le S module les rendements. Walker *et al.* (1956ab) puis Morton *et al.* (1999) ont étudié le rôle du S dans les sols des prairies en Australie et Nouvelle Zélande où un sous sol pauvre en S, ou un lessivage important sont à l'origine de déficiences sévères. Ils montrent que l'application d'engrais soufrés sur une prairie permanente stimule sa production. Murphy et Boggan (1988), puis Murphy et Quirke (1997), ont également mis en évidence de meilleurs rendements induits par une fertilisation soufrée sur des sols prairiaux pauvres en soufre. Enfin, en Belgique, alors que la déficience en S n'est pour le moment pas avérée, Mathot *et al.* (2008) ont pu mettre en évidence un rendement accru de prairies dans certaines conditions environnementales, notamment sur un sol léger et lors d'un hiver humide.

La disponibilité en soufre peut également modifier la composition floristique des prairies. Ces agro-écosystèmes sont plus complexes que les cultures puisqu'ils sont

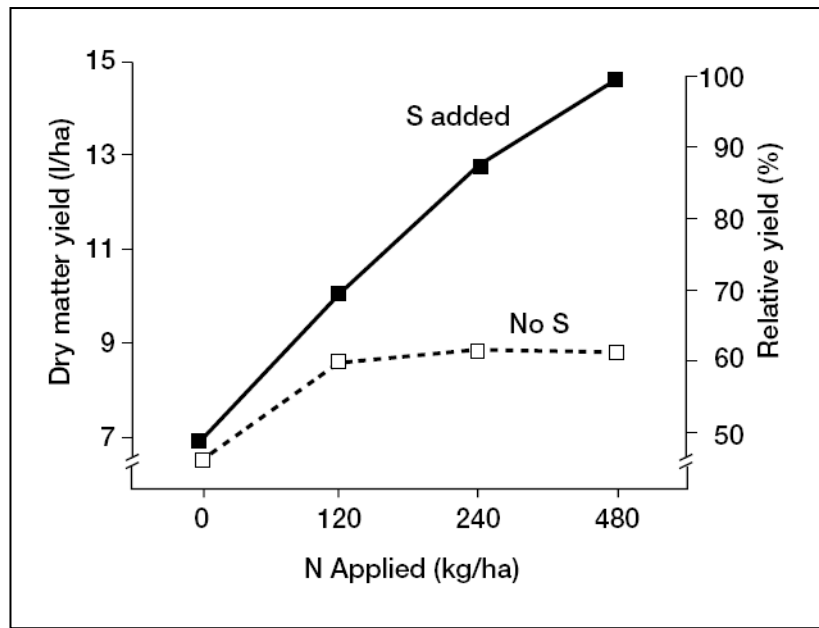


Figure 44. Production totale d'herbage en quantité absolue et en pourcentage du maximum en fonction des quantités des fertilisants N et S appliqués. (Murphy, 2002).

généralement plurispécifiques. Dans la mesure où toutes les espèces ne présentent pas le même niveau d'exigence en S (Briggs & Goldmann, 2002), la disponibilité en S peut moduler les relations de compétition entre les espèces. Walker *et al.* (1956) ont observé que l'application du gypse riche en S sur les sols prairiaux très pauvres en cet élément modifiait la composition floristique des prairies en favorisant les Fabacées plus que les Poacées. Taliec *et al.* (2008) sur des cultures mixtes de ray-grass et de trèfle blanc ont également mis en évidence qu'une plus grande disponibilité en S favorisait le trèfle blanc.

Les teneurs en S des sols peuvent donc influencer le rendement et la composition spécifique des prairies et par conséquent la qualité du fourrage produit (Figure 44) (Murphy & Quirke 1997 ; Murphy, 2002 ; Mathot *et al.*, 2008).

Résultats

«Chaque homme est destiné à trouver un trésor. Mais seul celui qui écoute la voix de son cœur trouvera les véritables trésors.»

D'après Paulo Coelho, L'Alchimiste

Chapitre :

1 Functional plasticity of *Trifolium repens* L. in response to Sulphur and Nitrogen availability

CHAPITRE I

-

Functional plasticity of *Trifolium repens* L.

in response to Sulphur and Nitrogen availability

(Article 1)

Sébastien VARIN ^a, Servane LEMAUVIEL-LAVENANT ^a, Jean Bernard CLIQUET ^b,
Sylvain DIQUELOU ^a and Terence Padraic Thomas MICHAELSON-YEATES ^c

Article accepté en 2008 dans *Plant and Soil*.

^aINRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

^bUniversité de Caen, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

^cInstitute of Grassland and Environmental Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Ceredigion, United Kingdom

Keywords: Competitive ability - N₂ fixation - N uptake - Sulphur acquisition - Photosynthesis - Vegetative and sexual reproduction

Préambule

La première expérimentation, avait pour objectif de rechercher **Quelles sont les fonctions biologiques les plus modulées par la disponibilité en soufre ?**

Ainsi, nous avons cherché à évaluer la plasticité du trèfle afin de prévoir son évolution dans un contexte d'appauvrissement en soufre du sol ou à l'inverse, dans le cas d'apport de fertilisants soufrés. L'azote étant à la fois l'élément le plus souvent limitant et celui qui est apporté le plus fréquemment dans les fertilisants, cette étude repose également sur l'effet de la balance N/S du sol. Différents scénarii de disponibilité en N ont donc été envisagés ici.

Dans une approche d'écologie fonctionnelle, nous avons analysé un ensemble de traits fonctionnels se rapportant à quelques fonctions biologiques. Nous avons bénéficié de 3 lignées de trèfle blanc autofécondes sélectionnées par T. Michaelson-Yeates de l'I.G.E.R. (Aberystwyth). Ces lignées sont contrastées dans leurs capacités de fixation de l'azote atmosphérique N_2 et d'absorption du nitrate. Les performances des 3 lignées ont été confrontées dans des situations différentes de disponibilité en N et en S. Les trèfles ont été cultivés en serre, sur sol pauvre auquel ont été ajoutés des engrais dans lesquels 3 niveaux d'azote (0, 50 et 100 Kg ha⁻¹ N (NH₄⁺/NO₃⁻)) et 3 niveaux de S (0, 12 et 24 Kg ha⁻¹ S (SO₄²⁻)) ont été croisés.

Cet article a été accepté en 2008 dans la revue *plant and Soil* (DOI 10.1007/s11104-008-9800-4).

Abstract

Recent control of atmospheric SO₂ pollution is leading to important soil sulphur impoverishment. Plasticity could be a mechanism allowing species to adapt to this rapid global change. *Trifolium repens* L. is a key grassland species whose performances in community are strongly linked to nitrogen availability. Plasticity of three white clover lines contrasting in their ability to use atmospheric N₂ or soil N was assessed by analysing a set of functional traits along a gradient of nitrogen and sulphur fertilisation applied on a poor soil. White clover traits showed high morphological and physiological plasticity.

Nitrogen appeared to be the most limiting factor for the VLF (Very Low Fixation) line. S was the element that modulated the most traits for the nitrogen fixing lines NNU (Normal Nitrate Uptake) and LNU (Low Nitrate Uptake). As expected, N fertilisation inhibited white clover fixation, but we also observed that N₂ fixation was enhanced when S was added. S fertilisation increased nodule length as well as the proportion of nodules containing leghaemoglobin. S fertilisation, with a direct effect and an indirect effect through N₂ fixation, increases white clover performances particularly with regards to photosynthesis and potential vegetative reproduction.

The important plasticity in response to S availability should allow it to adapt to a large range of abiotic conditions, but its sensitivity to S nutrition would be a disadvantage for competition in a situation of soil sulphur impoverishment. In contrast, S fertilisation could help maintain this species when nitrogen status is against it.

I. Introduction

Limiting the impact of human activities on the environment has become an important political concern in recent decades. Recent control of atmospheric pollution has led to a drastic decrease in atmospheric sulphur (S) since the 1980s (Ceccotti & Messick, 1997; Scherer, 2001). This global change has important consequences with regards to agriculture since in the past, S deposition from the atmosphere provided sufficient input to compensate export in crop or forage harvests. The decrease of S input from atmospheric depositions is now compensated by a growing use of S fertilisers for crops such as oilseed rape which is a S demanding plant (Zhao *et al.*, 1993; Blake-Kalff *et al.*, 1998; Fismes *et al.*, 2000). However in European grasslands, fertilisation is still low and S fertilisation is not common.

The decrease in soil S content may have important effects on grasslands in term of biodiversity, forage quality or ecosystems functions but few studies have considered S effects on such semi natural systems (Murphy & Boggan, 1988; Murphy & Quirke, 1997; Morton *et al.*, 1999; Mathot *et al.*, 2008). Sulphur is the ninth and least abundant essential macronutrient in plant. Its uptake and assimilation is crucial because of the key role played by the sulphur amino acids, methionine and cysteine in maintaining protein structure and because of its role played in plant defence via sulphur containing defence compounds synthesis (Rausch & Wachter, 2005). Changes in its availability in soil may then modify species fitness.

To understand the potential change in grasslands, we chose to focus on white clover, a “key species” of grasslands communities. It is the most common legume in European grasslands which can be used as a natural fertiliser because of its ability to fix atmospheric nitrogen and make it available for other plants thus reducing chemical N fertiliser use without reducing grassland production (Haynes, 1980). The role of this species in grasslands communities is strongly linked to this particularity and thus its competitive ability depends on soil nitrogen status (Murphy & Quirke, 1997; Simon *et al.*, 1997; Mosquera-Losada *et al.*, 2004), as use of N fertiliser tends to decrease the proportion of clover in grasslands. In the case of heavily fertilised grassland, nitrate leaching can be very high and a dangerous pollutant. White clover, as a natural fertiliser that fixes atmospheric nitrogen and makes it available for other plants, reduces chemical N fertiliser use without reducing production.

Grassland flora, including white clover, is currently exposed or will be soon exposed to rapid changes in the sulphur availability in soils. Such changes linked to human activities occur too rapidly to allow an evolutionary species response but plasticity could enable species to adapt (Sultan, 2004). Plasticity can be defined as the genotypic propensity to express

different phenotypes when exposed to different environmental conditions (Bradshaw, 1965 ; Schlichting, 1986; Sultan, 2005; Pigliucci *et al.*, 2006) and therefore as an organism's ability to adapt its morphological and physiological response to environmental variations such as nutrient stresses. In the present study, plasticity of white clover was assessed with respect to a large set of functional traits, as defined by Noble & Slatyer (1980), Weiher *et al.* (1999) and specified by Violle *et al.* (2007), which encompass morphological and physiological characteristics and were measured so as to estimate different plant functions such as photosynthesis or nitrogen acquisition.

N₂ fixation appears to be affected by sulphur fertilisation in faba bean (Scherer & Lange, 1996; Habtemichial *et al.*, 2007), lucerne (DeBoer & Duke, 1982; Scherer & Lange, 1996), pea (Scherer & Lange, 1996) and in red clover (Scherer & Lange, 1996). N uptake appears also to be affected in barley (Gilbert *et al.*, 1997), but this is not shown for legumes. In the present study, we hypothesised that S impoverishment could limit white clover performances and may interact with N nutrition via mineral nitrogen uptake or N₂ fixation. Phenotypic plasticity, considered here as a potential mechanism allowing white clover to adapt to a rapid change in sulphur availability, was analysed along a gradient of nitrogen and sulphur fertilisation. Three highly inbred self-fertile lines of white clover with contrasting N acquisition capacities have been used to study sulphur and nitrogen interactions. These lines have been characterized by Michaelson-Yeates *et al.* (1998) and Abberton *et al.* (1998). The first line is called "normal"; the others possess deficiencies, one in nitrate uptake, the second in N₂ fixation (Michaelson-Yeates *et al.*, 1998). This plant material gives the opportunity to isolate the effects linked to N₂ fixation from those linked to nitrate or ammonium uptake.

The goals of this work were (i) to determine the effect of S content in soil on N acquisition by fixation or uptake by clover (ii) to evaluate white clover plasticity so as to predict its evolution in the context of lower soil S content versus fertilisation with different N fertilisation scenarios.

II. Materials and Methods

II.1. Plant material and culture conditions

The three inbred lines characterized by Michaelson-Yeates *et al.* (1998) and Abberton *et al.* (1998) represent three contrasting phenotypes of white clover distinguished by their nitrate uptake and atmospheric N₂ fixation capacities. The first line was named NNU as "Normal rates of Nitrate Uptake"; the other lines possessed deficiencies in N acquisition and

were named **LNU**, “Low rates of Nitrate Uptake” and **VLF** “Very Low rates of N₂ Fixation”. These lines are highly self-fertile and thus, possess a low level of heterozygosity (Michaelson-Yeates *et al.*, 1998). Michaelson-Yeates *et al.* (1998) observed that the growth rate of the three inbred lines was similar to those of established varieties as well as natural ecotypes.

Seeds of the three lines were scarified prior to sowing into perlite on a nutritive solution derived from Kalia and Drevo (1985). After emergence, seedlings (with one leaf) were transplanted into 2L pots (154cm² surface) containing soil with a single plant per pot. The soil came from grasslands located in an experimental farm “Le pin au Haras, INRA” (Normandy, France). It was extracted from a mineral horizon between 15 and 25cm deep, and then air dried and sifted at 2mm. Soil density was 0.9. The soil was adjusted to 30% water content with demineralised water, and stabilized at this water content for a month before culture.

Three N fertilisation rates (0, 50 and 100 Kg ha⁻¹ N (NH₄⁺/NO₃⁻)) were crossed with three S fertilisation rates (0, 12 and 24 Kg ha⁻¹ S (SO₄²⁻)) constituting 9 different treatments. N fertilisation was achieved with NH₄⁺/NO₃⁻ integrating 10% of ¹⁵N in both forms, and S fertilisation consisted of CaSO₄, were provided in two volumes of 50mL a week after planting and then a month later. 40 Kg ha⁻¹ of phosphate and 80 Kg ha⁻¹ of potassium were added (K₂HPO₄/KH₂PO₄) to all the pots so as to avoid a deficiency of these nutrients. Calcium content was adjusted in different pots by adding CaCl₂ to the lower CaSO₄ treatments. Each treatment was applied to each white clover line with four replicates. Nodulation was encouraged by inoculation, four days after transplantation with *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (T354) grown in a Wright’s solution.

Plants were grown in a greenhouse (16h day 20°C / 8h night 16°C) with additional light provided by sodium lamps (Phytoclaude 400W, 250 µmol m⁻² s⁻¹ photosynthetic active photons).

II.2. Functional traits

Phenotypic plasticity of white clover was analysed with respect to functional traits measured after 93 days of culture. A set of 27 traits was used to describe six functions; potential competitive ability, photosynthesis, potential vegetative reproduction, sexual reproduction, nitrogen acquisition and sulphur acquisition (Table I.1).

Before harvest, an index of chlorophyll content, corresponding to the greenness of leaves was measured with a Soil Plant Analysis Development (SPAD) meter.

Table I.1. Nitrogen (N) and sulphur (S) fertilisation effects on functional traits. Results of ANOVAs or Kruskal-Wallis tests and significance. F: ANOVA statistics; Trans.: Transformation; H : Kruskal Wallis statistics, in italic (ns : non significant, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

Traits	NNU			LNU			VLF		
	S			S			S		
	Trans.	F / H	F / H	Trans.	F / H	F / H	Trans.	F / H	F / H
<u>Potential competitive ability</u>									
Shoot mass		2.90 ns	0.08 ns	1.5 ns	15.87 **	0.95 ns		1.27 ns	22.16 ***
Root mass		0.19 ns	1.25 ns		0.99 ns	0.71 ns	1.13 ns	0.38 ns	8.77 *
<u>Photosynthesis</u>									
lamina area		15.64 ***	0.06 ns		22.10 **	1.03 ns	7.19 ***	6.11 *	14.83 ***
lamina biomass		14.71 ***	0.24 ns		32.16 **	2.69 ns	5.69 **	4.59 ns	17.20 ***
Number of leaves		7.77 *	0.21 ns		25.88 **	5.68 **	7.96 ***	x1/3 13.59 ***	5.28 ** 0.14 ns
Chlorophyll index		3.29 ns	1.66 ns	1.19 ns	0.75 ns	0.38 ns	1.56 ns	Log x 3.40 *	114.23 *** 8.37 ***
<u>Potential vegetative reproduction</u>									
Number of primary stolons		1.02 ns	1.17 ns	1.13 ns	13.09 **	0.57 ns	1.15 ns	12.66 ***	0.92 ns 2.74 *
Number of secondary stolons		3.69 *	1.82 ns	1.17 ns	8.54 **	4.38 **	10.94 ***	9.83 **	2.16 ns
Stolon total mass		0.42 ns	0.37 ns	1.74 ns	Log x 5.04 *	0.17 ns	3.44 *	0.37 ns	40.73 *** 4.98 **
Stolon total length		6.79 *	1.01 ns		1.65 ns	3.91 ns		1.45 ns	11.66 *** 2.97 *
Primary stolons length	x ²	0.40 ns	0.63 ns	0.25 ns	3.32 ns	2.49 ns	0.89 ns	0.63 ns	15.57 ***
Secondary stolons length	√x	1.32 ns	0.59 ns	1.72 ns	0.30 ns	4.10 *	5.06 **	1.94 ns	3.47 * 1.95 ns
Mean of primary stolon diameter		7.47 **	2.24 ns	18.51 ***	13.55 **	1.37 ns		1.84 ns	12.59 **
<u>Sexual reproduction</u>									
Inflorescence mass		0.01 ns	2.24 ns		3.32 ns	1.90 ns	3.64 **	2.82 ns	16.87 ***
Number of Inflorescences		2.03 ns	6.18 *		2.34 ns	1.71 ns	2.36 ns	√x 3.84 *	19.38 *** 1.51 ns
Number of flowers		0.01 ns	2.12 ns		2.24 ns	0.92 ns	2.20 ns	√x 3.09 ns	24.52 *** 1.85 ns
<u>Nitrogen acquisition</u>									
N content / plant		21.07 ***	0.09 ns	2.70 ns	22.53 **	0.80 ns		2.48 ns	20.73 ***
N content / lamina		19.52 ***	0.57 ns		23.13 **	1.68 ns		4.62 ns	18.00 ***
N content / stolon		6.62 **	0.13 ns	1.78 ns	12.61 **	2.68 ns		0.30 ns	14.76 ***
N content / root		0.99 ns	0.85 ns		log (√x) 4.44 *	0.84 ns	0.49 ns	1.53 ns	11.61 **
N derived from fertiliser (Ndff)		0.08 ns	31.14 ***		0.07 ns	31.14 ***		0.55 ns	31.14 ***
Nodule mean length		25.78 ***	1.57 ns	1.36 ns	16.12 **	1.24 ns	1.97 ns	0.66 ns	1.08 ns 0.11 ns
% nodules with leghaemoglobin		23.97 ***	0.36 ns		31.17 **	0.21 ns		1.39 ns	2.86 ns
<u>Sulphur acquisition</u>									
S content / plant		22.46 ***	0.26 ns		28.58 **	0.38 ns		12.32 **	8.38 *
S content / lamina		21.06 ***	0.91 ns		25.44 **	0.82 ns		3.62 ns	17.53 ***
S content / stolon		24.07 ***	0.18 ns		24.82 **	0.88 ns		11.90 **	1.27 ns
S content / root		3.52 ns	0.78 ns		Log(x) 9.36 **	0.80 ns	0.96 ns	13.48 ***	3.05 ns

During harvest, different organs of each plant were isolated. Leaf lamina area was measured with an area meter LI-COR LI-3100 and primary and secondary stolon length was measured. An aliquot of roots was isolated after washing, then, nodules were separated from roots, counted, their length measured and the presence of leghaemoglobin giving the red colour or not was noted. All harvests were dried at 60°C and weighted when constant.

All plant organs were analysed with an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Isoprime, GV instrument) which provides total S, total N and excess ^{15}N . As N fertiliser had 10% excess ^{15}N , the content of N coming from fertilisation is obtained calculating the dilution of this ^{15}N :
Content of N coming from fertilisation = (plant atom excess % * total N)/ fertiliser atom excess %.

II.3. Data analysis

Data were analysed by variance analysis, ANOVA (Sokal & Rohlf, 2003). Prior to the ANOVAs, a Ryan-Joiner test (95%) and a Bartlett test (95%) were used on each set of data so as to assess data normality and homogeneity of variances. Some data did not fit the parametric tests conditions, and were subsequently transformed, or when this was not possible the non parametric test of Kruskal Wallis was applied. A Tukey test or, when the data did not fit parametric conditions, a signed-ranks test, were used to compare all treatments.

III. Results

White clover plasticity was evaluated by the treatment effects obtained with ANOVA or the test of Kruskal-Wallis. From a total of 27 traits, the effect of treatments was significant on 16 traits for the NNU line, 21 for LNU and 25 for VLF (Table I.1).

NNU and LNU presented a higher plasticity in response to S fertilisation than to N fertilisation and 14 traits for NNU and 18 for LNU varied with S treatments, whereas only 2 traits for NNU and 4 traits for LNU varied with N treatments (Table I.1). The sulphur acquisition function was the most sensitive to S fertilisation but it also induced a high plasticity for nitrogen acquisition (Table I.1).

VLF, the non fixing line differed from the two other lines by an important N treatment response because 21 traits were modified by N fertilisation rate while 9 traits varied significantly with S treatments (Table I.1). S fertilisation induced an important plasticity for S acquisition but no plasticity for N acquisition.

Sulphur fertilisation effects on traits, when they existed, were progressive, so, only 0S and 24S treatments will be presented in the following results.

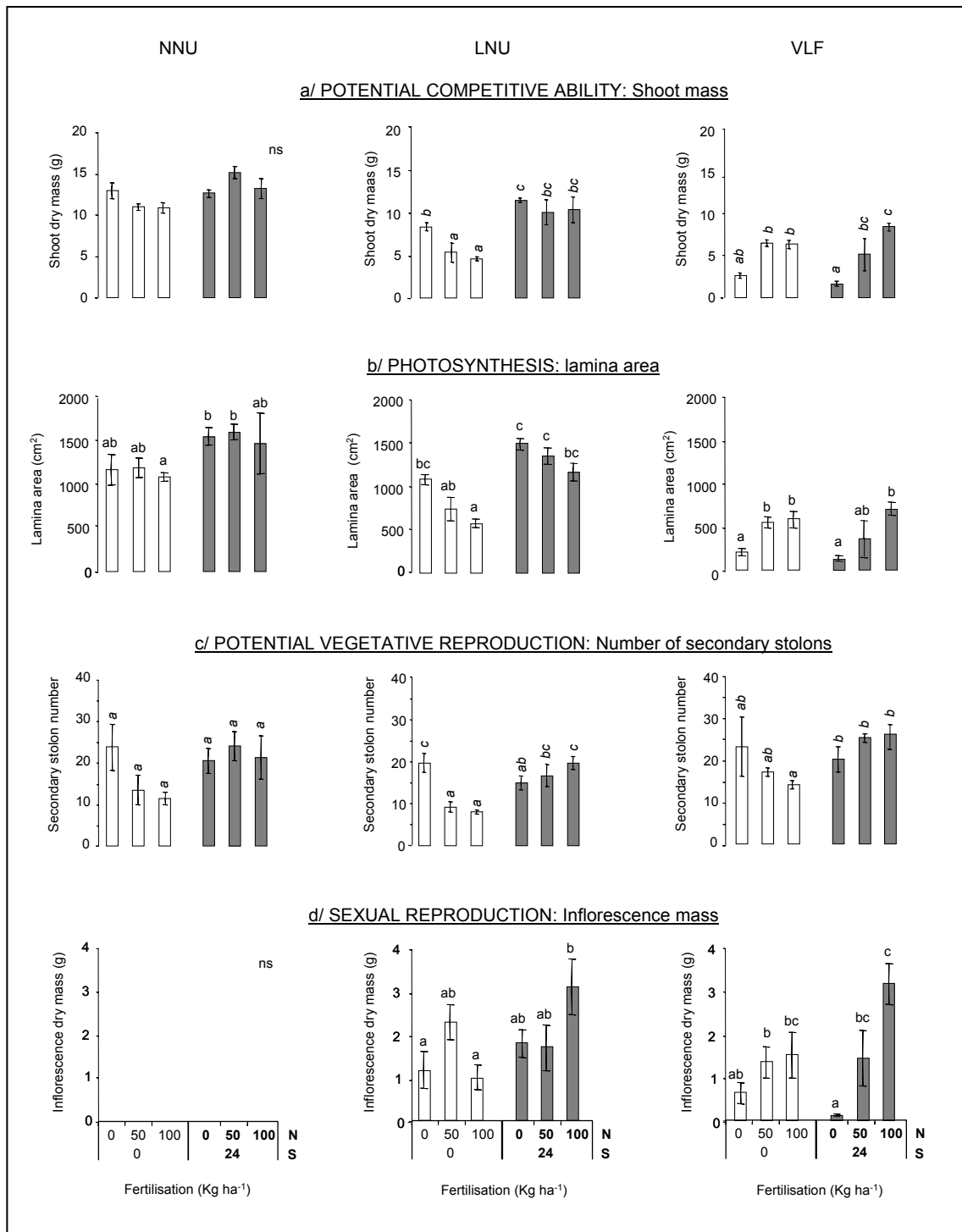


Figure I.1. Variation of four traits chosen to describe a/ potential competitive ability b/ photosynthesis, c/ potential vegetative reproduction, d/ sexual reproduction, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

III.1. Potential competitive ability, photosynthesis, vegetative and sexual reproduction

Root mass was not altered significantly by fertilisation for NNU and LNU lines (Table I.1) but increased with increasing N fertilisation for VLF (data not shown). Even if a little S effect appeared in shoot mass for NNU (Table I.1), means could not be significantly differentiated (Figure I.1a). Shoot mass for LNU was increased with S fertilisation and decreased with N fertilisation when no S was added (Figure I.1a). This trait was increased with N fertilisation for VLF but only with 24 Kg S ha⁻¹ (Figure I.1a).

Among the four traits used to describe photosynthesis, lamina area appeared to be the most plastic. Low N levels with the high S level induced higher lamina area than high N level with no S for NNU (Figure I.1b). For LNU, the treatment 0 Kg S ha⁻¹ / 100 Kg N ha⁻¹ induced the lowest lamina area and S fertilisation allowed highest photosynthetic area (Figure I.1b). Photosynthesis appeared to depend more on N fertilisation than S fertilisation, for VLF (Figure I.1b) and the low lamina areas corresponding to an absence of N fertilisation (Figure I.1b) were enclosed with low chlorophyll index (data not shown).

The potential vegetative reproduction function was assessed by clonal architecture parameters linked to stolon morphology. The number of secondary stolons was the trait which presented the biggest amplitude of variation with S and N treatments (Table I.1). No significant differences appeared between means for NNU but for LNU line, an increasing N fertilisation without S induced a significant decrease in secondary stolon number (Figure I.1c). This trait increased with S fertilisation for the 100 Kg N ha⁻¹ treatment for LNU (Figure I.1c). The secondary stolon number increased with S fertilisation when 100 Kg N ha⁻¹ was applied to the VLF line.

All plants from the two white clover lines, LNU and VLF, flowered during the growing period while only a few NNU clover plants have flowered (Figure I.1d). A small S and N interaction effect appeared for LNU flowering (Table I.1) and the largest inflorescence mass was for the treatment 24 Kg S ha⁻¹ / 100 Kg N ha⁻¹ (Figure I.1d). In the case of VLF clovers, all flower traits were strongly linked to N fertilisation (Table I.1) and inflorescence mass increased with N fertilisation when S was added (Figure I.1d).

III.2. Nitrogen acquisition

Nitrogen acquisition was studied by measuring traits linked to mineral nitrogen uptake such as N derived from fertiliser (Ndff), traits linked to atmospheric N₂ fixation such as

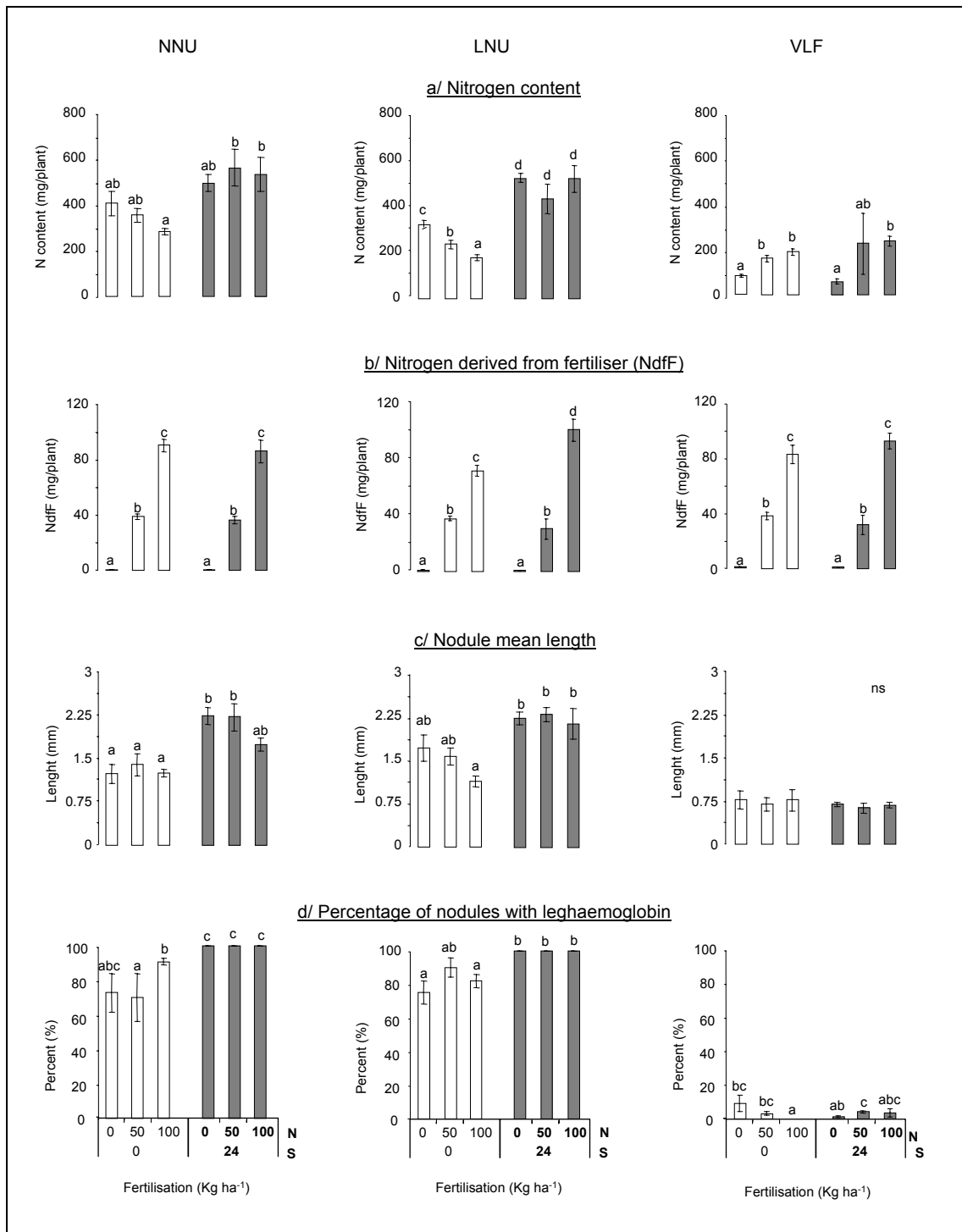


Figure I.2. Variation of four traits chosen to describe N acquisition, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

nodule traits and traits linked to both N acquisition pathways such as N content. All traits showed important plasticity in response to treatments except N content in roots which was quite stable (Table I.1).

For the two fixing lines, NNU and LNU, N acquisition appeared strongly linked to S fertilisation (Figure I.2a). For each S treatment, N fertilisation increased NdfF indicating that soil mineral N uptake is strongly linked to mineral N availability in the substrate (Figure I.2b). When no S was added, increasing N fertilisation increased NdfF (Figure I.2b) but not N content for the two fixing lines particularly for LNU in which N content decreased (Figure I.2a). Considering that the absorption of fertiliser N varied in the same way as absorption of soil N, this suggests a decrease in N₂ fixation. When S was added, this negative effect of N fertilisation was not observed (Figure I.2a.) and moreover N content per plant was increased (Figure I.2a). Assuming that atmospheric N₂ fixation by VLF line clover was negligible when N fertiliser was added in the soil, use of ¹⁵N-enriched fertiliser allowed us to calculate that N derived from fertiliser (NdfF) represented about 43% of total N absorbed by plants, and N from the soil represented 57 %. If we extrapolate this proportion to the fixing lines, we can estimate the content of absorbed N and the content of N coming from the atmosphere:

$$\text{N absorbed} = (\text{NdfF} / 43) * 100$$

$$\text{N fixed from atmosphere} = \text{total N} - \text{N absorbed}$$

When S fertilisation was increased from 0 to 24 kg S ha⁻¹ for plants grown on 100 Kg N ha⁻¹ treatment, N coming from the atmosphere increased from 72 mg per plant to 333 mg per plant for NNU and from 16 mg per plant to 299 mg per plant for LNU, demonstrating the strong stimulation of S fertilisation on atmospheric N₂ fixation. This hypothesis of a low fixation induced by an absence of S fertilisation is supported by the smaller length of nodules (Figure I.2c) and the greater number of nodules without leghaemoglobin (Figure I.2d) observed in the 0S treatments for both NNU and LNU lines. This hypothesis is reinforced by the independence of N acquisition from S fertilisation observed for the non fixing line (Table I.1). VLF clovers were characterised by short nodules (Figure I.2c) deprived of leghaemoglobin (Figure I.2d) and so were quite unable to fix N₂. Nutrition depended mostly on N availability in the substrate. N fertilisation increased the total content of N per plant (Figure I.2a) and NdfF (Figure I.2b).

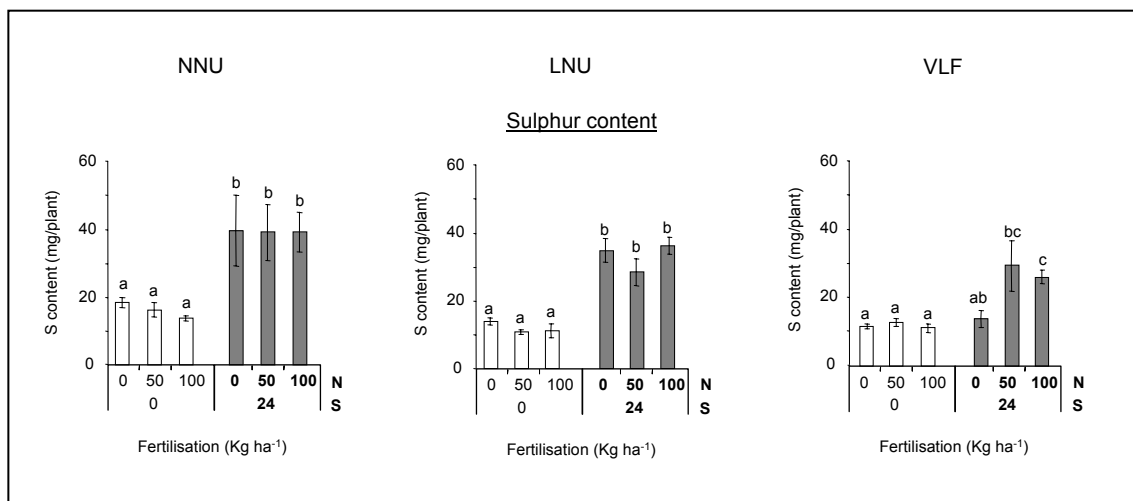


Figure I.3. Variation of S content, chosen to describe S acquisition, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

III.3. Sulphur acquisition

Sulphur content per plant in organs and in the whole plant varied significantly with S fertilisation for both line NNU and LNU (Table I.1). S fertilisation induced a greater S content (Figure I.3). S contents followed the same pattern in all organs (data not shown) but differences between treatments were less significant for roots (Table I.1). S contents were not modified by N treatments for LNU and NNU lines.

For VLF, S content increased with S fertilisation but only after 50 Kg N ha⁻¹ was added. This N fertilisation effect may correspond to the increase of shoot mass realised for the same treatments.

IV. Discussion

IV.1. Fertilisation effects on sulphur and nitrogen acquisition

This paper confirms previous studies showing the stimulation of legume growth by increasing sulphur availability and provides some explanation for this high impact of sulphur availability. The use of three lines contrasting in their ability to absorb soil N and fix atmospheric N₂ offers the opportunity to characterise the link between N and S cycles in legumes and to study whether the stimulation of N acquisition by S fertilisation is due to a stimulation of N uptake, or a stimulation of N₂ fixation.

The three white clover lines with contrasting N acquisition abilities possessed a considerable capacity to adjust their performances in response to S and N treatments. As each white clover inbred line used here is characterized by low genotypic heterozygosity (Michaelson-Yeates *et al.*, 1998), morphological and physiological variations observed can be considered as plasticity to a great extent. Assessing plasticity, Navas and Garnier (2002) proposed the analysis of traits closely related to the resource which vary so as to estimate the plasticity of a species and then to focus on changes corresponding to direct functional responses. Traits chosen here to describe S acquisition are the traits which varied the most with S fertilisation treatments. An application of S fertiliser on a poor soil increased greatly the content of S per plant.

In agreement with numerous studies (Macduff *et al.*, 1996; Soussana *et al.*, 2002) our results obtained with the two lines fixing atmospheric nitrogen confirm that N₂ fixation decreases when N external content increases. This negative effect of mineral N was observed for treatments with low S fertilisation but not for high S fertilisation. Indeed, we found an important link between S and N nutrition: a S fertilisation stimulates strongly N₂ fixation. Our

findings are consistent with data obtained for other legumes (DeBoer & Duke, 1982; Zhao *et al.*, 1999; Scherer & Lange, 1996). N and S are generally accumulated in proportion similar to those incorporated into proteins and S deficiency decreases protein synthesis, resulting in free amino acid accumulation (Dijkshoorn & Van Wijk, 1967; Aulakh *et al.*, 1976; Karmoker *et al.*, 1991a). Scherer and Lange (1996) postulated that these amino acids could have some feed-back repression on N₂ fixation. This hypothesis could explain partially our results. Dijkshoorn and Van Wijk (1967) defined an optimal N/S ratio of about 40 for legumes. Our ratios were close to this number and decreased with S fertilisation. When 24 kg S ha⁻¹ was added for the 100 Kg N ha⁻¹ treatment, mean N/S ratio decreased from 47 to 34 for NNU and from 39 to 34 for LNU. The decreasing N/S ratio could enable an optimum protein synthesis and allow a higher N₂ fixation.

The stimulation of N₂ fixation by S fertilisation can also be explained by a stimulation of nodule formation. Fixation abilities are strongly linked to nodules morphology. Abberton *et al.* (1998) showed a decrease of the mean dry weight per nodule and total nodule dry weight per plant when nitrate was added. In our study, nodule mean length and leghaemoglobin content were very low for the VLF line. Nodules appeared smaller without S fertiliser and their length increased when S was added for both NNU and LNU. Similarly, and in accordance with Scherer *et al.* (2008) who observed that the amount of leghaemoglobin was reduced by S deficiency in peas and alfalfa, when no S was added, nodules devoid of leghaemoglobin were more numerous. Because leghaemoglobin regulates the supply of oxygen to the nodule tissues, it allows nitrogenase activity. For the non fixing line (VLF), N appeared to be the limiting factor and there was no significant S effect on nitrogen acquisition traits. Because this line uses mainly soil N, this result suggests that S deprivation has little effect on N uptake but reduces clover growth mainly by altering N₂ fixation.

IV.2. Fertilisation effects on potential competitive ability, photosynthesis and sexual and vegetative reproduction

The potential competitive ability, photosynthesis, and vegetative and sexual reproduction, revealed plasticity within the three inbred lines in response to S / N fertilisation. This suggests a direct effect of S fertilisation on clover performance and also an indirect effect via N₂ fixation. Direct and indirect effects are difficult to distinguish, because they are interrelated in many cases, eg. S fertilisation increased S and N contents and stimulated plant growth. VLF, the non fixing line, thus represents a control and allows the observation of direct effects of S even if this line was strongly dependent on N fertilisation.

The ability to compete is estimated here on plants grown individually in pots. It represents a predicted potential competitive ability and not a real competitive ability and our results are in accordance with those of Tallec *et al.* (2008) who studied white clover performances in a situation of interspecific competition. N fixing lines, particularly LNU are less vigorous and would be less competitive when nitrate is applied without S and more competitive when S is applied.

Sulphur metabolism, like nitrogen metabolism, is linked to carbon metabolism because, for example, of the thylakoïds sulpholipids or iron-sulphur centres of enzymes implied in Photosystem I (Imsande, 1998). Gilbert *et al.* (1997) demonstrated that S deprivation affected the net carbon assimilation rate in *Triticum aestivum* leaves. Ahmad and Abdin (2000) showed that S fertilisation increased rubisco and chlorophyll content in *Brassica* genotypes. The literature reports the same yellow coloration of plants induced by S deficiency as by N deficiency (Imsande, 1998) due to a deficiency of chlorophyll. In our case, chlorophyll content estimated by an index was not a good indicator of S deprivation, as it was quite unchanged by the S treatments. However photosynthesis appeared to be affected at the organ scale and the lamina area represented an interesting trait to assess photosynthetic function because photosynthesis must be proportional to photosynthetic area if chlorophyll content is not affected. It was particularly dependent from S fertilisation for LNU and grew with S fertilisation when N was added, allowing thus optimum photosynthesis. The non fixing line VLF was not influenced by S fertilisation, and this support the hypothesis that the S effect on photosynthesis is linked to an improved N₂ fixation.

White clover includes two regenerative modes. It regenerates mainly by rooted stolons in communities and colonises new habitats by seeds (Grime *et al.*, 1988). The responses to fertilisation are quite different in those two reproduction modes. Fertilisation seemed to have an indirect effect or a “biomass effect” on flowering as inflorescence mass varied in the same way as many other functions. This trait was dependent on the line, flowering was quite absent for NNU, increased with both S and N fertilisation for LNU and was closely related with N fertilisation and slightly with S for VLF. For the two fixing lines and particularly for LNU, N fertilisation limited vegetative reproduction under high N fertilisation. This effect seems linked to N acquisition and could correspond to an indirect S effect, via N₂ fixation. However, we observed a stimulation of vegetative reproduction by S fertilisation for VLF and LNU.

IV.3. White clover behaviour in a context of sulphur impoverishment versus fertilisation in grassland soils

Many studies have reported plastic responses as expression of advantageous phenotypes in a broader range of ecological scenarios (Bradshaw, 1965; Schlichting, 1986; Caradus *et al.*, 1993; Via *et al.*, 1995; Pigliucci *et al.*, 2006; Sultan 2005). Our study confirms the high white clover plasticity, as already established for other stresses (Frankow-Lindberg, 1999; Gautier *et al.*, 2001; Høgh-Jensen, 2003). This plasticity should allow white clover to develop across a large range of sulphur and nitrogen availability in soils.

This functional analysis of white clover demonstrates the strong interactions existing between two macroelements linked to environmental pollution: S which is decreasing in the atmosphere as a positive global change and N which induces a growing source of water pollution (Haneklaus *et al.*, 2003). Mineral N content in soil, linked to agricultural management, is well known to regulate floristic composition in grasslands (Piper, 1995; Murphy & Quirke, 1997; Jacquemyn *et al.*, 2003). Oligotrophic soils allow the grass / white clover mixture to persist, while N fertilisation gives the advantage to grasses and reduces white clover content (Murphy & Quirke, 1997; Simon *et al.*, 1997; Mosquera-Losada *et al.*, 2004). The present work suggests that S soil impoverishment linked to the decrease in atmospheric S pollution would amplify the effect of N enrichment by chemical fertilisation: the decrease in the performances of white clover and then a decrease in its cover in grasslands. S fertilisation, allowing N₂ fixation, even when mineral N is added could enhance the competitive ability of white clover and play a role in maintaining it as a natural fertiliser in grassland mixtures.

Acknowledgements We are grateful to Marie-Paule Bataillé for technical assistance in isotopic analysis.

Chapitre :

2

How does sulphur availability modify N acquisition of White Clover (*Trifolium repens* L.)?

CHAPITRE II

-

**How does sulphur availability modify N acquisition
of White Clover (*Trifolium repens* L.)?
(Article 2)**

Sébastien VARIN, Jean-Bernard CLIQUET, Emmanuelle PERSONENI, Jean-Christophe AVICE, Servane LEMAUVIEL-LAVENANT.

L'article sera soumis prochainement à *Physiologia Plantarum*.

^aUniversité de Caen, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

^bINRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

Préambule

La première expérimentation, nous a permis de démontrer la plasticité de nombreuses fonctions du trèfle blanc confronté à des disponibilités variables en azote et en soufre. Elle a mis en évidence un impact majeur de la disponibilité en S sur la fixation de l’N atmosphérique chez le trèfle.

Dans ce deuxième chapitre, l’objectif est de comprendre comment le soufre stimule la fixation. La stimulation de la fixation du N₂ par le S est-elle la conséquence : **(1) d'une stimulation de la croissance de plantes, (2) d'un effet spécifique du S sur la nodulation, (3) et/ou d'un effet spécifique du S sur le métabolisme des nodules ?**

Pour étudier la fixation du N₂, nous avons cherché à limiter la variabilité génétique en produisant des clones de trèfle, provenant d’un génotype de la variété Huia. Ces clones ont été obtenus par multiplication végétative à partir de stolons provenant d’une même plante mère et cultivés en hydroponie. Ils ont été soumis à trois niveaux de disponibilité en sulfate réalisés par trois concentrations de la solution nutritive : 0, 0,095mM et 0,380 mM de SO₄²⁻. La fixation de l’azote a été mesurée par la méthode de dilution du ¹⁵N fourni dans les solutions nutritives. Un scanner « WinRHIZO » a été utilisé pour l’acquisition des paramètres morphologiques des racines et des nodules. L’analyse du métabolisme des nodules s’est centrée sur l’analyse des contenus en acides aminés, Nitrogénase et Légghémoglobine.

Cette expérimentation a permis la rédaction d’une publication qui sera soumise en Février 2009 dans la revue *Physiologia Plantarum*.

Abstract

To reconcile conflicting reports on the role of S in symbiotic N fixation, we investigated the impact of S availability on plant growth, N uptake and N fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). We focused this work on the stimulation of N₂ fixation by S supply and asked if it resulted from a stimulation of host plant growth, a specific effect of S on nodulation, or a specific effect of S on nodule metabolism.

Clones of white clover, inoculated with *Rhizobium leguminosarum*, were grown for 140 days in a hydroponic system with three levels of sulphate concentration (0mM, 0.095mM and 0.38mM). Nodule morphological and biochemical traits, such as nodule protein contents (Nitrogenase and leghaemoglobin obtained by an immunological approach) and amino acid concentrations, were used to analyse the effect of S availability on N₂ fixation. The application of S increased whole plant dry mass, root length, and nodule biomass -expressed on a root length basis.

N uptake proved less sensitive to S deficiency than N₂ fixation, and decreased as a consequence of the lower root length observed in S deficient plants. N₂ fixation was drastically reduced in S-deficient plants, mainly as a consequence of decreased nodule development, but also as a consequence of decreased nitrogenase and leghemoglobin production and an accumulation of asparagine and arginine.

I. Introduction

Legumes are environmentally, agriculturally and economically important in many cropping systems because of their ability to reduce atmospheric N₂ symbiotically. Because the use of nitrogen (N) fertiliser contributes substantially to environmental pollution, this biological alternative has received increasing attention in agricultural practices in the last few years. Legumes are particularly sensitive to a wide range of environmental limitations. Studies on mineral requirements of the Legume–Rhizobia symbiosis, phosphorus (P), and to a lesser extent potassium (K), have received considerable attention because N, P and K are frequently the most limiting nutrients for plant growth in numerous ecosystems (Høgh-Jensen, 2003; Olivera *et al.*, 2004). It is now well documented that legume growth and nitrogen (N) fixation are highly responsive to P and K supplies.

The effect of sulphur (S) supply on N₂ fixation has received less attention, as S availability in soil has not been considered in the past as a limiting factor for plant growth. However, crop deficiencies of S have been reported with increasing frequency in the last decade, caused by decreasing anthropogenic S input and by the lack of input through S fertilisation to compensate for exportation (Scherer, 2001). S is accumulated in plants in low concentrations compared to N, but is essential in plant defence compounds (Rausch & Wachter, 2005) and as a constituent of proteins. S deficiencies have been observed in Brassiceae, Poaceae, but also in Fabaceae. Fabaceae species require a large quantity of S, probably because of their high protein concentration (Aulakh *et al.*, 1976) and because S is crucial for N₂ fixation (Scherer & Lange, 1996; Scherer *et al.*, 2008; Krusel *et al.*, 2005).

S deficiency causes a decrease in N acquisition by plants as a result of a decrease in nitrate uptake (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991) or N₂ fixation (Zhao *et al.*, 1999; Scherer *et al.*, 2008). The low N₂ fixation observed in S deficient plants can result in lower plant growth (Scherer & Lange, 1996) or in a specific effect of S on N₂ fixation (Zhao *et al.*, 1999; Pacyna *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2008). Low N₂ fixation is due to the effect of S on nodule growth (Scherer *et al.*, 2008), or the effect of S on nodule metabolism (Scherer *et al.*, 2008). In a previous study, we observed a specific effect of S deficiency on N₂ fixation in white clover (Varin *et al.*, in press). However, the mechanisms accounting for this decreased activity have not been elucidated. It has recently been proposed that the low nitrogenase activity observed in S deficient plants is due to a limitation of the energy supply to the nodule, as well as a decrease of leghemoglobin and ferredoxin concentrations (Pacyna *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2008). Even if it is known that i) N₂ fixation can be reduced as a consequence

of low nitrogenase concentration in plants submitted to nutrient stresses (Bolano *et al.*, 2006)
 ii) S is a central component of this metallo cluster enzyme (Curatti *et al.*, 2006), the effect of S supply on nitrogenase concentrations has not been considered in any of these studies.

The objective of this study was to reconcile conflicting reports on the role of S in the symbiotic N fixation by investigating this effect on white clover (*Trifolium repens* L.), a major legume in Western Europe grasslands and a species highly sensitive to S supply (Tallec *et al.*, 2008; Varin *et al.*, in press). We addressed the following questions: Does the stimulation of N₂ fixation by S supply results from (1) a stimulation of host plant growth (2) a specific effect of S on nodulation (3) a specific effect of S on nodule metabolism?

To answer to these questions, we have submitted white clover plants of the same genotype to three sulphate availability levels, and we have analysed nodule morphological and biochemical parameters in relation to the modification of plant dry mass.

II. Materials and methods

II.1. Plant material, Clone production and Growth conditions

Clones of *Trifolium repens* L. cv Huia were obtained by vegetative multiplication of the stolon of one individual chosen as an average individual from a population. Each individual consisted of a 20 mm stolon section including a node. When the primary leaf appeared, each fragment was transferred to a hydroponic system of a continuously aerated nutrient solution in 1L black plastic bottles to maintain darkness in the rooting environment. Plants were grown in a greenhouse with a light measured at plant level equal to 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [sodium high pressure “phytoclaude 400W” and sun] provided for a 16 / 8 h photoperiod at 25 / 16°C day / night. The nutrient solution was inoculated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* T354 and was prepared with demineralised water, changed weekly, and contained 2 mM KNO₃, 0.18mM CaCO₃, 0.4mM KH₂PO₄, 0.15mM K₂HPO₄; 3mM CaCl₂, 0.2mM EDTA 2NaFe (3H₂O), 14 μ M H₃BO₃, 3 μ M ZnCl₂, 0.7 μ M CuCl₂, 0.7 μ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1 μ M CoCl₂ for 20L. Three treatments were chosen “Zero S”, “Low S” (0.095 mM SO₄²⁻) and “High S” (0.380 mM SO₄²⁻). MgSO₄ was partly or entirely replaced by equimolar amount of MgCl₂ and KCl for 0 and Low S treatments. The nutrient solution contained ¹⁵NO₃⁻ 0.5 atom excess % to allow the measurement of NO₃⁻ absorbed from the nutrient solution and N₂ fixed from the atmosphere.

Plants were harvested 70 and 140 days after transfer into the hydroponic solution, separated into shoots, roots and nodules and then dried at 70°C and weighed when mass was constant. Aliquots of roots and nodules were collected on ice bath and frozen for morphological and biochemical analysis (amino acids and proteins).

II.2. Root and Nodule morphological analysis

Root and nodules morphological parameters were measured using a EPSON Expression 1000XL scanner (Regent instruments Inc, Quebec, Canada). Individual root systems and nodules were spread out on a clear tray in an isotonic solution of KCl 9 g.L⁻¹ and placed on a flat-bed scanner. Root length and nodule volume were measured using the WinRHIZO software.

II.3. Isotopic analysis

All organ dry matters were reduced to a fine powder for elemental and isotopic analyses. Total N and ¹⁵N were determined from 1mg plant material using an Eurovector N analyser linked to an isotope ratio mass spectrometer (GV instrument, Manchester, UK). The use of ¹⁵NO₃⁻ allowed the measurement of the relative contributions of N derived from the nutrient solution (N abs) and N derived from the atmosphere (N fix) using the equation :

$$N \text{ abs (mg)} = ({}^{15}\text{N atom\% excess clover} / {}^{15}\text{N atom\% excess nutrient solution}) \times Q_N \text{ (mg)}$$

Where Q_N is the amount of N per plant. A non-fixing plant, ryegrass, grown in the same conditions was used as a control to estimate atom% excess nutrient solution. The amount of N fixed was estimated as the difference between Q_N and N absorbed:

$$N \text{ fix (mg)} = Q_N \text{ (mg)} - N \text{ abs (mg)}.$$

II.4. Extraction and quantification of proteins from nodules

Total proteins were extracted from nodules using the method described by Wang *et al.* (2003). Frozen nodule samples were ground into a fine powder with a semi-automatic crusher in the presence of liquid nitrogen and re-suspended in 2 mL of cold acetone containing 10% TCA (w/v). After centrifugation at 16 000 g for 3 min at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended with 1.75 mL ammonium acetate (0.1M) / methanol (80%) buffer for precipitation of proteins. The extract was centrifuged at 16000 g (3 min, 4°C). The

pellet was washed with acetone (80%), and dried under vacuum (Speedvac concentrator 5301, Eppendorf, France) for 5 min at 50°C. The dried pellet was re-suspended with 0.8 mL of phenol (pH 7,9) and 0.8 mL of SDS buffer (30% saccharose (w/v), 2% SDS (w/v), 0.1 M Tris-HCl (w/v), 0.5% β -mercaptoéthanol (v/v), pH 8). After centrifugation (16 000 g, 3 min, 4°C), the phenolic phase was separated from the supernatant and precipitated with 2 mL ammonium acetate (0.1M) / methanol (80%) at -20°C for 10 minutes. After centrifugation (16 000 g, 10 min, 4°C), the pellet was washed with methanol (100%) and acetone (80%).

For SDS-PAGE, the pellet of protein was re-suspended in Laemmli lysis buffer (Laemmli, 1970) and denaturated for 5 min at 100°C with β -mercaptoethanol (5%, v/v). For two dimensional gel electrophoresis (2-DE), the protein extract was re-suspended in 100 μ L of R2D2 buffer described by Mechin *et al.* (2003) containing dithiothreitol (DTT, 20mM), thiourea (2M), urea (5M), CHAPS (2%, w/v), N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate (2%, w/v), TCEP (5mM), IPG buffer (2%, v/v; GE Healthcare, Saclay, France) and used for determination of protein concentration in nodule extract by the method of Bradford (1976). A standard curve was prepared by taking 0, 20, 40, 60, 80 μ L of bovine serum albumin (BSA) solution at 1.5g L⁻¹.

II.5. SDS PAGE and two dimensional electrophoresis (2-DE)

For SDS-PAGE, proteins were prepared in Laemmli lysis buffer (Laemmli, 1970) and denaturated 5 min at 100°C with β -mercaptoethanol (5%, v/v). For each S-treatment, equal amount of proteins (4 μ g for Nitrate silver coloration and 250 μ g for immunoblotting) loaded per lane and proteins were separated on 15 % polyacrylamide gel at a constant current (250V, 75mA, 1h). For 2-DE, the extract of total proteins was prepared in rehydration R2D2 buffer (300 μ g in 330 μ L) and was first separated according to charge in the electrofocusing PROTEAN IEF system (Bio-Rad), at 20°C, using 18-cm gel strips forming an immobilised linear pH gradient from 4 to 7 (GE Healthcare). Each strip was rehydrated at 50 μ A/gel for 14h. Isoelectric focusing ran for 15 min. at 250 V, 2h at 500 V, and then until 50 kV at 10 000V. After electrofocusing, the strips were immediately equilibrated in the equilibration buffer (75 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 300 mM Tris Base) containing DTT (65 mM) followed a second incubation in the equilibration buffer containing iodoacetamide (50 mM) and bromophenol blue (0.5%). Second dimension electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on 12 % polyacrylamide (w/v) gels (20 cm $\times$ 20 cm) using an Investigator system (Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France) at 300 mV. Proteins were visualized using the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987). Gels were scanned with the

ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) before image analysis. The Millipore BioImage computerized image analysis system (Millipore) was used to determine the molecular mass of nodule proteins by comparison with a set of protein molecular mass markers (Precision Protein Dual Color, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

II.6. Western blotting and immunodetection of Nitrogenase and Leghaemoglobin

The abundance of FeMoCo-Nitrogenase and Leghaemoglobin in nodules was determined after western blotting of total proteins separated by SDS-PAGE or 2-DE. After SDS-PAGE or 2-DE, western blots were carried out onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-PVDF, Millipore) by semidry electroblotting (Milli Blot-graphite electroblotter system, Millipore). Conditions for protein transfer and immunoblotting were carried out as previously described by Noquet *et al.* (2004). Briefly, after western blotting, PVDF membranes were treated with polyclonal anti-protein primary antibodies: anti-FeMoCo Nitrogenase from IgG antibodies (Agrisera, SE911 Vanâdas, Sweden; dilution 1:750) or anti-Leghaemoglobin 17kDa from soybean IgG antibodies (Goulas *et al.* (2001); dilution 1:750). The antigen-antibody complex was visualized with alkaline phosphatase linked to rabbit anti-chicken immunoglobulin Y (IgY), dilution 1:1000. The immunoblot signals were detected by using NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo 4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt) (Bio-Rad). Independently performed gels and western blots were scanned and analysed using the Millipore Bioimage computerized image analysis system to determine the molecular mass of proteins.

II.7. Protein identification by LC MS/MS

Protein spots of interest were manually excised from gel, washed several times with water and dried for a few minutes. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a H₂O/CH₃CN solution to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3% CH₃CN and 0.1% HCOOH in water. Peptides were enriched and separated using lab-on-a-chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on-line XCT mass spectrometer (Agilent). The fragmentation data were interpreted using the DataAnalysis program (version 3.4, Bruker Daltonic, Billerica, USA). For protein identification, tandem mass spectrometry peak lists were extracted and compared

with the protein database using the MASCOT Daemon (version 2.1.3 ; Matrix Science, London, UK) search engine. The searches were performed with no fixed modification and with variable modifications for oxidation of methionines, and with a maximum of one missed cleavage. Tandem mass spectrometry spectra were searched with a mass tolerance of 1.6 Da for precursor ions and 0.8 for MS/MS fragments.

The LC MS/MS data were converted into DTA-format files which were further searched for proteins with MASCOT Daemon. Only peptides matching an individual ion score > 51 were considered. Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence were automatically considered as a positive identification. Among the positive matches based on one unique peptide, the fragmentation spectrum from each peptide was manually interpreted using the conventional fragmentation rules. In particular, we looked for a succession of at least five *y*- and/or *b*-ions, specific immonium ions, specific fragment ions (proline and glycine), and signatures of any modifications carried by the peptides. Measured peptides were searched in the NCBI nr-protein sequence database *viridiplantae* (green plants).

II.8. Amino acid extraction and analysis

Frozen plant material was freeze-dried and amino acids were extracted from $10 \pm 5\%$ mg of milled plant material in 400 μ l of methanol containing 200 μ M DL-3-aminobutyric acid as an internal standard and samples were agitated at 1500 rpm for 15 min. Subsequently, 200 μ l of chloroform was added and samples were agitated for five additional minutes. Finally, 400 μ l of ultra-pure water was added and samples were then vigorously vortexed and centrifuged at 13 000 *g* for 5 min. The upper phase was transferred to a clean microtube and dried under *vacuum* over-night. Dry residues were resuspended in an appropriate volume of ultra-pure water and 10 μ l of the resulting extract was sampled for amino acids derivatization according to the AccQ Tag Ultra Derivatization Kit protocol (Waters corp., Milford, USA). Amino acids were analysed using an AcquityTM UPLC system (Waters corp., Milford, USA) by injecting 1 μ l of the derivatization mix onto an AcquityTM UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm column heated at 55°C. Amino acids were eluted at 0.7 ml.min⁻¹ flow with a mix of 10-fold diluted AccQ Tag Ultra Eluent (A) and acetonitrile (B) according to the following gradient : initial, 99.9 % A ; 0.54 min, 99.9 % A ; 6.50 min, 90.9 % A, curve 7 ; 8.50 min, 78.8 % A, curve 6 ; 8.90 min, 40.4 % A, curve 6 ; 9.50 min, 40.4 % A, curve 6 ; 9.60 min, 99.9 % A, curve 6 ; 10.10 min, 99.9 % A. Derivatized amino acids were detected at 260 nm using a photo diode array detector.

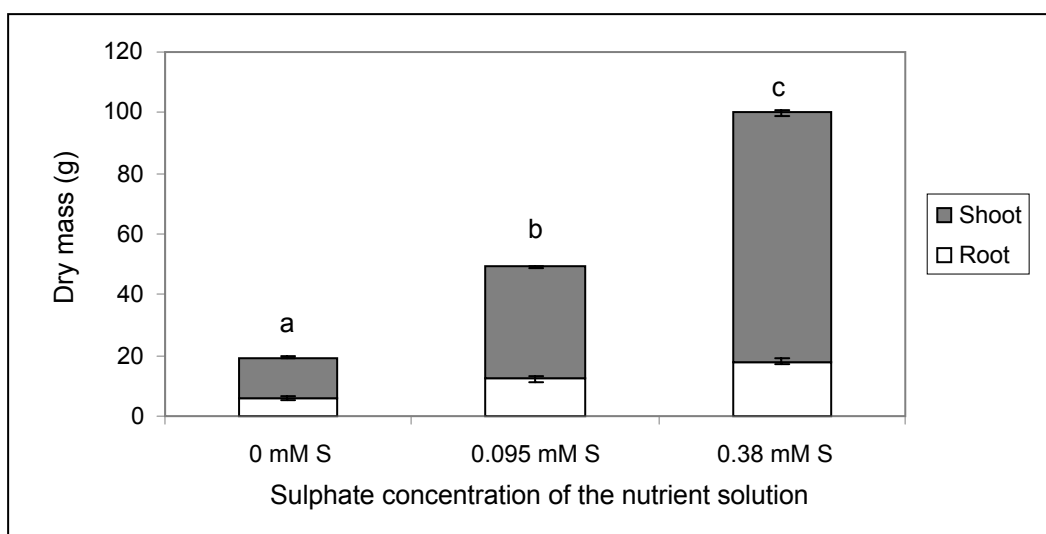


Figure II.1. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on shoot and root dry mass of 140-days old plants of white clover. Values are presented as means $\pm$ SE (n=5). Different letters on bars indicate significant differences of total dry mass between treatments ($p < 0.005$).

Table II.1. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on the amounts of N absorbed from the nutrient solution and N fixed from the atmosphere for 140-day old plants of white clover, expressed as total amount of N absorbed or fixed per plant or per unit length of roots. Values are presented as means (n=5). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

S concentration of the nutrient solution (mM)	N absorbed		N fixed	
	g.plant ⁻¹	g. m ⁻¹ roots	g.plant ⁻¹	g. m ⁻¹ roots
0 mM S	0.23a	0.30a	0.14a	0.18a
0.095 mM S	0.35b	0.22a	0.29b	0.19a
0.38 mM S	0.51c	0.44a	0.74c	0.94b

II.9. Statistical analysis

Five replicates per treatment were used. Because some data did not fit the parametric tests conditions, we choose to analyse the effect of S treatments by the Kruskal Wallis non parametric test (Sokal & Rohlf, 2003), and then by the signed-ranks test.

III. Results

III.1. Growth parameters

An increase S application noticeably increased the total biomass of plants grown for 140 days (Figure II.1; $H = 12.50$, $p < 0.01$). Even if this change was due to the increase of both shoots (stolons plus leaves) and nodulated roots, shoot biomass increased more than root biomass with S supply, and the highest S concentration in the nutrient solution doubled the shoot/root ratio compared with non-treated plants.

III.2. Nitrogen Acquisition

As expected, the amount of N per plant increased with increasing S supply (Table II.1). Both the amount of N absorbed from the nutrient solution ($H = 12.54$, $p < 0.01$) and the amount of N derived from nitrogen fixation ($H = 12.59$, $p < 0.01$) in the plants were significantly higher under the high S treatment. However, S supply appeared to have no significant effect on nitrate uptake when results are expressed per unit of root length. In contrast, S supply appeared to have a specific effect on N_2 fixation, as a higher amount of N fixed per meter of roots was observed for the high S treatment ($H = 9.50$, $p < 0.01$). Moreover, the percentage of N derived from fixation increased from 38 ± 2 % for plants grown in the absence of S to 59 ± 2 % of total nitrogen for the high S treatment, confirming that N_2 fixation is more dependant than N uptake on S nutrition.

III.3. Nodulation parameters

In order to clarify the ways that a S deficit diminishes atmospheric N_2 fixation, nodule morphological and biochemical traits were further investigated. A very strong effect of S nutrition on nodulation was observed. As Figure II.2A shows, a very small number of nodules were observed when plants were grown in the absence of S, and this number increased drastically with S treatment ($H = 12.50$, $p < 0.001$). A similar effect of S supply on nodule dry mass per plant ($H = 11.18$, $p < 0.05$) (data not shown) and nodule volume per plant ($H = 12.02$, $p < 0.05$) were observed (Figure II.2B), with these two parameters being closely correlated

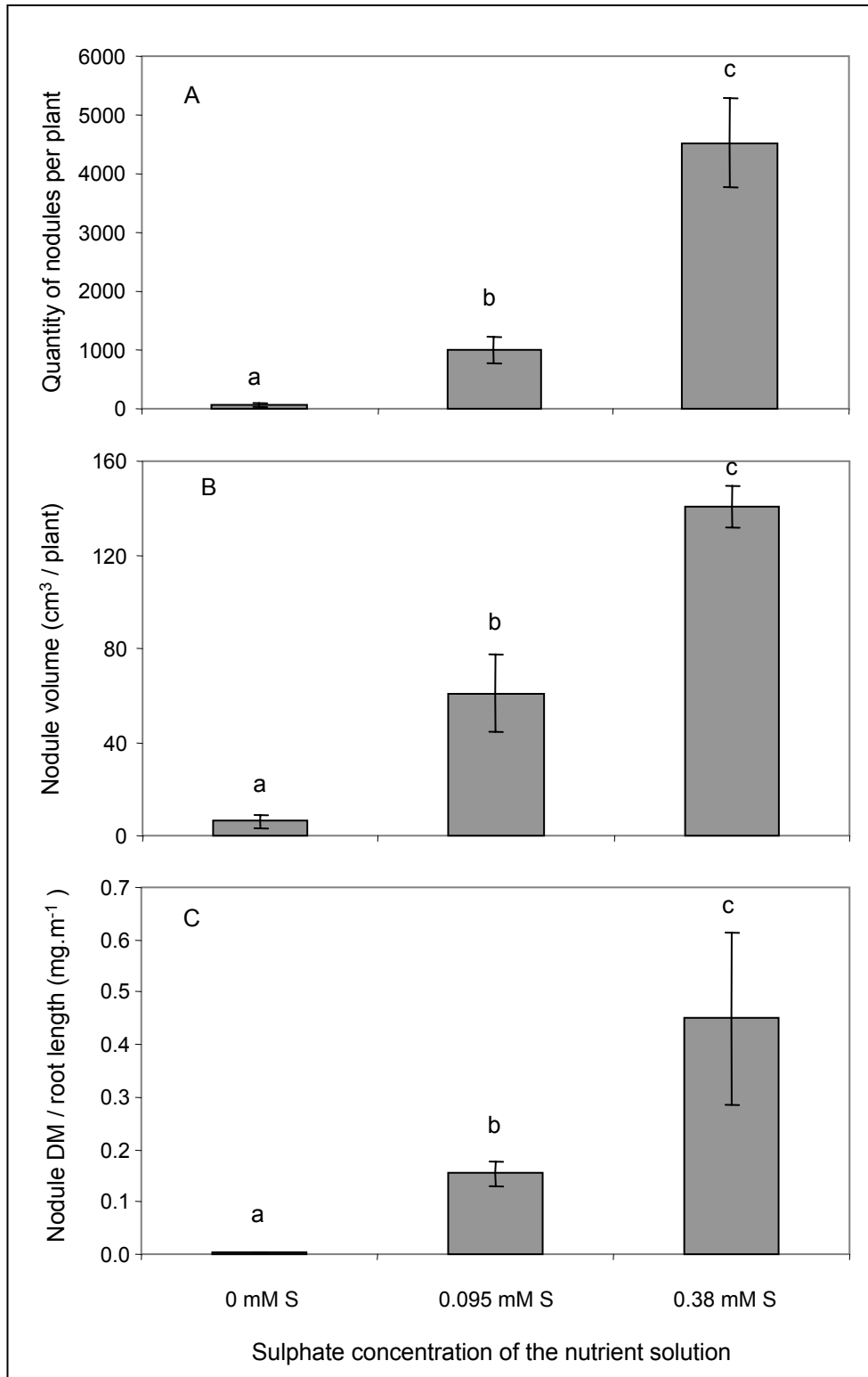


Figure II.2. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on nodules of 140-days old plants of white clover. A. Quantity of nodules per plant, B. Volume of nodules per plant, C. Dry mass (DM) of nodules per unit of root length. Values are presented as means $\pm$ SE (n=5). Different letters on bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

(Pearson correlation: $r = 0.893$, $p < 0.001$). S appeared to have a specific effect on nodulation as nodule dry mass increased strongly when expressed per unit of root length ($H = 12.02$, $p < 0.01$; Figure II.2C). Plants grown in the absence of S exhibited a very low nodule mass per root length and a higher nodule mass per root length was observed for white clover plants grown under the high S treatment. The nodules morphological parameters (Nodule DM / Root length; Total Nodule volume per plant) were correlated significantly with the percentage of N derived from fixation (Pearson correlation: $r = 0.714$, $p < 0.01$ and $r = 0.873$, $p < 0.05$, respectively). In addition, the nodules of plants grown in the absence of S appeared pale in contrast with the pink nodules observed in the presence of S.

III.4. Nodule proteins

Using 2-DE, immunological analysis 10 spots were immunodetected using anti-FeMoCo nitrogenase antibodies (Figure II.3A and II.3B). Identification of protein by LC MS/MS demonstrated that 5 of these proteins are nitrogenase Fe-Mo β chain (Spot 3 to 7) and one (Spot 10) is nitrogenase Fe protein (Figure II.3C).

Nodule protein content also increased with S supply ($H = 8.65$, $p < 0.01$, Figure II.4B). Both nitrogenase and leghaemoglobin were detectable in nodules of white clover grown in the absence and in the presence of sulphate in the nutrient solution (Figure II.4). Image analysis of SDS-PAGE electrophoresis of nodule soluble proteins (Figure II.4A) and comparison with data from immunoblots (Figure II.4C) indicated that the amount of both nitrogenase Fe-Mo protein and leghaemoglobin were dependant on S supply (Figure II.4B). Nodules of plants grown in the absence of S contained significantly less nitrogenase Fe-Mo protein ($H = 6.98$, $p < 0.05$) and less leghaemoglobin ($H = 10.39$, $p < 0.01$) than plants grown with the high S treatment. The lower nitrogenase Fe protein content was observed for the 0.095mM S treatment, the zero S treatment being intermediary between treatments.

III.5. Nodulated root amino acids

A strong accumulation of amino acids was observed in nodulated roots of white clover grown in the absence of S (Table II.2), as amino acid concentration in roots was 4-fold higher in the Zero S treatment than in High S treatment ($H = 12.02$, $p < 0.01$). A similar effect of S availability was observed in shoots (data not shown). Asparagine was the major amino acid found in white clover roots, its concentration in roots decreased with sulphate concentration in the nutrient solution ($H = 12.02$, $p < 0.01$) and its proportion increased from 71 ± 7 % for the highest S concentration in the nutrient solution to 85 ± 2 % of total free amino acids for the

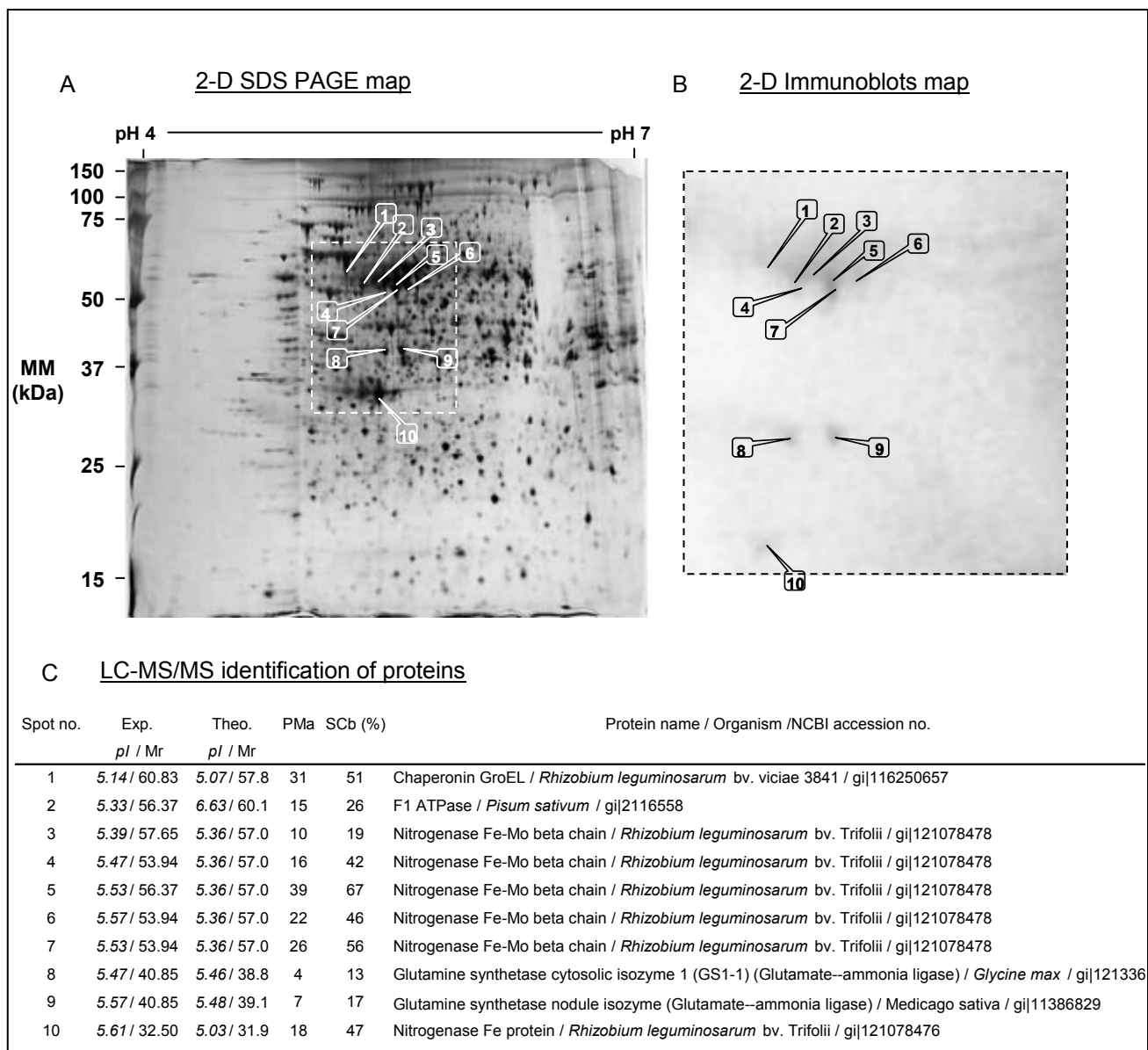


Figure II.3. Proteome maps of nodules proteins from *Trifolium repens* L.-*Rhizobium leguminosarium* bv trifolii T350 symbiosomes. (A) Nodules proteins were separated by 2-D SDS-PAGE (12% Acrylamide) and stained with silver nitrate. (B) Nodules proteins were revealed after immunoblot with anti NifH. Immunodetected spots are numbered from the higher to the lower molecular mass. (C) Identification of nodule proteins immunodetected by the anti- FeMoCo Nitrogenase antibodies. Experimental and theoretical *pI/Mr*, number of LC-MS/MS matched peptides, and the percentage of sequence coverage of the protein by matched peptides were also indicated. The assigned protein of the best matched is given with the organism in which it has been identified and its GenBank protein accession number. a PM, number of peptides matched; b % SC, percentage of sequence coverage.

Zero S roots. A strong accumulation of other N rich amino acids, arginine ($H= 12.02$, $p< 0.01$) and histidine ($H= 11.58$, $p< 0.01$), was also observed for Zero S roots, while the concentration of other amino acids like glutamate and aspartate was independent of S availability. Concentrations of sulphur amino acids, methionine and cysteine were too low in all treatments to be measured accurately.

IV. Discussion

The reduced plant growth observed here for white clover, following long-term S deficiency confirms the findings of previous studies showing that legume growth is highly dependant on sulphur nutrition (Scherer & Lange, 1996; Zhao *et al.*, 1999; Taliec *et al.*, 2008; Varin *et al.*, in press). This effect of S on clover growth was evidenced through the twofold increase of dry mass production of plants observed when the concentration of sulphate increase from 0mM to 0.095mM and then from 0.095mM to 0.380mM.

Work by Zhao *et al.* (1999) has shown that the effect of S deficiency on pea growth was likely to be caused by the shortage of N, due to decreased N_2 fixation. Accordingly, the effect of S deficiency on clover growth was associated with a strong effect on N acquisition through a reduction of both uptake of soluble N and fixation of atmospheric N. Previous work has demonstrated a decrease of nitrate uptake in sulphur starved barley (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991) and spinach (Prosser *et al.*, 2001). These studies have suggested that the reduction of N uptake was due to the strong accumulation of non S-amino acids. Such accumulation, observed in barley and spinach deprived of sulphate (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991; Prosser *et al.*, 2001), could explain the low nitrate uptake, as amino acids are involved in the down-regulation of N uptake (Beuve *et al.*, 2004). Accordingly, we also observed an accumulation of amino acids probably resulting from the disruption of protein synthesis following the decrease of S-amino acid content. The large proportions of N rich amino acids, asparagine and arginine, in the roots of S deficient clovers support this hypothesis. However, it is noticeable that when the results are expressed per unit of root length, no significant effect of S deficiency on nitrate uptake was observed. This result indicates that the reduction of nitrate uptake is mainly explained by the strong reduction of root length in the zero and low S treatments rather than a specific effect of S availability on soluble N uptake. However, amino acids accumulation observed in clover roots may have participated to the decrease of N_2 fixation as it has been demonstrated that asparagine

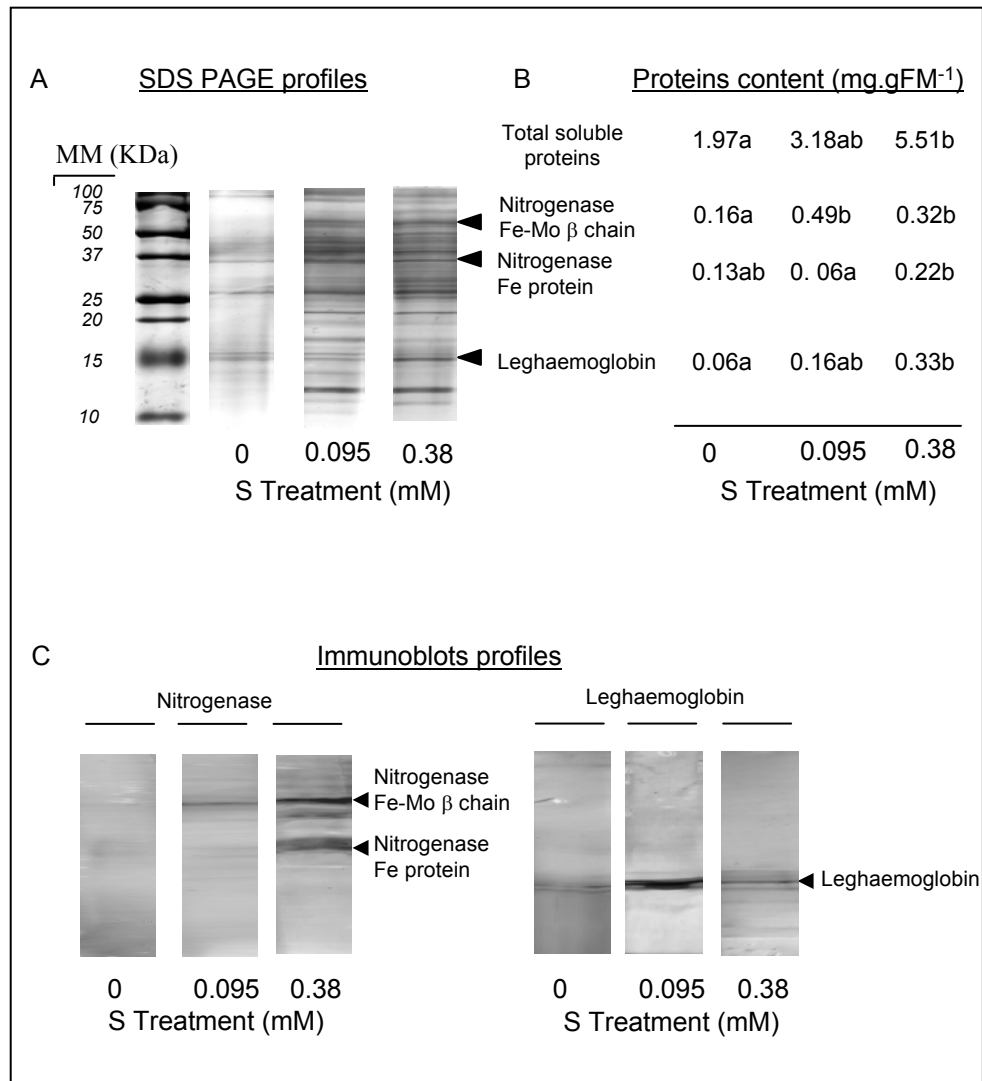


Figure II.4. A. SDS-PAGE profiles of protein in nodules of white clover grown with increasing sulphate concentration in the nutrient solution B. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on total soluble proteins, Nitrogenase and Leghaemoglobin obtained from image analysis of gels from 5 independent replicates C. Immunodetection of Nitrogenase NifH component and Leghaemoglobin following SDS-PAGE and western blotting of nodule extracts of white clover grown with increasing sulphate concentration in the nutrient solution. MM : Molecular markers (kDa). Different letters on bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

accumulation down-regulate also N₂ fixation for P-deficient white clover (Almeida *et al.*, 2000).

S deficiency had a stronger effect on the process of atmospheric N₂ fixation than on soluble N uptake, as evidenced by the lower proportion of N coming from fixation for clovers grown with the zero and low S treatment. This high sensitivity of N₂ fixation to S deficiency is now well established for other legumes (Scherer & Lange, 1996; Zhao *et al.*, 1999; Scherer *et al.*, 2008). Nutrient stress may limit N₂ fixation of legumes at four different levels: *Rhizobium* multiplication, rhizobial infection, nodulation and nitrogenase activity (Schubert, 1995). *Rhizobium* multiplication was not evaluated in this study, but the *Rhizobium* inoculum was added several times in the nutrient solution to maintain a non-limiting number of bacteria in the solution. Similarly, rhizobial infection was not specifically evaluated here but we observed a strong effect of S nutrition on symbiosis development through nodule formation.

Studies investigating red clover (Gilbert & Robson, 1984), alfalfa, pea and broad bean (Scherer & Lange, 1996) have established that low nodule production in S deficient plants can result of a low root length. In white clover, we observed a strong reduction of nodulation with the zero and low S treatments, resulting not only of a lower root length, but also of a much lower dry mass of nodules per unit of root length. This effect of S is in accordance with studies demonstrating the role of S in stimulating the formation of nodules in the early events of the symbiosis establishment (Schwedock & Long, 1992; Crockard *et al.*, 2002). This nodule response confirms the greater responsiveness of traits associated with biological N₂ fixation to S availability than that of host plant growth as observed by Zhao *et al.* (1999). In this respect, the effects of S deficiency appear similar to those of P deficiency in preventing totally nodulation in white clover (Almeida *et al.*, 2000).

The close relationship observed between nodule volume per plant and the percentage of N derived from fixation suggests that the low nitrogen fixation observed can be primarily explained by the low nodulation. However, our biochemical approach shows that nodule metabolism was also markedly dependant on S availability. It has been proposed that low N₂ fixation observed in S deficient legumes is due to a low ATP supply and to an inhibition of nitrogenase by high levels of free O₂ (Pacyna *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2008). ATP was not measured in the present study, but the low N₂ fixation could also be due to high level of O₂ in clover nodules. Indeed, we observed that leghemoglobin content in clover roots is highly

Table II.2. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on free amino acid concentration (expressed as $\mu\text{mol. g}^{-1}$ dry mass of nodulated roots of 140-d old white clover. Values are presented as means ($n=5$). Different letters indicate significant differences between treatments ($p<0.005$).

AA concentration ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	S concentration of the Nutrient solution		
	0 m M	0.095 mM	0.380 mM
Total AA	1230b	525a	301a
Asparagine	1055c	416b	221a
Arginine	103b	57a	30a
Histidine	10b	5a	3a
Aspartate	12a	11a	13a
Glutamate	10a	8a	8a
Glutamine	2a	2a	2a
Others	37a	27a	24a

dependant on S availability, confirming a recent result by Scherer *et al.* (2008) working with pea and alfalfa. As the role of leghemoglobin in legume nodules is to maintain a low free oxygen concentration within the nodule (Gordon *et al.*, 2001), the decrease of its content may have resulted in a higher oxygen concentration.

The immunological approach developed in this study provided further information concerning the mechanisms involved in reduction of nitrogenase activity in S deficient legumes. We found a close relationship between S supply and protein content in the nodules, and both the proteins measured, nitrogenase and leghemoglobin, were dependant on S supply. The effect of S availability on leghaemoglobin content of the nodules is in line with a recent report showing an effect of S availability on leghaemoglobin content of pea and alfalfa nodules (Scherer *et al.*, 2008). Similarly, because both components of the nitrogenase metalloenzyme complex, the Fe protein and the Fe-Mo protein, contain high proportions of S (Krusel *et al.*, 2005; Curatti *et al.*, 2006), the effect of S availability on Nitrogenase content was expected. However, the differentiated behaviour of both nitrogenase components with respect to S availability makes the relation between S availability and nitrogenase difficult to interpret. It is noteworthy that nodulated clovers grown in the absence of S in the nutrient solution were able to form both components of the nitrogenase complex.

Even though nodulation and Fe-Mo nitrogenase content were very low under S deficiency, 38 % of the total N assimilated by these plants originated from N₂ fixation. Thus, it must be noted that S deficiency inhibited nodulation to a greater extent than N₂ fixation. Specific Nitrogenase activity was not measured directly in the present study, and it is difficult to estimate this activity expressed on a quantity, volume or mass of nodules basis as we do not know neither the kinetics of fixation nor those of nodules development. Nevertheless, this comparison suggests that S deficiency could increase the specific nitrogenase activity expressed per g of nodule. Similar increase in specific nitrogenase activity has been found under other conditions that hindered the development of nodules such as under P deficiency (Almeida *et al.*, 2000) or high mineral N supply (Zanetti *et al.*, 1998). In the case of P deficiency, it has been proposed that this high specific nitrogenase activity could be the result of an increase in O₂ permeability, but there is a lack of information concerning the effect of S deficiency on O₂ permeability in the nodules of S deficient legumes.

The hydroponic system used here gave us the opportunity to grow plants in the total absence of S. We observed that white clover can grow hydroponically without S added to the nutrient solution, as observed in the Zero S treatment. As it is highly unlikely that the amount of S contained in each plant at the beginning of the experiment (67 µg) was sufficient to

support plant growth for 140 days, this result suggests that clover is able to use atmospheric sulphur as a significant source of S to support growth. Atmospheric S (particularly sulphur dioxide and hydrogen sulphur), can replace soil sulphate as the sulphur source for other plant species especially when the sulphur supply to the roots is low (Cowling *et al.*, 1973; Van Der Kooij *et al.*, 1997). The metabolic pathways are now well characterised (De Kok *et al.*, 2007) but the contribution of foliar uptake of sulphur gases to legume S nutrition needs to be further evaluated.

From our experimental data, we propose that symbiotic N₂ fixation is decreased by S deficiency in white clover as a direct consequence of decreased nodule development, but also because of decreased nitrogenase and leghemoglobin production and amino acid accumulation.

Acknowledgments

We are grateful to Anne Françoise Ameline, Marie-Paule Bataillé, Michelle Coustenoble, Josiane Pichon, Dominique Ballois, Patrick Beauclair, and Raphaël Ségura for technical assistance. We wish to acknowledge Jessica Bryant for improvement of the English text.

Chapitre :

3

Does the white clover response to sulphur availability correspond to phenotypic or ontogenetic plasticity?

CHAPITRE III

-

Does the white clover response to sulphur availability correspond to phenotypic or ontogenetic plasticity?

(Article 3)

Sébastien VARIN ^a, Benjamin LEVEEL^a, Servane LEMAUVIEL-LAVENANT ^a, Jean-Bernard CLIQUET ^b

Article accepté en 2009 dans *Acta Oecologica*.

^aUniversité de Caen, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutritions NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

^bINRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutritions NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

Running title: White clover plasticity in response to S availability

Keywords: Phenotypic plasticity - Ontogenetic plasticity - RGR - N₂ fixation - Grassland

Préambule

Les deux chapitres précédents ont mis en évidence une plasticité importante du trèfle blanc face à des variations en soufre disponible. Il nous paraissait important de préciser si cette plasticité correspondait réellement à une plasticité phénotypique ou s'il s'agissait d'un décalage de croissance. Cette troisième partie répond à la question suivante : **Le soufre stimule-t-il la production de biomasse ou accélère-t-il la croissance ?**

Pour cette expérimentation, nous avons utilisé des trèfles de la variété Huia, largement utilisées dans les semis en agriculture. Ces trèfles ont été cultivés dans un système hydroponique en chambre de culture. Trois concentrations en SO_4^{2-} , « Low S » (0,009mM), « Medium S » (0,384mM) et « High S » (1,509 mM) ont été appliquées.

D'après la mesure de production de biomasse en fonction du temps pour chaque traitement en S, une analyse de croissance a été réalisée par : i) des courbes de régression de la croissance et ii) par le calcul du Relative Growth Rate (RGR). Le pourcentage de fixation du N_2 en fonctions des différentes disponibilités en S du substrat a été quantifié par la méthode de dilution du $^{15}\text{NO}_3^-$ apporté dans les solutions nutritives au cours de la culture.

Cet article a été accepté dans la revue *Acta Oecologica* en Janvier 2009.

Abstract

White clover (*Trifolium repens* L.) is a key species in grasslands. Its performance in grassland communities is strongly linked to nitrogen (N) availability. A decrease in soil sulphur (S) content has appeared in the last few decades in grasslands in Northern Europe and this could change the behaviour of white clover. S is essential for plants and particularly for legumes through its effect upon nitrogen fixation. The aim of this study was to determine the effects of S deficiency on white clover fitness, analysing its plasticity in a time course of growth.

Three concentrations of SO_4^{2-} , “Low S” (0.009mM), “Medium S” (0.384mM) and “High S” (1.509mM), were used to grow plants in a hydroponic system. S availability modified biomasses significantly only at the end of experiment (11 weeks). Medium S appeared optimal while Low S induced a lower aboveground dry mass. An appropriate S availability (Medium S) not only increased S content but also increased N content by stimulating N_2 fixation. Plant growth analysis using growth fitted curves and the calculation of RGR revealed that S effects on biomass corresponded to the production of different phenotypes and not to a growth delay.

This work shows that the acceleration growth phase (49-56 days) is a key period for the nutritional needs of white clover and should be the best period for a sulphur fertilisation regime that aims to enhance white clover fitness.

I. Introduction

White clover (*Trifolium repens* L.) is a key grassland species because of its ability to fix atmospheric N₂. Naturally present in permanent herbage, it is also sown in mixed cropping systems so as to enrich soil with nitrogen and to avoid the use of nitrogen fertilisers, which can become pollutants when applied in high amounts and then leached. Mineral N content in soil is well known for regulating competition between clover and grasses, with N fertilisation giving advantage to grasses (Murphy & Quirke, 1997; Simon *et al.*, 1997; Mosquera-Losada *et al.*, 2004). Work with clover suggests that this legume is also sensitive to S fertilisation (Scherer & Lange, 1996; Tallec *et al.*, 2008), and recent changes in S content of soils could change white clover abundance in grasslands.

For a long time, SO₂ and H₂S atmospheric pollution released by burning sulphur-containing fossil fuels has compensated for harvest exports of S from cultivated soils (De Kok, 1990; Scherer, 2001). During the last three decades, atmospheric sulphur (S) deposition levels have fallen drastically due to pollution control (Ceccotti & Messick, 1997; Scherer, 2001). This has induced a soil S impoverishment in Northern Europe (Scherer, 2001). Grassland herbage are rarely fertilised with S and S deficiencies begin to appear (Murphy & Boggan, 1988; Morton *et al.*, 1999; Mathot *et al.*, 2008).

S is essential for white clover, as for other plants (Saito, 2004). N₂ fixing plants appear to be particularly sensitive to S deficiency (Walker *et al.*, 1956; Scherer & Lange, 1996; Krusell *et al.*, 2005) through a S effect upon symbiotic nitrogen fixation (Scherer & Lange, 1996; Varin *et al.*, in press). However, it is not known if S deficiency induces a growth delay or a lower production, nor is it known when S has the biggest effect on production in white clover production.

Wright and McConnaughay (2002) distinguished two components from plasticity: a phenotypic plasticity and an ontogenetic one. A phenotypic plasticity (Bradshaw, 1965; Schlichting, 2002; Pigliucci *et al.*, 2006) in response to sulphur availability in soil would correspond to the production of plants with various modalities of functional traits, while ontogenetic plasticity would reveal variations in plant functional traits during plant development (Wright & McConnaughay, 2002), and could indicate a growth delay. To analyse both plasticity components, the response of white clover to sulphur availability was evaluated by studying its performance along a nutrient gradient in a time course of the growth process. Among the functional traits (Violle *et al.*, 2007) measured, particular attention was paid to the function of nitrogen acquisition, and N₂ fixation was estimated by the ¹⁵N isotope

dilution method. Plant growth analysis was approached by two methods, growth fitted curves as well as the calculation of RGR (Relative Growth Rate). This last trait is considered to be a central growth parameter (Hoffmann & Poorter, 2002; Hunt *et al.*, 2002) and a major trait that describes plant strategies (Grime & Hunt, 1975; Garnier, 1992; Meziane & Shipley, 1999; Grime, 2001).

The aim of this study was to determine the effects of sulphur deficiency *versus* optimum S supply on white clover fitness, analysing the plasticity of clover along a time course of growth. Two questions were addressed (1) Do morphological and physiological variations of white clover in response to different sulphur availabilities correspond to a phenotypic or to an ontogenetic plasticity? (2) At which stage of growth does sulphur induce the highest plasticity of white clover?

II. Materials and methods

II.1. Plant material and growth conditions

Trifolium repens L. bv Huia is a white clover cultivar largely sown in grasslands of northern Europe. After germination in perlite soaked with demineralised water, seedlings were grown in a hydroponic system in a growth room (16h day / 8h night; 21°C; relative humidity: 60%). Light was provided by 400W high pressure sodium lamps (300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ photosynthetic active photons). Nodulation was encouraged by inoculation, during the first three weeks of the experiment, with *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii T354 grown in a Wright's solution.

Nutrient solutions, derived from Kalia and Drevon (1985) contained 0.18mM CaCO_3 , 0.4mM KH_2PO_4 , 0.15mM K_2HPO_4 , 3mM CaCl_2 , 0.2mM EDTA 2NaFe ($3\text{H}_2\text{O}$), 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 (H_2O), 3 μM ZnSO_4 ($7\text{H}_2\text{O}$), 0.7 μM CuSO_4 ($5\text{H}_2\text{O}$), 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 . They also contained 1mM K^{15}NO_3 0.5 atom excess % allowing the estimation of the proportion of N coming from fixation. Three concentrations of sulphate supplied as MgSO_4 and K_2SO_4 were chosen for this study. The first (High S) corresponded to the Kalia and Drevon (1989) concentration (1.5mM of sulphate), which is quite high. For the second (Medium S), sulphate concentration was reduced by 4 fold (0.375mM of sulphate), and for the third (Low S), MgSO_4 and K_2SO_4 were omitted from the medium. Because some micronutrients were supplied in the nutrient solution as sulphate salts, all nutrient solutions contained 0.009mM sulphate. Mg and K were partly or entirely replaced by equimolar amounts of MgCl_2 and KCl for low and medium S treatments. Nutrient solutions were

replaced every week. During the experiment, the nutrient solutions were analysed so as to follow sulphate, nitrate and phosphate, and to make sure that nitrate and phosphate were still available. The experiment was organised in a completely randomised design with four replicates which consisted of 20L trays for each S level. At the beginning of the experiment, each tray contained 12 plants. One plant of each tray was randomly taken at each of the 12 harvest times, so that the nutrient solution volume for each individual was increased during the experiment period.

II.2. Plant trait measurements

Every week, 4 plants corresponding to 4 replicates were harvested for each treatment. Each plant was separated into laminas, petioles, stolons and inflorescences when present. Leaf lamina area was measured with an area meter (LI-COR LI-3100). Tissues were dried at 60°C and weighed when mass was constant. All plant organs were analysed with an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Isoprime, G V instrument), which provided measurements of total S, total N and ^{15}N . ^{15}N atom excess % was used to measure the amount of N coming from the nutrient solution and the amount of N coming from atmospheric N_2 fixation.

RGR and the three growth components, NAR (Net Assimilation Rate), SLA (Specific Leaf Area) and LMR (Leaf Mass Ratio) were estimated and related in the following way:

$$\underbrace{(1/M)(dM/dt)}_{\text{RGR}} = \underbrace{(1/L_A)(dM/dt)}_{\text{NAR}} \times \underbrace{L_A / L_M}_{\text{SLA}} \times \underbrace{L_M / M}_{\text{LMR}} \quad (1)$$

where t is time, M is the mass of the whole plant, L_A is total leaf area per plant and L_M is total leaf dry mass per plant. In order to estimate RGR without using the pairing of plants across the harvest-interval, we used the calculation developed by Hunt *et al.* (2002) and Hoffmann and Poorter (2002) from the usual formula by Fisher (1921):

$$\text{RGR} = (\log_e M_2 - \overline{\log_e M_1}) / (t_2 - t_1) \quad (2)$$

NAR was deduced from equation (1):

$$\text{NAR} = \text{RGR} / (\text{LMR} \times \text{SLA}) \quad (3)$$

Table III.1. Effects of sulphur availability on the biomass (DM: Dry Mass) of white clover components for each growth period. H values of the Kruskal - Wallis test are given (ns: not significant, * : $p < 0.05$).

Harvest (days)	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77
Plant DM	0,62 ns	2,15 ns	1,88 ns	0,35 ns	4,19 ns	3,39 ns	1,33 ns	0,2 ns	4,71 ns	6,50 *
Leaf DM	0,81 ns	0,46 ns	1,42 ns	1,04 ns	5,12 ns	2,60 ns	2,96 ns	0,70 ns	4,71 ns	6,50 *
Stolon DM	1,92 ns	2,51 ns	0,46 ns	1,08 ns	2,58 ns	1,91 ns	0,33 ns	1,18 ns	3,75 ns	7,65 *
Underground DM	1,15 ns	5,35 ns	1,88 ns	0,73 ns	2,19 ns	3,93 ns	1,51 ns	1,31 ns	0,75 ns	4,27 ns

(ns : non significant, * : $p < 0,05$)

Table III.2. Pearson product-moment correlation coefficients (***) : $p < 0.001$) between white clover components dry masses (DM : Dry Mass).

Pearson correlation	Plant DM	Leaf DM	Stolon DM
Leaf DM	0,998 ***		
Stolon DM	0,993 ***	0,987 ***	
Underground DM	0,990 ***	0,984 ***	0,977 ***

(*** : $p < 0,001$)

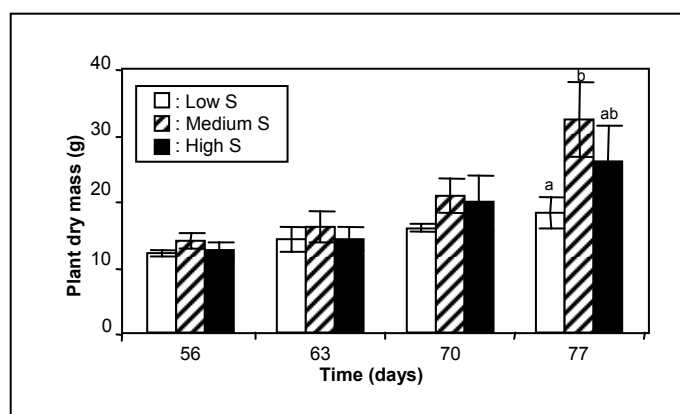


Figure III.1. Variation of plant dry mass (means and standard errors ($n=4$)) in the last four harvests, for the three sulphur availability levels. Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest ($p < 0.05$).

II.3. Data analysis

The growth kinetics of white clover were analysed by performing regression analysis of biomasses.

At each harvest time, because some data did not fit the parametric test conditions, we chose to analyse the effect of S treatments by the test of Kruskal Wallis which is a non parametric analysis of variance (Sokal & Rohlf, 2003), and then by the signed-ranks test.

The dry matter correlation analyses of different organs were performed using Pearson product-moment correlation coefficients. The interrelation of RGR with its relative components was established by performing regression analysis. All analyses were carried out using the statistical software MINITAB 13 for Windows.

III. Results

III.1. S availability effect on performance

Sulphur effects on biomasses became significant only at the end of the experiment (Table III.1). Biomasses of all components were highly correlated (Table III.2) and varied significantly with treatments for 77 days of experiment except for underground biomass (Table III.1). Above ground dry masses were very low during the first 7 harvests, with no significant differences between treatments, therefore, only the last 4 harvests are presented in Figure 1. Among the three tested treatments, and at the end of experiment, “Medium S” appeared optimal; “Low S” induced a lower aboveground dry mass and “High S” led to an intermediate biomass between the two other treatments and did not differ significantly from them (Figure III.1). “Low S” seemed to induce deficiencies. As “Medium S” appeared optimal, S was in excess in the “High S” treatment. Even if effects were significant only at the end of the experiment, they appeared progressively and white clover plants cultivated on “Medium S” began to present a higher biomass after 56 days (Figure. III.1).

III.2. S availability effect on S and N acquisition

The N/S ratio depended significantly on S availability at the end of experiment (77 days: $H=6.05$, $p<0.05$) (Figure III.2a). This atom ratio approached 20 for “Medium S” and “High S”, and increased to about 40 for “Low S”. Increasing S availability from the low to the medium treatment more than doubled the S mass in white clover after 77 days of the experiment (77 days: $H=8.00$, $p<0.05$) (Figure III.2b). Similarly, S availability increased S

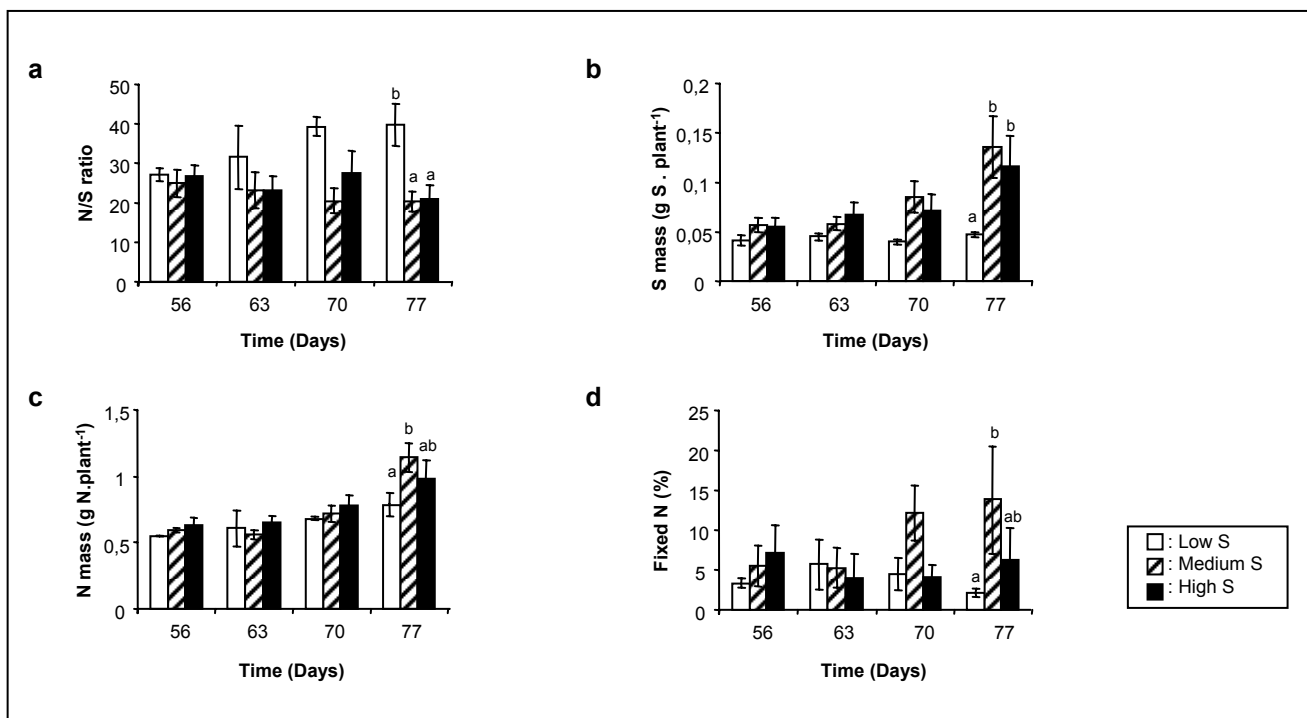


Figure III.2. Variation of (a) N/S atom ratio, (b) S mass, (c) S content in roots, (d) S content in shoots, (e) N mass and (f) the proportion (%) of N fixed from day 56 to the end of the experiment, for the three sulphur availability levels. Values are mean and standard errors (n=4). Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest ($p < 0.05$).

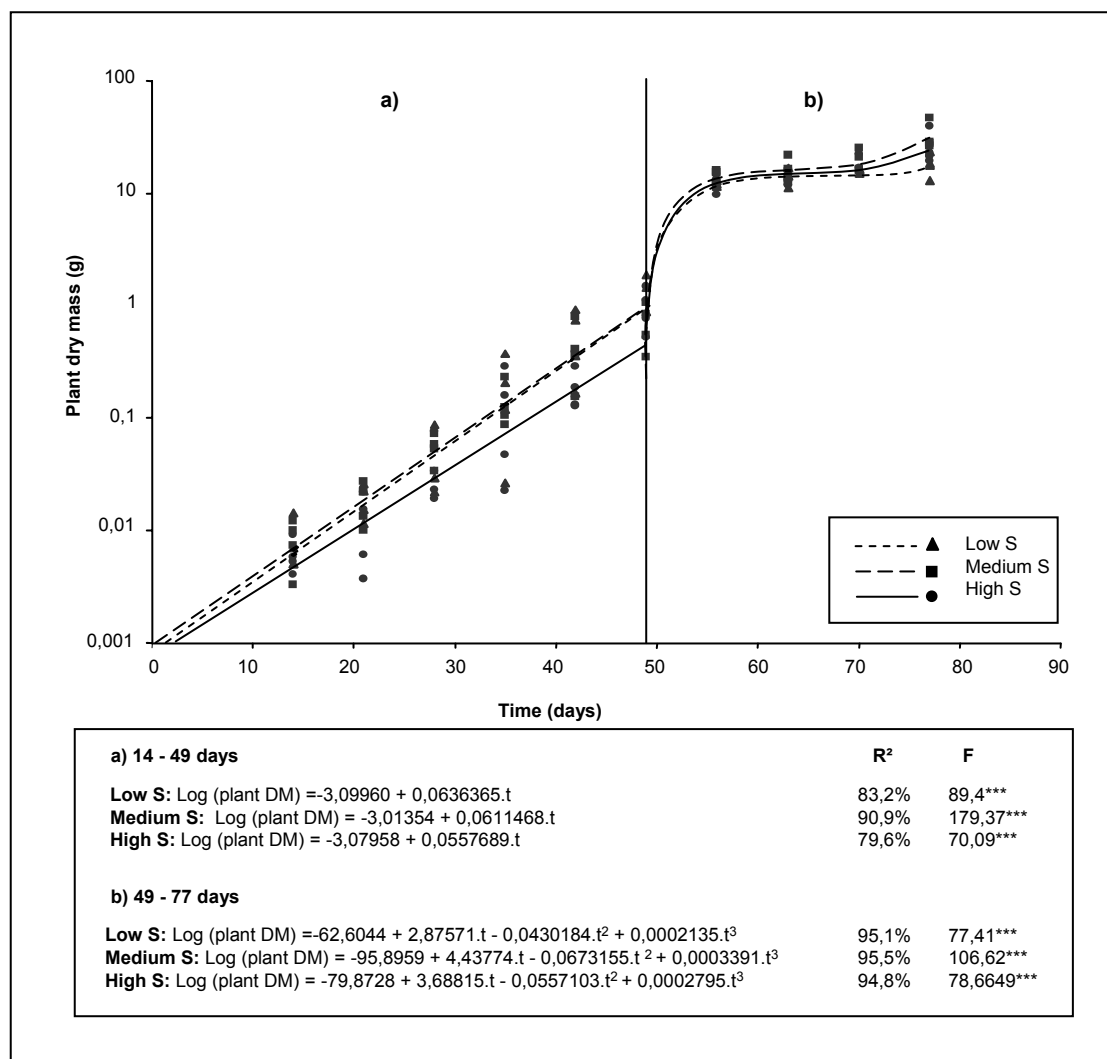


Figure III.3. Regression models of white clover growth (DM: dry mass = $f(t: \text{time})$), segmented in two parts (a and b) for the three sulphur availability levels. Plant dry mass is expressed on a logarithmic scale. (***) : $p < 0.001$.

content at 77 days in both roots ($H=6.73$, $p<0.05$) (Figure III.2c) and shoots ($H=6.73$, $p<0.05$) (Figure III.2d). S availability also modified N mass at the end of the experiment (77 days: $H=6.04$, $p<0.05$) (Figure III.2e). The medium S treatment produced a higher N mass than the low S treatment, while the High S treatment induced an intermediate N mass. This higher N mass appeared to result from a stimulation of N_2 fixation by S, as the “Medium S” treatment strongly increased the percentage of N derived from fixation compared with the “Low S” treatment (77 days : $H=6.04$, $p<0.5$) (Figure III.2f).

III.3. Phenotypic or ontogenetic plasticity ?

Growth was separated in two phases so as to perform curve fitting. At first, white clover growth curves up to 49 days corresponded to the classical plant growth curve and the logarithm of biomass varied linearly with time (Figure III.3). Then, after 49 days, growth curves did not correspond to an exponential model, probably because this period corresponded to stolon development, and each plant grew along multiple axes. From 49 days to the end of the experiment a second model corresponded to a polynomial regression of degree three of the logarithm of biomass (Figure III.3). The transition from fast growth (49-56 days) to slower growth (56 days to the end) could correspond to a phenological change from a vegetative to a generative phase as flowering began between 56 to 63 days. No delay appeared between the three curves corresponding to the three treatments (Figure III.3). Growing phases did not appear to depend on sulphate concentration of the nutrient solution. This is particularly clear at 49 days between the two curve models when growth accelerated simultaneously for the three treatments.

This absence of a growth delay is confirmed by the study of growth parameters. RGR varied with time for the three treatments (“Low S”: $H=27.78$, $p<0.01$; “Medium S”: $H=25.76$, $p<0.01$; “High S”: $H=22.81$, $p<0.01$). It increased until 56 days and then decreased (Figure III.4). The 49 to 56 days stage corresponded to the highest RGR value for the three treatments ($p<0.05$). S availability modified RGR in the middle of the experiment (42-49 days: $H=6.55$, $p<0.05$; 49-56 days: $H=8.91$, $p<0.05$). Between 42 and 49 days, the “High S” treatment led to a higher RGR than “Medium S”, with “Low S” being intermediate. Then from 49 to 56 days, when RGR was the highest for the three treatments, “Medium S” led to a higher value than “High S” and then “Low S”. This acceleration growth phase (49-56 days) corresponding to the biggest RGR for the three treatments seems to be a key time for nutrient needs as well as the beginning of a sulphur availability effect. No treatment effect was observed at any stage of growth on SLA or LMR, but NAR varied with treatment between 42 to 49 days ($H=6.71$,

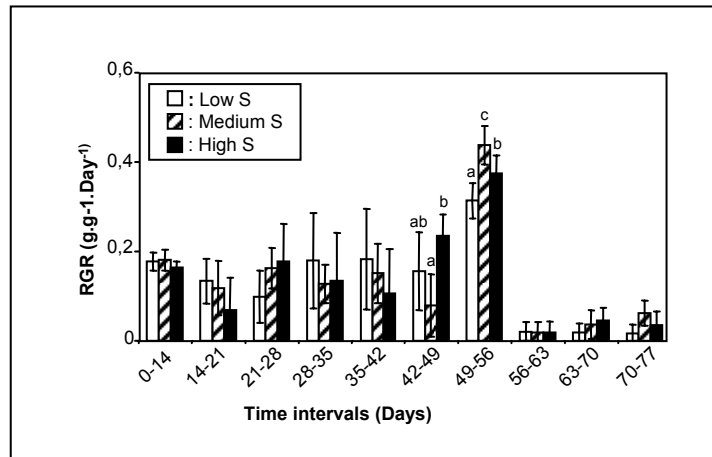


Figure III.4. Variation of RGR (Relative Growth Rate) for the three sulphur availability levels (means and standard errors (n=4)). Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest (p<0.05).

$p < 0.05$) in the same way as RGR. Plant growth was strongly associated with NAR ($\text{RGR} = 0.08 + 22.59 \cdot \text{NAR}$, $R^2 = 61.2\%$, $p < 0.001$), but no linear relation can be significantly established between RGR and LMR or SLA.

IV. Discussion

White clover response to various S levels was examined in the present study by monitoring the fitness of plants germinated from seeds of the cultivar “Huia”. This choice was made so as to keep close to field conditions, but the genetic variability induced big variations that complicated the interpretation of sulphur effects. Despite this high variability, this experiment shows that sulphur availability modifies white clover growth. This S effect is progressive on plant dry mass but was significant only at the end of the experiment. This work also shows that a very low S availability, inducing S deficiency, can inhibit plant growth.

White clover grown hydroponically with the low S treatment applied in these experiments showed a shoot S content close to that obtained for other legumes such as pea grown in soil (Zhao *et al.*, 1999), and Lucerne grown in soil for one year followed by nutrient culture (De Boer & Duke, 1982). However, white clover grown with the medium and high treatments contained more S. Confirming the results of Scherer *et al.* (2008) with pea and lucerne, we observed higher S concentrations in roots than in shoots, probably reflecting the high S demand for the functioning of nodules (Zhao *et al.*, 1999; Scherer *et al.*, 2008). Both the higher S mass and the higher N mass were observed for the optimal S treatment (medium), confirming the strong link between S availability and N acquisition in legumes (Scherer, 2001). In accordance with data obtained for other legumes (De Boer & Duke, 1982; Scherer & Lange, 1996; Zhao *et al.*, 1999), we observed that good S availability increased N acquisition mainly by stimulating N fixation. N and S are generally accumulated in proportions similar to those incorporated into proteins and an appropriate S nutrition allows protein synthesis. When S is missing, free amino acids accumulate (Dijkshoorn & Van Wijk, 1967; Aulakh & Arora, 1976; Karmoker *et al.*, 1991) and can down-regulate N fixation as shown for lupin and soybean (Neo & Layzell, 1997). From the “Medium S” treatment to the “Low S”, the N/S ratio increased from 20 to 40 and the decrease in N fixation could be explained by amino acid accumulation. Work with other legumes has shown that S can stimulate nodule formation or nitrogenase activity (Scherer & Lange, 1996), and more attention should be paid to clarify the effect of S on N_2 fixation in the case of clover.

Wright and McConnaughay (2002) suggested that plasticity induced by change in environmental factors could correspond either to phenotypic plasticity or to ontogenetic plasticity resulting in a growth delay. To identify which kind of plasticity was induced by sulphur availability we chose to fit data with polynomial functions with the log-transformed plant mass as the dependent variable and time as the independent variable. Such a functional approach to plant growth analysis is known to provide a clear perception of ontogenetic drift (Poorter, 1989). Growth was separated into two phases so as to perform curve fitting: a polynomial of degree one was fitted up to 49 days, and after 49 days, growth corresponded to a polynomial of degree three of the logarithm. Such a growth analysis method involves subjectivity of the choice of the curve model (Shipley & Hunt, 1996). However, model curves of the three treatments were the same and demonstrated no evidence of a growth delay induced by S treatments. This suggests that the S effect on white clover performances corresponds mainly to a phenotypic plasticity.

We also observed clearly that S deficiency induced a decrease in growth rate. We used a classical RGR estimator across one harvest interval, applying the formula recommended by Hoffmann and Poorter (2002) and Hunt *et al.* (2002), which has the advantage of producing an unbiased estimate of RGR under all conditions (Hoffmann & Poorter, 2002). Analysis of RGR confirms that S deficiency does not induce growth delay in white clover, as the acceleration phase occurred between 49 and 56 days for all treatments. Seedling growth was independent of sulphur availability during the first six weeks. The seedling RGR is nearly fixed at the beginning of plant development and this trait is usually used to compare different species characterised by different strategies (Grime & Hunt, 1975; Grime *et al.*, 1988; Grime, 2001). Then, during plant development, nutrient availability modifies growth rate. The higher RGR was observed for the “High S” treatment between 42 and 49 days and for the “Medium S” treatment between 49 and 56 days, i.e. during the acceleration phase. This growth phase is a key moment for the nutritional needs of white clover and this period should be the best time for sulphur fertilisation with the view to enhancing white clover fitness.

Many authors have addressed the question of the relationship between RGR changes with nutrient limitation and its components: NAR, SLA and LMR (Meziane & Shipley, 1999; Elberse *et al.*, 2003; Portsmouth & Niinemets, 2007). These components can act in a compensatory fashion to buffer changes in seedling RGR as the environment changes (Meziane & Shipley, 1999). No compensatory trade-offs linked to the variation in S are suggested by the present study because the only growth component altered by S availability is NAR. From a compilation of many data, Shipley (2006) found that NAR is the best general

predictor of variation in RGR. We found a link between RGR and NAR and would like to stress that the effect of S on growth here is linked mainly to the physiological component of growth and not to the morphological component as indicated by LAR or LMR variations.

V. Conclusion

S deficiency reduces white clover growth notably by reducing N₂ fixation. Monitoring plant traits during growth has allowed us, firstly, to show that S effects did not correspond to a growth delay but did correspond to real differences in phenotypic expression and secondly, that the acceleration growth phase (49-56 days) is a key period for the nutritional needs of white clover. This period should be the best one for sulphur fertilisation in grassland fields so as to enhance white clover fitness and then promote its maintenance in grassland mixtures.

Acknowledgments

We wish to acknowledge Marie-Paule Bataillé and Raphaël Ségura for technical assistance in isotopic analysis as well as Laurence Cantrill for improvement of the English text. We are grateful to the referees and the editor for their helpful and constructive comments.

Chapitre :

4

Use of a ^{34}S dilution method to study the contribution of foliar deposition of atmospheric S to S nutrition in white clover.

CHAPITRE IV

-

Use of a ^{34}S dilution method to study the contribution of foliar deposition of atmospheric S to S nutrition in white clover.

(Article 4)

Sébastien VARIN, Servane LEMAUVIEL-LAVENANT ¹, Jean-Bernard CLIQUET

L'article sera soumis prochainement à *New Phytologist*.

¹INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutriments NCS, INRA / Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen, France

Keywords: Sulphate uptake – S deposition – S foliar uptake – Plasticity – S deficiency

Préambule

L'analyse bibliographique relate que les plantes puisent l'essentiel de leur soufre sous forme de sulfate dans le sol, mais peuvent également utiliser le soufre atmosphérique par l'intervention de dépôts de S foliaires.

Dans cette expérimentation, l'objectif était de répondre à la question suivante : **Le trèfle peut-il compenser une faible disponibilité en S du substrat par le dépôt de S foliaire ?**

Ce travail a été couplé à celui du second chapitre des résultats dans une expérimentation commune basée sur une culture hydroponique de clones d'un génotype de trèfle de la variété Huia. Pour cela, trois concentrations en SO_4^{2-} de la solution nutritive, 0, 0,095mM et 0,380 mM de SO_4^{2-} , ont été employées. La quantification du sulfate absorbé à partir de la solution nutritive et du soufre déposé sur les feuilles est réalisée par une méthode analogue à celle qui existe pour mesurer l'absorption de l'N soluble et la fixation de l'N atmosphérique, grâce à l'utilisation de $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ apporté dans la solution nutritive.

Cette expérimentation a permis la rédaction d'une publication qui sera soumise au mois de Février 2009 dans la revue *New Phytologist*.

Abstract

The investigation of atmospheric sulphur deposition in plants has so far been hampered by a lack of adequate methods to quantify the respective contributions of sulphate uptake and atmospheric S deposition in plant growth.

In order to overcome this limitation, a ^{34}S -isotope-dilution was used to measure these fluxes during growth of clones of white clover (*Trifolium repens* L.) inoculated with *Rhizobium leguminosarum* in a hydroponic system with three levels of sulphate concentration (0, 0.095mM and 0.38mM).

S derived from atmospheric deposition (S_{dad}) appeared to be a significant source of S for white clover in our experimental conditions, representing 32 to 100% of total S. S content in plants decreased with S deficiency and plant age to reach a low limit. The S_{dad}:leaf area ratio increased with decreasing S concentration in the nutrient solution. Leaf:stolon and root:shoot ratios increased for clover deprived of S, suggesting that a plasticity in the partitioning of resources to organs may allow a higher gain of S by both roots and leaves.

The use of a ^{34}S dilution method has allowed us to show that atmospheric S is a significant source of S for legume growth but not sufficient to compensate for a low sulphate availability for roots.

I. Introduction

The impact of atmospheric sulphur (S) is paradoxical. On the one hand, above a certain threshold level, atmospheric S negatively affects plant growth and functioning, but on the other hand, it may be utilised as S nutrient through deposition into the soil (wet deposition) or through foliar uptake (dry deposition) (Buchner *et al.*, 2004; De Kok *et al.*, 2007).

Potentially phytotoxic levels of atmospheric S, namely SO₂ and H₂S, may occur in industrial areas, caused by utilisation of fossil fuels. Several mechanisms have been proposed to explain the negative effect of high levels of SO₂ exposure on biomass production. SO₂ contributes with nitric oxide to cause acid rain by reacting in the atmosphere with water and atmospheric to form sulfuric acid. Alteration of several metabolic processes may result from sulphite and bisulphite formed when SO₂ dissolves, or from the acidification of the plant interior by oxidation of SO₂ to sulphuric acid (Wellburn *et al.*, 1981; Van der Kooij *et al.*, 1997; De Kok, 2007). SO₂ exposure can depress photosynthesis by inducing stomatal closure and altering electron transport in thylakoids (Ranieri *et al.*, 1999). Additionally, Reactive Oxygen Species (ROS) formed during SO₂ uptake have also been proposed as a factor in the phytotoxicity (De Kok, 2007). Likewise, the toxicity of H₂S may be ascribed to a reaction of sulphide with cellular components such as metallo-enzymes (De Kok *et al.*, 2007).

Despite their potential phytotoxic effects at high concentration, plants are able to use SO₂ and H₂S as a sulphur source for growth (Cowling *et al.*, 1973; De Kok *et al.*, 2007). The foliar deposition of SO₂ proceeds via the cuticle and, to a larger extent, via the stomata (Van der Kooij *et al.*, 1997; De Kok *et al.*, 2002). The rate of deposition is determined by atmospheric concentration, stomatal conductance and the mesophyll resistance (Van Der Kooij *et al.*, 1997; De Kok *et al.*, 2002). Inside leaves, S assimilation is achieved either by reduction to organic sulphur or mostly by oxidation to sulphate. The reduction pathway produces cysteine which is subsequently metabolised into other organic S compounds (Saito, 2004; De Kok *et al.*, 2007). The oxidative pathway occurs via the sulphite oxidase, or non enzymatically (Rennenber & Polle, 1994; De Kok *et al.*, 2007). It results in sulphate accumulation in plant vacuoles or assimilation of S into organic compounds (Saito, 2004; De Kok *et al.*, 2007). H₂S is directly metabolised into cysteine and subsequently into other organic S compounds and H₂S uptake results from the activity of O-acetylserine lyase (De Kok *et al.*, 2007).

These biochemical pathways involved in absorption of atmospheric S by the foliage are now well characterised but data concerning the actual contribution of these pathways are scarce. A number of studies have shown that exposure of plant shoots, including mostly coniferous or grassland species like ryegrass, to increasing concentrations of SO₂ may increase sulphur contents and biomass production (Cowling *et al.*, 1973; Malcolm & Garforth, 1977; Derome *et al.*, 2004). Similarly, H₂S supply to *Brassica oleracea* stimulates biomass production (Buchner *et al.*, 2004). These methods demonstrated that atmospheric S is a significant source of S for plant growth, but the overall contribution of foliar atmospheric uptake in the plant S budget was not estimated. The use of a ³⁵S enriched nutrient solution has shown that 50 % of mustard S can originate from the atmosphere (Bromfield, 1972). However this method cannot be used on a long time scale to estimate the relative contribution of root sulphate uptake and foliar atmospheric uptake, because of the experimental difficulty due to the use of radioactive compounds.

S which is one of the main pollutant gases linked to industrial activities, is also one of the very few pollutants for which policies have been successful in reducing their emissions (Ceccotti & Messick, 1997; Scherer, 2001). Therefore, in the last decades, S concentration in the atmosphere, and as a consequence in soils, is decreasing. S deficiencies have recently been observed in some agrosystems including European grasslands (Mathot *et al.*, 2008). As grasslands benefit rarely from S fertilisation, the vegetation may be influenced to a large extent from the modifications of S concentration in the soil and in atmosphere. We chose to focus this work on a grasslands species: white clover (*Trifolium repens* L.). It constitutes a key species because it is a widely distributed species, and as it is a legume that fixes atmospheric N₂, it allows important forage production without using N fertilisers and thus contributes to a good equilibrium in the vegetation community structure. Like other legumes, it is known to be particularly sensitive to sulphur nutrition (Scherer *et al.*, 1996; Varin *et al.*, in press), and the way it will adapt to S deficiencies is of great interest.

The objective of the present study was (1) to quantify with an isotopic method the contribution of atmospheric S foliar uptake in S nutrition of white clover (2) to test whether atmospheric S foliar uptake can compensate for a very low sulphate concentration in the nutrient solution. We developed a method using ³⁴SO₄ similar to the ¹⁵N dilution method used to measure N fixation (Paynel *et al.*, 2001) or NO₂ foliar uptake (Okano *et al.*, 1988).

II. Material and methods

II.1. Plant material, Clone production and Growth conditions

Clones of *Trifolium repens* L. cv Huia were obtained by vegetative multiplication of the stolon of one individual chosen as an average individual among a population. Each individual clone was generated from a 20 mm stolon section including a node. When the primary leaf appeared, the stolon sections were transferred to a hydroponic system with a continuously aerated nutrient solution in 1L black plastic bottles to maintain darkness in the rooting environment.

Plants were grown in a greenhouse with light measured at plant level equal to $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [sodium high pressure “phytoclaude 400W” plus sunlight] provided for a 16/8 h photoperiod at 25/16°C day/night. Nutrient solution was inoculated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* T354. The nutrient solutions were prepared with demineralised water, changed weekly, and contained 2 mM KNO₃, 0.18mM CaCO₃, 0.4mM KH₂PO₄, 0.15mM K₂HPO₄, 3mM CaCl₂, 0.2mM EDTA 2NaFe (3H₂O), 14μM H₃BO₃, 3μM ZnCl₂, 0.7μM CuCl₂, and 0.7μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1μM CoCl₂ in 20L. Three treatments were chosen “Zero S”, “Low S” (0.095 mM SO₄²⁻) and “High S” (0.380 mM SO₄²⁻). MgSO₄ was partly or entirely replaced by an equimolar amount of MgCl₂ and KCl for Zero and Low S treatments. Sulphate concentration of the Zero S solution was measured and found to be nil, showing that no atmospheric deposition of S gases occurred in the nutrient solution. The nutrient solution contained 1.1 ³⁴SO₄²⁻ atom excess % to allow the calculation of S content derived from SO₄²⁻-root uptake and from SO₂ and H₂S foliar uptake.

II.2. Preparation of ³⁴SO₄²⁻

Elemental S enriched in ³⁴S (99%) was obtained from Euriso-Top (Parc des Algorithmes, Route de l'Orme, 91194 St Aubin cedex, France). A digestion procedure adapted from Zhao *et al.*, (2001) was used to convert elemental ³⁴S to ³⁴SO₄. Ten mL of fuming HNO₃ was added to 100mg of ³⁴S and digestion was carried out in a heating block at 200°C for 2 hours. This operation was repeated twice and the solution was carefully separated from remaining S with a pipette. After cooling, potassium carbonate powder was added to the acidic solution to obtain a pH near neutrality. This solution was filtrated and analysed using ion chromatography showing that 80% of elemental S was oxidised to sulphate.

II.3. Plant harvests and traits measurement

Five plants of each treatment, selected randomly, were harvested 35, 70, 105 and 140 days after transfer to nutrient solutions. Each plant was separated into roots, laminae, petioles, stolons and inflorescences when present. Leaf lamina area was measured with an area meter (LI-COR LI-3100). Organs were dried at 60°C and weighed when constant. All plant organs were analysed with an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Isoprime, G V instrument) which provided measurements of total S and excess ^{34}S . An ^{34}S -isotope-dilution method, similar to those used with ^{15}N to measure N_2 fixation, was used to calculate the quantity of S derived from the nutrient solution (QSdns) (equation 1) and the quantity of S derived from atmospheric deposition (QSdad) (equation 2):

$$\text{QSdns} = \frac{\text{Atom excess \% in the plant organ}}{\text{Atom excess \% in the nutrient solution}} \times \text{Quantity of S in the plant organ} \quad (1)$$

$$\text{QSdad} = \left(1 - \frac{\text{Atom excess \% in the plant organ}}{\text{Atom excess \% in the nutrient solution}} \right) \times \text{Quantity of S in the plant organ} \quad (2)$$

Before the last harvest, the stomatal conductance for water vapour efflux ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) of each plant was measured on five leaves sampled among new but well-developed leaves by an infrared spectrometer (LI-COR LI-6400) with a standard chamber (02B) enclosing the whole leaf.

II.4. Data analysis

Data were analysed by analysis of variance, ANOVA (Sokal & Rohlf, 2003). Prior to the ANOVAs, a Ryan-Joiner test (95%) and a Bartlett test (95%) were used on each set of data so as to assess data normality and homogeneity of variances. Some data, S content and shoot:root ratios, were transformed in $1/X$ so as to fit the parametric test conditions. Tukey tests were used to compare all treatments.

The interrelation of S content with shoot dry mass and plant age was established by performing a multiple regression analysis. All analyses were carried out using the statistical software, MINITAB 13, for Windows.

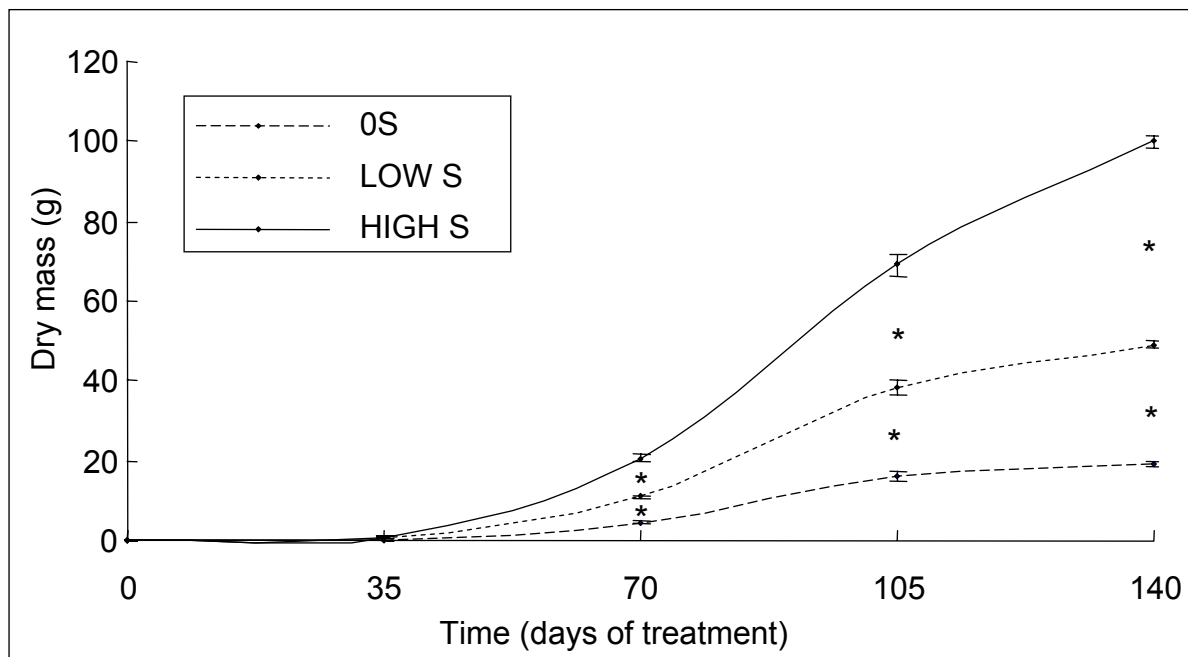


Figure IV.1. Variation of plant dry mass in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (* corresponds to the Tukey test and indicates a difference between two means at $p < 0.001$).

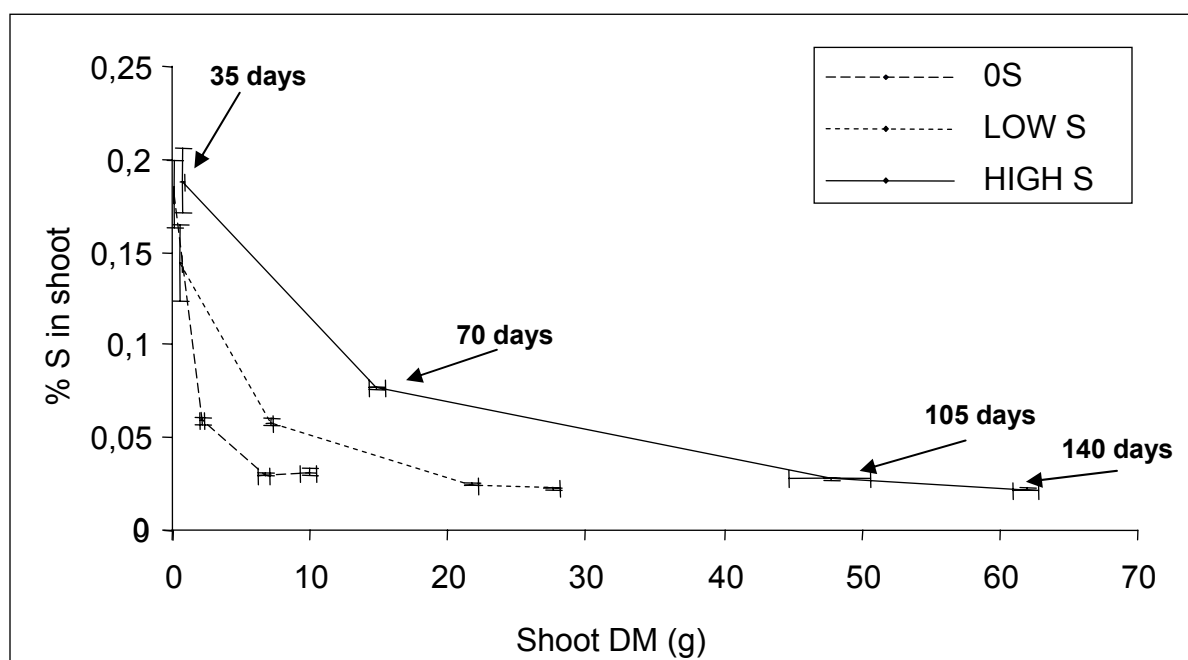


Figure IV.2. Dilution curves of sulphur in shoots. Shoot dry mass, increasing with harvest time (35, 70, 105 and 140 days) is compared to %S. Variation of plant dry mass in time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors.

III. Results

Sulphate availability modified white clover growth because plant dry mass was found to depend on S treatment from the first harvest (35 days of treatment) ($F=7.4$, $p<0.01$) until the end of plant growth (140 days: $F=1553.9$, $p<0.001$). At 35 days, only the 0S treatment differed from the others by a lower dry mass. Then from 70 days to 140 days, the three treatments were different from each other, and dry mass increased with S concentration in the nutrient solution (Figure IV.1).

As shown in Figure IV.2 presenting S concentration in shoots (leaves + stolons) as a function of the accumulated biomass, S concentration decreased with plant age ($F=1248.2$, $p<0.001$) for all treatments. The stronger decrease was observed between 35 and 70 days. Shoot S concentration was less affected by S availability than by plant age but this S availability effect was significant ($F=40.81$, $p<0.001$) as was the interaction of plant age and S availability ($F=19.52$, $p<0.01$). S content in plants decreased to 0.022% for Low S and High S treatment at the last harvest, and this value was slightly higher for Zero S treatment (0.031%). Thus, S content in shoots appeared to depend on both plant age and shoot dry mass as follows:

$$\ln(\text{S concentration}) = -1.33 - 0.00216 * \text{shoot DM} - 0.00184 * \text{Age} \quad (R^2 = 88.2\%, p<0.001).$$

S mass in plants was modified by S treatments during the whole growth period (35 days: $F=43.8$, $p<0.001$; 70 days: $F=725.8$, $p<0.001$; 105 days: $F=640.7$, $p<0.001$; 140 days: $F=79.8$, $p<0.001$). From 35 days of treatment, the S mass was at least two times greater in plants grown under the High S treatment than plants grown under the low S treatment (Figure IV.3a). The use of ^{34}S in the nutrient solution, and the measurement of ^{32}S and ^{34}S proportions in plant tissues allowed us to estimate the proportion of S derived from the nutrient solution (Sdns) and consequently the proportion of S derived from atmospheric deposition (Sdad) on leaves. For 140-day old plants, ^{34}S -atom excess % was 0.00 ± 0.01 % for plants grown under the zero S treatment, 0.21 ± 0.01 % for plants grown under the low S treatment and 0.67 ± 0.01 % for plants grown under the High S treatment. S availability had a significant effect on the proportion of Sdad from 35 days of treatment (35 days: $F=2615.7$, $p<0.001$) to the last harvest (140 days: $F=2067.0$, $p<0.001$). The three treatments were significantly discriminated for each harvest (Figure IV.3b). The proportion of Sdad % was very close to 100% for clover grown in the absence of sulphate, showing that these plants relied only on S atmospheric deposition for growth. This proportion was independent of plant age and reached 77 % and 32% for 140-day old plants grown under low and high S treatment, respectively, showing that

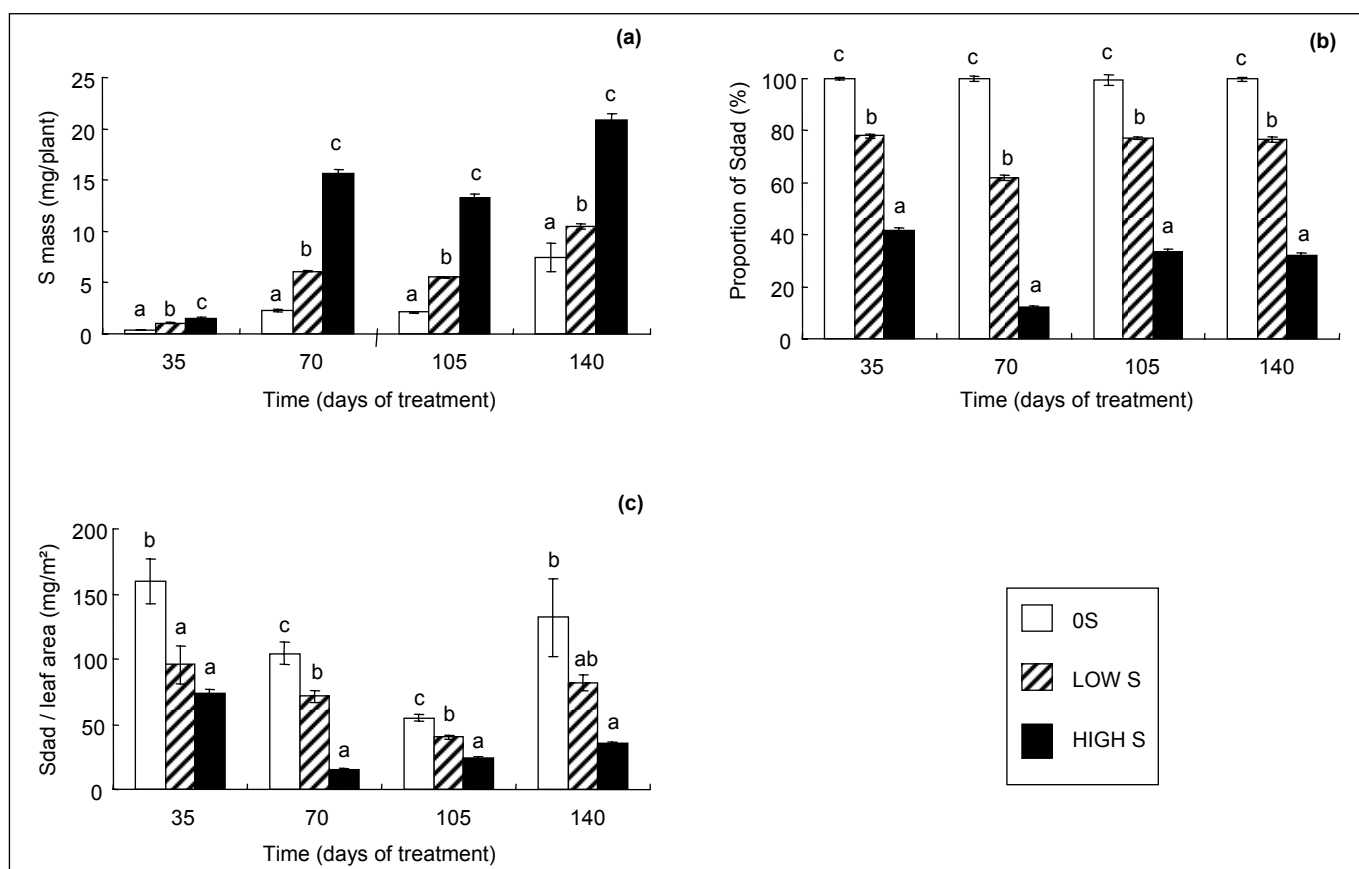


Figure IV.3. Variation of (a) S mass, (b) the proportion of S derived from atmospheric deposition (Sdad) and (c) the ratio of Sdad to leaf area in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (letters correspond to the results of Tukey tests for each harvest $p < 0.05$).

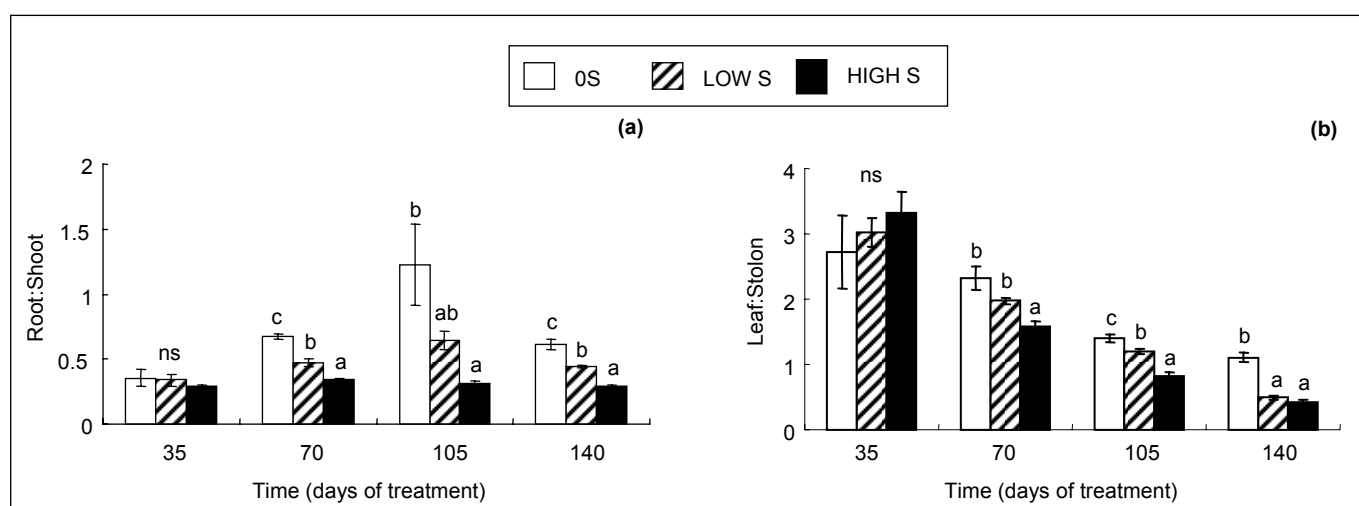


Figure IV.4. Variation of (a) Root:Shoot ratio, (b) Leaf:Stolon ratio in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (letters correspond to the results of Tukey tests for each harvest $p < 0.05$, ns : non significant).

atmospheric S is a significant source of S for clover growth. However the amount of S derived from atmospheric deposition was independent of sulphate availability (140 days, $F=0.84$, ns) and averaged 7.38 ± 0.42 mg for 140-day old plants.

When the quantity of S_{dad} was expressed as a relation of leaf area, it appeared to vary with treatments during the whole experiment (140 days: $F=9.6$, $p<0.01$). Zero S treatment allowed a significantly higher quantity of S_{dad} per metre of leaf area than the other treatments throughout plant growth, except for 140 days when no significant difference was observed between Zero S and Low S. The quantity of S_{dad} by leaf area was higher for Low S than High S, but these differences were only significant at 70 and 105 days (Figure IV.3c). Two traits have been measured so as to analyse the effect of sulphur availability on leaf properties. Neither SLA (140 days: $F=0.76$, ns) nor stomatal conductance for water vapour efflux (140 days: $F=2.16$, ns) were significantly modified by the S availability in the nutrient solution.

The allocation of energy to roots, expressed as the root:shoot ratio was modified by S concentration in the nutrient solution from 70 days (35 days: $F=0.3$, ns; 70 days: $F=51.0$, $p<0.001$; 105 days: $F=17.5$, $p<0.001$; 140 days: $F=94.9$, $p<0.001$). Clover plants grown without S were characterised by the biggest root:shoot ratios which were significantly different from those of clover plants grown in the High S solution (Figure IV.4a). Low S clover presented intermediary root:shoot ratios which were significantly different from those of the two other solutions at 70 and 140 days of treatment. The proportion of dry mass allocated to leaves compared to stolons decreased with time ($F=92.69$, $p<0.001$), and allowed the discrimination of treatments from 70 days (35 days: $F=0.7$, ns; 70 days: $F=12.5$, $p<0.001$; 105 days: $F=33.2$, $p<0.001$; 140 days: $F=66.27$, $p<0.001$) (Figure 4b). This ratio appeared to decrease less rapidly for Zero S clover plants, which exhibited the highest leaf:stolon ratios after 70 days of growth.

IV. Discussion

The present work confirms the strong dependence of clover growth on sulphur availability (Tallec *et al.*, 2008; Varin *et al.*, in Press), as observed for other legumes (Scherer *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 1999). This high impact of S nutrition on legume growth is mainly explained by the strong need for S during N₂ fixation (Zhao *et al.*, 1999, Scherer *et al.*, 1996, Varin *et al.*, in press). This high S impact was confirmed when shoot S concentration was expressed in Figure IV.2 as a function of shoot biomass, showing that S concentration of the nutrient solution exhibits a much higher impact on shoot biomass than on total S

concentration of the plant shoot. The S concentration measured here for S deficient clover is close to those observed for shoots of other legumes (Aulak *et al.*, 1976; Zhao *et al.*, 1999). In accordance with results obtained with S-deficient pea, we observed a decrease of S concentration in clover shoots. This decrease of S concentration expressed on a shoot biomass basis suggests that S could behave like N. The graphical representation of N concentration as a function of shoot biomass accumulated during growth has been used for many crops to determine critical N concentration, defined as the minimal N-concentration at which maximal production is obtained (Gastal & Lemaire, 2002). In the present study, the range of S concentration used in the nutrient solution was not wide enough to observe a situation wherein S availability is supraoptimal with respect to biomass accumulation. However, this shows that future research could use the same approach with a higher S availability to determine the critical S concentration in legumes and other plants.

The ^{34}S -dilution method developed here shows that atmospheric S is a significant source of S for clover. White clover can grow hydroponically without S added to the nutrient solution, as observed in the Zero S treatment. As the amount of S contained in each plant at the beginning of the experiment was negligible, this result shows that clover is able to use atmospheric sulphur as a significant source of S to support growth. Furthermore S contained in plants of the Low and High S treatment had a much lower ^{34}S -atom excess % than the nutrient solution, indicating they used a source of S with a lower ^{34}S abundance than the nutrient solution (1.1 %). It is known that atmospheric S (particularly sulphur dioxide and hydrogen sulphur), can replace soil sulphate as the sulphur source for plant growth especially when the sulphur supply to the roots is low (Cowling *et al.*, 1973; Van Der Kooij *et al.*, 1997, Westerman *et al.*, 2000, 2001). The metabolic pathways are now well-characterised (De Kok *et al.*, 2007) but the present work shows that the ^{34}S -dilution technique can be used to measure the contribution of atmospheric S to plant growth and constitutes the first estimation of the contribution of foliar uptake of sulphur gases to legume S nutrition. Our result supports that of Bromfield (1972) showing a high contribution (50 %) of atmospheric S gas to S nutrition of mustard.

As expected, sulphate additions decreased the proportion of clover S derived from atmospheric deposition (S_{dad}) from 100% for Zero S treatment to 77% and 32 % of clover S for plants grown under the Low S and High S treatments, respectively. This suggests that clover is able to switch from sulphate to atmospheric S as the source of S. However, the amount of S derived from the atmosphere did not increase with sulphate addition. This result is conflicting since sulphate addition strongly increased the clover leaf area, and atmospheric

deposition of sulphur gases is known to occur through leaves (De Kok *et al.*, 2007). This is due to the increase of the S_{dad}:leaf area ratio with decreasing S concentration in the nutrient solution, revealing a greater ability of S deprived clover for foliar uptake.

Several hypotheses could explain this greater ability. First, a lower S nutrition induced a lower biomass of clover leaves and then a less dense canopy. Canopy structure modifies photosynthesis as a result of the interception of PAR by growing leaves, and this is noticeable for species whose leaves are horizontal, like those of clover (Joggi *et al.*, 1983). It may be speculated that the canopy density could also influence gas concentration and the atmospheric microclimate close to leaves. A high canopy density could decrease S concentration of the atmosphere surrounding leaves and also decrease the exchange surface due to overlapping and close leaf contact. Second, structural modifications of the leaf epidermis could also explain the differences between clover plants grown with contrasted root S availability. However the absence of an S effect on SLA and stomatal conductance for water vapour efflux does not support this hypothesis. Analysis of cuticle structure could provide further information on the deposition of SO₂ on the cuticle, but could probably not explain a decrease of the observed S_{dad}:leaf area ratio because the diffusive flux of SO₂ occurs mainly through the stomata (Rennenberg & Polle, 1994). Third, greater ability of low S clover for foliar uptake could be explained by the concentration gradient of H₂S and SO₂ between the atmosphere and the substomatal cavity. This concentration gradient is the driving force for the diffusive flux of SO₂ (Rennenberg & Polle, 1994). The greater decrease of S concentration in shoots observed in S deprived clover plants supports this hypothesis, as a higher concentration gradient may have allowed a higher force for diffusive flux of SO₂ from the atmosphere to the leaves.

In clover, S availability in the nutrient solution modified S atmospheric deposition. Reciprocally, Westerman *et al.* (2000, 2001) have clearly demonstrated that exposure of curly kale to atmospheric S, and particularly H₂S, decreases sulphate uptake. Further research is needed to investigate the nature of the interactions between the two main sources of S for plants; pedospheric and atmospheric.

Plants are capable of adjusting the allocation of resources to organs in response to nutrient availability (Chapin *et al.*, 1987; Crick & Grime, 1987; Gedroc *et al.*, 1996). In this study, clover plants submitted to a sulphur deficiency presented an increase in the root:shoot ratio. This result is consistent with an optimal partitioning theory which predicts that plants can shift their partitioning of resources to the organ that acquires the most limiting resource so as to optimise the gain from that resource (Bloom *et al.*, 1985). Clover also exhibited a more

original change in morphology as the leaf:stolon ratio increased with the impoverishment of the S availability in the nutrient solution. This greater proportion of resource allocation to leaves induced a greater leaf area. Clover may then optimise foliar uptake, which represents an alternative for acquiring S in S-poor soil environments. However, even if plasticity can allow the production of advantageous phenotypes, when environmental conditions are modified, plasticity of a trait does not demonstrate that it is adaptive (Scheiner, 1993; Sultan, 2005; van Kleunen & Fischer, 2005). Indeed, van Kleunen & Fischer (2005) considered that many phenotypic responses might correspond more to consequences than responses to environmental variations. The approach taken in this paper does not allow us to distinguish whether greater leaf:stolon and root:shoot ratios observed with S deficiency resulted in a fitness benefit for the plant and corresponded to an adaptive plasticity or if these higher ratios constituted a passive response resulting from a lower growth rate. Stolons are storage organs whose growth is highly dependent on resource availability (Goulas *et al.*, 2002) which certainly favours a passive response mechanism. Nevertheless, the nature of the configuration of nutrient allocation between roots and leaves in clover plants deprived of S might play a role in optimising the acquisition of S.

Acknowledgments

We are grateful to Anne Françoise Ameline, Marie-Paule Bataillé, Michelle Coustenoble, Josiane Pichon, Dominique Ballois, Patrick Beauclair, and Raphaël Ségura for technical assistance. We wish to acknowledge Laurence Cantrill for improvement of the English text.

D

iscussion générale

« Dans une discussion, le difficile, ce n'est pas de défendre son opinion, c'est de la connaître. »

(André Maurois)

Discussion générale

Le travail présenté dans ce manuscrit, portant sur la réponse fonctionnelle du trèfle blanc face à la disponibilité en S, avait pour objectif de répondre à quatre questions :

- ♣ 1/ Quelles sont les fonctions biologiques les plus modulées par la disponibilité en S ?
- ♣ 2/ Comment le soufre stimule-t-il la fixation du N₂ ?
- ♣ 3/ Le soufre stimule-t-il la production de biomasse ou accélère-t-il la croissance ?
- ♣ 4/ Le trèfle peut-il compenser une faible disponibilité en S du substrat par le dépôt foliaire de S ?

Pour aborder ces questions, je me suis placé à l'interface entre écologie et physiologie en utilisant à la fois des outils d'écologie fonctionnelle comme les traits se rapportant à différentes fonctions et l'analyse de la croissance du trèfle blanc, et des approches physiologiques de la plante entière comme l'étude des flux d'azote et du S par l'utilisation de deux marqueurs isotopiques stables ¹⁵N et ³⁴S. Des outils de physiologie moléculaire tels que l'utilisation d'anticorps, la quantification des protéines par électrophorèses mono et bidimensionnelles, la quantification des acides aminés ou le séquençage des peptides sont venus compléter notre approche. Notre stratégie d'étude a consisté à mettre en place des méthodologies permettant : i) de limiter la variabilité génétique, ii) de réaliser des gradients de disponibilité en S et éventuellement en N pour les cultures de trèfle, iii) de quantifier la fixation du N₂ et le dépôt foliaire de S.

La plasticité phénotypique est à la base des quatre études présentées dans les résultats. Pour étudier cette plasticité indépendamment de la variabilité génétique, nous avons cherché à limiter la variabilité génétique. L'étude présentée dans le chapitre III des résultats s'est basée sur des cultures de trèfle blanc de la variété Huia, qui est une variété sélectionnée, présentant donc une variabilité génétique plus faible que l'espèce sauvage. Elle est largement répandue dans les prairies permanentes comme temporaires, c'est pourquoi son utilisation paraissait

pertinente quant à l'analyse de l'impact de la nutrition soufrée. Dans l'étude présentée dans le chapitre I des résultats, nous avons utilisé des lignées pures autofécondes à très faible variabilité génétique (Michaelson-Yeates *et al.*, 1998). Enfin, pour l'expérimentation qui a donné lieu aux Chapitres II et IV des résultats, nous avons choisi de cloner un génotype de la variété Huia. Nous avons utilisé des fragments de stolons issus d'une même plante mère sélectionnée en tant qu'individu moyen représentatif. L'utilisation de ces clones nous a permis d'éliminer la variabilité génétique et nous a donc donné accès à l'analyse de réponses exclusivement plastiques.

L'étude de la réponse du trèfle à la disponibilité en S du milieu implique la mise en place d'un gradient de concentration en sulfate du substrat. Lors de la première expérimentation, trois lignées de trèfle blanc ont été cultivées sur sol. Ce sol a été choisi dans une prairie pauvre en S dans un horizon inférieur afin de limiter l'impact de la minéralisation de la matière organique. Il a ensuite été stabilisé à humidité constante pendant un mois pour éviter l'effet de flushs de minéralisation. Le gradient a alors été obtenu par une fertilisation minérale croisant différents niveaux S (CaSO_4) (0, 12 et 24 kg ha^{-1} S) et N ($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$) (0, 50 et 100 kg ha^{-1} N).

L'obtention d'un sol très pauvre étant difficile, et dépourvu de S impossible, nous avons choisi de réaliser les autres expérimentations en hydroponie. Cette technique de culture nous a permis de réaliser un gradient plus important de disponibilité en S en faisant varier la concentration en sulfate des solutions nutritives et, pour ce qui concerne la culture des clones de trèfle exploitée dans les chapitres II et IV des résultats, un traitement entièrement dépourvu de S a été mis en place. Les concentrations en minéraux, et notamment en sulfate ont été déterminées à partir d'un raisonnement de disponibilité de S par plante et par intervalle de temps. Les deux cultures hydroponiques ont été mises en place avec des protocoles différents, pour la culture de la variété Huia, chaque bac de 20L correspondait à un réplicat et contenait plusieurs trèfles, alors que les clones ont été cultivés en bacs individuels de 1L. Les volumes alloués à chaque plante n'étant pas les mêmes dans les expérimentations, les concentrations en S des solutions nutritives ne sont pas les mêmes.

L'étude de la réponse du trèfle blanc à la disponibilité en S s'est particulièrement orientée vers la fixation du N_2 atmosphérique et l'acquisition du S. L'acquisition de l'azote par les légumineuses est due à la fois à l'absorption d'azote minéral de la solution du sol et à la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, et il nous a fallu dissocier ces deux voies

d'acquisition pour préciser l'effet du S. Dans un premier temps nous avons bénéficié de trois lignées de trèfle blanc contrastées quant à leur mode d'acquisition de l'azote et caractérisées par Michaelson-Yeates *et al.* (1998) et Abberton *et al.* (1998) : NNU (Normal Nitrate Uptake) est une lignée dont la fonction d'acquisition de l'azote est dite normale, LNU (Low Nitrate Uptake) absorbe faiblement le nitrate et VLF (Very Low Fixation) est une lignée fixant faiblement le diazote. L'utilisation de ces lignées nous a permis d'isoler l'effet du S sur la fixation et sur l'absorption de l'N.

Dans l'ensemble des cultures, pour différencier les sources d'azote, un marquage à l'isotope ^{15}N a été réalisé, soit au niveau de l'engrais azoté apporté à la culture sur sol, soit au niveau du nitrate des solutions nutritives. Ce marquage a permis de tracer le devenir des engrais appliqués en début d'expérimentation au sein de la culture sur sol (Chapitre I des résultats). Il a aussi permis, via la méthode de dilution isotopique de quantifier l'N issu de l'absorption et par déduction l'N issu de la fixation pour les cultures en hydroponie.

L'acquisition du S se fait elle aussi à partir de deux sources, le sulfate de la solution du sol qui est absorbé par les racines et le S atmosphérique qui est déposé sur les feuilles. Afin de quantifier la proportion de S provenant du dépôt foliaire, nous avons été amenés, pour la culture des clones, exploitée notamment dans le quatrième article, à utiliser un marquage à l'isotope ^{34}S de la solution nutritive et à développer une méthode, proche de celle utilisée pour le ^{15}N , en utilisant la dilution du ^{34}S pour quantifier le dépôt foliaire de S.

Quatre articles, issus de trois cultures de trèfle blanc, ont été présentés dans les résultats :

Le chapitre I des résultats correspond à l'exploitation des données issues des cultures sur sol de trèfles provenant de trois lignées NNU, LNU et VLF et confrontés à différentes fertilisations en N et en S. Cette expérimentation a mis en évidence une forte plasticité morphologique et physiologique du trèfle et a permis d'identifier les fonctions les plus modulées par la disponibilité en S, notamment les fonctions d'acquisitions de l'azote et du S, l'aptitude potentielle à la compétition, la reproduction et la photosynthèse.

Le chapitre II des résultats a été obtenu à partir d'une culture hydroponique de clones issus d'un génotype de trèfle blanc, commune avec le chapitre IV. La faible disponibilité en S a induit une diminution de la fixation du N_2 des trèfles qui s'explique principalement par une diminution de la nodulation. L'acquisition de quelques données

physiologiques et moléculaires concernant la fixation symbiotique, comme la teneur en nitrogénase et légghémoglobine ou en acides aminés, a permis de montrer que l'alimentation en S agit sur l'ensemble des mécanismes liés à la fixation de l'azote.

Le **chapitre III des résultats** est basé sur une culture hydroponique de trèfles de la variété Huia. L'analyse de croissance a révélé que la bonne disponibilité en S augmente la biomasse finale du trèfle par le biais d'une plasticité phénotypique et non d'un décalage de croissance. Par ailleurs, nos résultats ont montré que la phase d'accélération de la croissance, qui a lieu de 49 à 56 jours, est une période clef pour les besoins nutritionnels du trèfle blanc.

Le **chapitre IV des résultats**, a été obtenu à partir d'une culture hydroponique de clones issus d'un génotype de trèfle blanc, commune avec le chapitre II. Il montre que le S atmosphérique est utilisé par le trèfle de façon non négligeable; 32 % de S est issu du dépôt atmosphérique chez des trèfles cultivés 140 jours avec la concentration la plus forte en sulfate dans la solution nutritive. Néanmoins, le S foliaire ne parvient pas à compenser la déficience en S du milieu de culture.

L'objet de ce chapitre est de discuter l'ensemble des résultats obtenus pour ces différentes cultures et de les confronter aux connaissances rapportées dans la bibliographie. Nous présenterons tout d'abord l'effet du S sur la croissance du trèfle blanc *Trifolium repens* L., puis le lien existant entre l'acquisition de l' N et du S chez cette fabacée, pour discuter finalement des mécanismes impliqués dans l'effet du S sur la fixation du N₂.

I. Effet du S sur la croissance du trèfle blanc

Notre travail a mis en évidence la forte sensibilité du trèfle blanc à la disponibilité en S du substrat, confirmant ainsi les travaux de thèse de Tallec (2008) qui s'est intéressée au trèfle blanc en situation de compétition. Ainsi, la fertilisation S a stimulé nettement la croissance des trèfles blancs des trois lignées pures cultivées sur sol pendant 70 jours (Chapitre I des résultats). L'effet de la disponibilité en S sur la croissance d'individus issus de semences de trèfles Huia cultivés en hydroponie (Chapitre III des résultats) devient significatif à partir de 42 jours de culture. Enfin, pour les clones de trèfles cultivés en hydroponie, et pour lesquels le gradient de S est plus drastique puisqu'il intègre un traitement 0S (Chapitre II et IV des résultats), l'effet du S sur la production de biomasse est significatif dès 35 jours de traitement.

La croissance du trèfle blanc est donc dépendante de la disponibilité en S. Des résultats analogues ont été obtenus pour d'autres Fabacées ; le trèfle seigneur (Gilbert & Robson, 1984), le trèfle des prés, la fève (Scherer & Lange, 1996), la luzerne et le pois (DeBoer & Duke 1982 ; Scherer & Lange, 1996).

1.1. Le fonctionnement du trèfle est modulé par la concentration en soufre du substrat

1.1.1. Plasticité des fonctions liée à la nutrition soufrée

La forte plasticité du trèfle avait déjà été établie en fonction de la variation de différents facteurs du milieu tels que le froid (Frankow-Lindberg, 1999), la quantité de lumière bleue (Gautier *et al.*, 2001) et la disponibilité en potassium (Høgh-Jensen, 2003). L'analyse de la variation des traits de fonctions biologiques étudiées dans l'expérimentation 1 confirme la plasticité élevée du trèfle blanc. Le trèfle possède une capacité d'ajustement considérable en réponse à la disponibilité en S. Le fonctionnement des trois lignées (Chapitre I des résultats), contrastées dans leurs capacités d'acquisition de l'N, a été analysé dans un gradient de fertilisation S via la mesure de traits fonctionnels. Mise à part la reproduction sexuée, peu ou pas dépendante de la disponibilité en S, l'ensemble des fonctions choisies pour l'analyse de la réponse du trèfle face aux variations nutritionnelles en S s'est révélé plastique par rapport à cette ressource. L'acquisition de l'azote et du soufre, l'aptitude potentielle à la compétition, la photosynthèse et la reproduction végétative sont ainsi plus performantes chez les individus qui ont bénéficié d'une fertilisation.

1.1.2. Effet direct du S et effet indirect via l'acquisition de l'N

Le S, en tant que macroélément est indispensable au développement de la plante, une déficience en S a pour conséquence directe de réduire la synthèse de protéines et a par conséquent un impact sur le fonctionnement de la plante entière. La première analyse fonctionnelle réalisée à partir de la culture des trois lignées a mis en évidence cet impact direct sur un ensemble de fonctions mais a aussi mis en relief les interactions importantes qui peuvent exister entre l'azote et le S. La disponibilité en S exerce ainsi un effet indirect sur les performances du trèfle par l'intermédiaire de la fixation du N₂. En effet, comme avaient pu le montrer Scherer & Lange (1996), Zhao *et al.* (1999), Pacyna *et al.* (2006) ou Scherer *et al.* (2008) sur d'autres Fabacées, les résultats obtenus dans les trois premiers chapitres des résultats indiquent qu'une déficience en S réduit fortement la fixation de N₂ atmosphérique du

trèfle. Les effets de la nutrition soufrée sont donc complexes puisque le S agit directement sur la croissance du trèfle mais également via la nutrition azotée. Seule la lignée VLF, utilisée pour la première expérimentation, ne fixant que très peu le N₂ atmosphérique nous a permis d'isoler les effets directs de la nutrition soufrée sur le fonctionnement du trèfle. Toutefois, la plus forte plasticité fonctionnelle des lignées fixatrices a mis en évidence que l'impact le plus fort du S sur le trèfle est lié à l'acquisition de l'azote.

I.1.3. Aptitude potentielle à la compétition

Le trèfle n'est jamais cultivé seul, il est semé avec des Poacées dans les prairies temporaires et se maintient dans les prairies permanentes lorsque la disponibilité en azote est faible (Murphy & Quirke, 1997; Simon *et al.*, 1997; Mosquera-Losada *et al.*, 2004). Dans le contexte des communautés végétales prairiales, l'impact positif d'une fertilisation soufrée n'a de sens que si le trèfle bénéficie plus du S que les Poacées compétitives qui l'accompagnent en prairie. Nous n'avons pas réellement mesuré l'aptitude compétitrice puisque les trèfles ont toujours été cultivés seuls, mais une aptitude potentielle à la compétition, estimée par la production de biomasse du trèfle. L'azote étant l'élément déterminant de la balance compétitrice entre le trèfle et les Poacées, notamment le ray-grass, l'effet du S sur la fixation du N₂ laisse supposer un effet plus fort du S sur le trèfle que sur les plantes non fixatrices. C'est effectivement ce que les travaux de Tallec (2008) montrent ; cultivé avec du ray-grass, le trèfle prend l'avantage compétitif lorsque la fertilisation soufrée augmente.

I.1.4. Reproduction

Le trèfle blanc dispose de deux modes de multiplication. Au sein des communautés, il est principalement régénéré par multiplication végétative, et colonise de nouveaux habitats par les graines (Grime *et al.*, 1988). Ces deux modes de reproduction ont été analysés dans la première expérimentation (Chapitre I des résultats) et leur réponse à la fertilisation S s'est avérée très différente. La reproduction sexuée est peu sensible à la disponibilité en S. En revanche, la multiplication végétative, appréhendée par des traits liés aux stolons, est affectée par la disponibilité en S. La production de stolons est accrue lorsque la disponibilité en S augmente (Chapitre I des résultats). Les stolons, représentant les organes de dispersion latérale et de reproduction végétative sont aussi des organes de stockage (Goulas *et al.*, 2002). La déficience en S réduit la synthèse de protéines et par conséquent la priorité n'est pas au stockage. Les résultats présentés dans le chapitre IV mettent en évidence une réduction de la

biomasse allouée aux stolons lorsque le S est déficient dans la solution nutritive, et donc potentiellement une multiplication végétative réduite.

I.1.5. Photosynthèse

L'effet de la disponibilité en S sur la photosynthèse a été abordé dans le premier article (chapitre I des résultats), via un ensemble de traits foliaires. La littérature rapporte que la coloration jaune des plantes, induite lors d'une déficience en S (Anderson & Spencer, 1950 ; Stewart & Porter, 1965 ; Imsande, 1998), est due à une diminution des quantités de chlorophylle (Friedrich & Shrader, 1978 ; DeBoer & Duke, 1982). La première expérimentation n'a pas mis en évidence de tels résultats et les teneurs en chlorophylle, estimées par l'index Soil Plant Analysis Development (SPAD), se sont révélées indépendante de la nutrition S. En revanche, la biomasse et la surface des feuilles augmentent avec la disponibilité en S du substrat. Ce résultat est évidemment corrélé à un accroissement de biomasse de l'ensemble de la plante (Chapitres I et II des résultats). Toutefois, les données de biomasse foliaires obtenues pour les clones de trèfles cultivés en hydroponie (Chapitre IV des résultats) montrent que l'allocation des ressources vers les feuilles plutôt que vers les stolons, est plus importante en situation de déficience en S que de forte disponibilité. La surface photosynthétique est ainsi réduite moins vite que la biomasse aérienne.

I.2. Plasticité phénotypique et non pas ontogénétique exprimée chez le trèfle blanc

I.2.1. Plasticité phénotypique chez le trèfle blanc

Le trèfle présente une importante plasticité face à (i) un gradient de fertilisation en S pour les cultures sur sol et (ii) un gradient de concentration en sulfate des solutions nutritives pour les trèfles cultivés en hydroponie. Les réponses plastiques des plantes face à la variation d'un facteur du milieu sont souvent assimilées à une plasticité phénotypique, mais Wright et McConnaughay (2002) ont souligné que la confrontation de différents phénotypes correspondant à des plantes du même âge ne permettait pas de préciser si la plasticité était réellement une plasticité phénotypique ou si elle résultait de variations liées au développement. Ils distinguent deux composantes dans la plasticité, la plasticité phénotypique et la plasticité ontogénétique. Il nous a paru important de bien cerner la plasticité mise en évidence chez le trèfle, c'est-à-dire de préciser si la biomasse plus faible mesurée à l'issue d'une culture chez des trèfles ayant subi une carence en S, correspondait à une différence

phénotypique ou à un décalage de croissance. Dans le Chapitre III des résultats, nous avons choisi d'étudier la croissance du trèfle grâce aux courbes de croissance et au calcul du taux relatif de croissance (RGR) réalisés pour différentes disponibilités en S. Les courbes de croissances modélisées pour les trois traitements soufrés se sont révélées synchrones, de même que les pics de RGR. La plasticité du trèfle face à un gradient de S n'est donc pas liée à un décalage de croissance mais correspond bien à une plasticité phénotypique.

I.2.2. Période optimale pour la fertilisation en S chez le trèfle blanc

Dans le Chapitre III des résultats, nous avons montré qu'il n'existait pas de retard de croissance lié à une déficience en S. Néanmoins, les besoins en S de la plante ne sont pas constants au cours de son développement. Le RGR calculé au cours du temps s'est révélé particulièrement sensible à la disponibilité en S au moment où il était maximal, c'est-à-dire pendant la phase d'accélération de croissance entre 49 et 56 jours (pour l'ensemble des traitements soufrés). Finalement, cette phase de croissance est le meilleur moment pour la fertilisation en S.

I.3. Dépôt foliaire de S chez le trèfle blanc

I.3.1. Teneurs en S

Dans le Chapitre IV des résultats, les teneurs en S total des parties aériennes du trèfle cultivé en hydroponie (entre 0,4 et 2 mg.g⁻¹ MS en fonction de l'âge des plantes) sont proches de celles obtenues chez d'autres légumineuses comme le pois (entre 1 et 2 mg.g⁻¹ MS) (Zhao *et al.*, 1999) et la luzerne sur sol (entre 1 et 3,5 mg.g⁻¹ MS) (Aulak *et al.*, 1976). Les teneurs en S observées dans les racines sont assez proches puisque comprises entre 0,5 et 1,3 mg.g⁻¹ MS. Les teneurs en S que nous avons obtenues dans les nodules, sont supérieures à celles des feuilles ou des racines, puisqu'elles peuvent atteindre 3 mg.g⁻¹ MS pour la dernière récolte comparée à 0,8 pour les feuilles et 0,4 mg.g⁻¹ MS pour les racines de cette même récolte. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Zhao *et al.*, (1999) et de Scherer *et al.* (2008) sur le pois et la luzerne. Ces auteurs n'ont pas séparé racines et nodules mais observé de fortes teneurs en S total dans les racines nodulées. Cela reflète probablement une forte demande en S pour le fonctionnement des nodules (Zhao *et al.*, 1999; Scherer *et al.*, 2008).

I.3.2. Utilisation du S atmosphérique par le trèfle

Le S atmosphérique, en particulier le SO₂ est toxique pour les plantes à forte concentration, mais peut constituer une source de S pour la croissance des plantes. Les principales formes qui peuvent être utilisées sont le SO₂, le H₂S et en moindre mesure les formes organiques telles que les carbonylsulphides ou le méthylmercaptane (Rennenberg et Polle, 1994). Le S atmosphérique pénètre dans les feuilles essentiellement par les stomates mais également par la cuticule (De Kok *et al.*, 2007). Les voies métaboliques qui sont impliquées sont maintenant bien caractérisées (Van Der Kooij *et al.*, 1997, Buchner *et al.*, 2004, De Kok *et al.*, 2007) mais la contribution réelle du S atmosphérique dans la nutrition des plantes est mal connue. L'essentiel des études qui ont montré l'impact du S atmosphérique sur la croissance et le métabolisme des plantes a été réalisée grâce à l'exposition des plantes à du SO₂ (Cowling *et al.*, 1973) ou du H₂S (Westerman *et al.*, 2001). Ces expositions entraînent l'augmentation des teneurs en composés soufrés, en particulier dans les feuilles, et stimulent la croissance des plantes. L'utilisation d'un isotope radioactif du S, le ³⁵S chez la moutarde (Bromfield, 1972) a permis de montrer que la moitié du S utilisé provient de l'atmosphère, mais les contraintes liées à l'utilisation d'isotopes radioactifs rendent difficile leur utilisation sur un cycle de culture.

Il a nous donc paru nécessaire de développer une méthodologie permettant d'évaluer la contribution du S atmosphérique à la croissance des plantes. En nous calquant sur la méthode de dilution du ¹⁵N fourni sous forme soluble aux plantes par l'N atmosphérique, qui permet la mesure des quantités d'N₂ fixés, nous avons utilisé du ³⁴SO₄²⁻ (chapitre IV des résultats). Ce sulfate fourni dans la solution nutritive et la mesure de l'abondance isotopique des tissus nous ont permis de quantifier le dépôt de S foliaire. Les trèfles cultivées sur la concentration la plus forte en S ont intégré 21 ± 0,3 mg de S /plante, dont 6,7 ± 0,2 mg, soit 32 % proviennent de l'atmosphère. Les trèfles cultivés en absence totale de sulfate (Zéro S) qui n'ont pu utiliser que le S atmosphérique et les réserves initiales contenues dans le fragment de stolon (67 ± 1 µg S) comme source de S pour leur croissance ont intégré 7,4 ± 0,7 mg S en 140 jours de croissance. Le trèfle peut donc se développer sans S ou en condition de déficience en S grâce à l'utilisation de ce dépôt de S atmosphérique qui peut remplacer le sulfate issu du substrat. Ce dépôt foliaire ne permet cependant pas de compenser la déficience en S.

L'augmentation de la concentration en sulfate de la solution nutritive entraîne une augmentation de la surface foliaire sans modifier la quantité de S déposé par plante. Cette

observation montre que les trèfles cultivés sans ou avec peu de sulfate sont plus efficaces pour utiliser le S atmosphérique et ont un ratio S_{dad} (pour S Derived from Atmospheric Deposition)/Surface foliaire plus fort. Dans la mesure où le flux entrant de S atmosphérique est fortement dépendant du gradient de concentration entre l'atmosphère et les tissus foliaires (Rennenberg & Polle, 1994), il est probable que cette bonne efficacité d'utilisation du S atmosphérique soit liée à des plus faibles teneurs internes en sulfate chez les trèfles déficients en S.

1.4. Dilution du S chez le trèfle blanc

Pour comprendre les relations qui lient croissance et accumulation de S chez le trèfle, nous avons tracé le graphique qui représente la teneur en S des parties aériennes en fonction de leur biomasse (figure 2 du chapitre IV des résultats). Nous avons ainsi pu mettre en évidence une dilution du S en fonction de la croissance. La teneur en S des tissus baisse fortement entre 35 et 70 jours de croissance pour les 3 traitements. L'augmentation de la concentration en sulfate de la solution nutritive augmente beaucoup plus la biomasse produite que la teneur en S des tissus. Cette représentation montre donc que le S pourrait se comporter chez le trèfle comme l'N (Gastal & Lemaire, 2001). Cette représentation est utilisée pour déterminer la teneur critique en N, c'est-à-dire la teneur minimale pour laquelle la production maximale est observée. Un plus grand panel de concentrations en sulfate aurait été nécessaire pour déterminer la teneur critique en S. Cette approche pourrait permettre de mieux comprendre les relations entre nutrition azotée - soufrée et la production des cultures, mais également d'élaborer des outils de diagnostic de l'état de nutrition en S d'une communauté végétale intégrant du trèfle blanc dans leur composition floristique. Ces outils de diagnostic permettront un ajustement des apports en S face aux besoins des cultures, du type de milieu et des objectifs de production.

II. Lien entre l'acquisition du S et de l'N chez le trèfle blanc confronté aux variations nutritionnelles soufrées

II.1. Variation du rapport N/S dans le temps et selon les traitements N et S

Dijkshoorn et Van Wijk (1967) ont défini un rapport N/S optimal d'environ 40:1 pour la croissance des légumineuses. Les résultats que nous avons obtenus sur sol sont assez

proches. Ainsi, dans l'expérimentation 1 (Chapitre I des résultats) réalisée sur sol, une fertilisation en S de 24 kg S.ha⁻¹ ajoutée au traitement 100 kg N.ha⁻¹ a permis une croissance optimale pour un rapport N/S 34 :1 pour les lignées NNU et LNU. Dans la culture hydroponique présentée dans le chapitre III des résultats, nous avons observé la plus forte croissance du trèfle pour un rapport N/S plus faible, puisqu'il était 21 :1 pour le traitement optimal. Dans l'autre culture hydroponique dont les résultats sont présentés dans les chapitres II et IV, les premières récoltes ont permis d'obtenir des résultats assez proches. Ainsi les trèfles cultivés pendant 70 jours comme dans le chapitre III, ont également un optimum de croissance pour un ratio N/S de 27:1 des tissus végétaux. Il faut cependant noter que la baisse des teneurs en S avec l'âge des plantes entraîne une forte augmentation de ce rapport, jusqu'à une valeur de 60:1 pour les plantes âgées de 140 jours.

En accord avec de nombreuses études (Dijkshoorn & Van Wijk, 1967 ; Scherer & Lange, 1996, Zhao *et al.*, 1999), nous avons observé qu'une diminution de l'apport en S entraîne une augmentation du rapport N/S et une diminution de l'acquisition de l'N par absorption d'N soluble ou fixation de l'N atmosphérique. Nous avons ainsi pu confirmer un lien important entre la nutrition S et la nutrition N.

II.2. Effet non spécifique du S sur l'absorption de l'N par l'intermédiaire de la croissance racinaire

Dans le Chapitre I des résultats, nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif du S sur les traits d'acquisition de l'azote pour la lignée faiblement fixatrice du N₂ (VLF). Or, cette lignée utilise majoritairement l'N minéral. D'autre part, l'apport d'engrais S n'a pas stimulé de manière significative l'absorption de l'engrais enrichi en ¹⁵N dans aucune des trois lignées. L'azote est apparu comme le facteur limitant de la lignée faiblement fixatrice du N₂. Les résultats sont différents en hydroponie puisque une réduction de 55 % de la quantité de ¹⁵NO₃ absorbé est observée chez les plantes cultivées en absence de sulfate dans le chapitre II des résultats. Chez le trèfle, la sensibilité du processus d'absorption de l'N minéral, face à l'insuffisance en S, sont en adéquation avec des travaux effectués chez l'orge (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991a, 1991b) ou l'épinard (Prosser *et al.*, 2000) démontrant une diminution de l'absorption du nitrate lors d'une privation en S. Cooper et Clarkson (1989) ont suggéré que l'existence d'un pool d'acides aminés libres circulant entre les racines et les parties aériennes *via* le xylème et le phloème pourrait participer au contrôle de l'absorption du nitrate. La glutamine serait le principal acide aminé rétro-inhibant l'activité du IHATS au niveau transcriptionnel chez l'orge (Vidmar *et al.*, 2000) et le colza (Beuve *et al.*, 2004).

Touraine et Muller (1992) ont observé grâce à des apports exogènes, que l'asparagine (Asn) inhibait l'influx de nitrate.

En accord avec ces résultats, nous avons effectivement observé une forte accumulation d'asparagine chez les trèfles déficients en S. Cette accumulation traduit probablement un déficit de synthèse des protéines. En effet, le manque de S provoque généralement un déficit de synthèse des acides aminés soufrés essentiels aux protéines et une accumulation des autres acides aminés, particulièrement ceux qui sont riches en N (Dijkshoorn & Van Wijk, 1967 ; Prosser *et al.*, 2000).

Cependant, nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence d'effet spécifique de la sous-alimentation en S sur l'efficacité des systèmes d'absorption du nitrate. En effet, la mesure de la longueur des racines formées par les différents trèfles montre que les quantités d'azote absorbé par longueur racinaire (mètre linéaire racinaire) n'augmentent pas significativement avec la disponibilité en S. La réduction de l'absorption du nitrate chez les clones de trèfles semble s'expliquer par la forte augmentation de la longueur racinaire faisant suite à la stimulation de la fixation par unité de longueur racinaire plutôt qu'un effet spécifique du S.

II.3. Effet sur la fixation du diazote chez le trèfle blanc

Dans la culture sur sol, l'effet négatif de l'azote minéral sur la fixation du N₂ est réduit lors de fortes fertilisations en S (Chapitre I des résultats). Les effets les plus forts de la fertilisation S sur l'ensemble des fonctions sont observés sur la lignée LNU. Cette lignée absorbe moins l'azote soluble et utilise donc essentiellement l'azote atmosphérique pour sa croissance. Les deux cultures en hydroponie ont permis, grâce à l'utilisation de ¹⁵NO₃, de confirmer que l'apport de sulfate stimule la fixation de l'azote atmosphérique chez le trèfle. Ainsi, dans l'expérimentation présentée dans le chapitre II des résultats, une réduction de 81% de la quantité d'N fixé est observée chez les plantes cultivées en absence de sulfate, comparativement aux plantes cultivées sur la concentration forte (0,380 mM). De même, dans l'expérimentation présentée dans le chapitre III des résultats, une réduction de 90 % de la quantité d'N fixé est observée chez les plantes cultivées sur une très faible concentration en sulfate (0.009 mM), comparativement aux plantes cultivées sur une concentration optimale (0.384 mM).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Gilbert et Robson (1984), Sinclair *et al.* (1996) ou Tallec *et al.* (2008) sur des cultures mixtes raygrass/trèfle blanc, qui avaient montré de manière indirecte que le S avait un effet positif sur la fixation du N₂. Aulakh *et al.*

(1976), DeBoer et Duke (1982) et Scherer et Lange (1996) ont également identifié cet effet bénéfique du S sur la fixation du diazote chez d'autres Fabacées comme la luzerne, le Trèfle des prés, la fève et le pois. Cet effet marqué de la disponibilité en S peut s'expliquer par une stimulation de la formation ou du fonctionnement des nodules (Zhao *et al.*, 1999 ; Scherer *et al.*, 2008).

III. Mécanismes impliqués dans l'effet du Soufre sur la fixation du N₂

III.1. Effet du S sur la Nodulation

Dans le Chapitre I des résultats, la longueur moyenne des nodules était plus faible pour la lignée faiblement fixatrice (VLF) que pour les lignées normalement fixatrices (NNU et LNU). L'ajout d'engrais S provoque une augmentation de la longueur de ces nodules. L'étude des caractéristiques morphologiques des nodules a été approfondie dans l'expérimentation présentée dans le chapitre II des résultats. Dans des conditions de déficience en S, le nombre, la taille, la masse sèche et le volume total de nodules par plante diminuent fortement. La prise en compte des variables morphologiques permet de montrer que cette stimulation de la nodulation par le S ne résulte pas d'une stimulation de la croissance du trèfle. Ainsi, la masse de nodules exprimée par mètre de racine augmente par un facteur 68 entre les trèfles cultivés sans sulfate ou avec peu de sulfate. La déficience en S tout comme la déficience en PO_4^{2-} (Almeida *et al.*, 2000) réduit donc la nodulation chez le trèfle blanc. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus chez le trèfle des prés, la luzerne, le pois et la fève (Scherer & Lange, 1996). Ces auteurs ont observé que la faible production de nodules chez les Fabacées déficientes en S est liée à une longueur de racine plus faible et non pas à un effet spécifique du S sur la morphogénèse des nodules (Scherer & Lange, 1996).

Les capacités de fixation des fabacées sont fortement liées à la nodulation qui résulte de l'interaction entre la plante hôte et la bactérie du sol (Walsh, 1995). Tout comme l'azote, le S pourrait agir au niveau des différentes étapes de la mise en place des nodules fixateurs : multiplication de *Rhizobium*, infection des racines ou encore développement des nodules (Schubert, 1995).

Il est peu probable que l'effet du S observé dans nos conditions résulte d'un effet sur la multiplication de *Rhizobium* car la bactérie a été apportée en quantité optimale et à plusieurs reprises aux cultures. L'infection des racines qui permet la mise en place de la

symbiose nécessite préalablement l'échange de signaux moléculaires entre les deux partenaires, tels que des flavonoïdes ou des lectines secrétés par les racines ou des facteurs NOD secrétés par la bactérie (Schultze & Kondorosi, 1998, Gordon *et al.*, 2001). Certains facteurs qui sont des lipochitooligosaccharides (LCOs) comportent des résidus S essentiels dans la mise en place de la symbiose, mais cela ne semble pas être le cas de celui qui est secrété par *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (D'Haeze & Holters, 2002). Il faut également noter que la noduline du trèfle, la Trifoliin, ne contient pas de fortes proportions de S (Dazzo *et al.* 1978). En revanche, une noduline précoce riche en S qui contient une cystéine dans son site actif, la dd23b, a été identifiée récemment et pourrait constituer une étape de contrôle du S sur le développement des nodules (Crockard *et al.*, 2002).

III.2. Effet du S sur la synthèse des protéines du nodule

Les bactéroïdes nodulaires ont un très fort besoin en S (Gordon *et al.*, 1990 ; Moran *et al.*, 2000 ; Krusell *et al.*, 2005). Krusel *et al.*, (2005) ont montré l'existence d'un transporteur de sulfate nodulaire (sst1). L'existence de ce transporteur montre le rôle important que joue le S lors de la mise en place et de la production des nodules. Il permet d'alimenter le bactéroïde en sulfate nécessaire à sa croissance et son fonctionnement. Malgré l'importance du S dans la structure et le fonctionnement de la nitrogénase, très peu de données existaient dans la littérature concernant l'influence du S sur la nitrogénase ou les enzymes clefs du fonctionnement du nodule comme la légghémoglobine.

L'expérimentation présentée dans le Chapitre II des résultats a montré que la teneur en protéines totales des nodules de trèfle chute en conséquence de la diminution en S du milieu de culture. Une diminution des quantités de protéines nodulaires totales de $5.51 \mu\text{g.mgMF}^{-1}$ pour le traitement High S à $1.67 \mu\text{g.mgMF}^{-1}$ pour le traitement Zero S a été observée. La proportion de la sous unité FeMo de 54 kDa de la nitrogénase diminue de $0.32 \mu\text{g.mgMF}^{-1}$ pour le traitement High S à $0.16 \mu\text{g.mgMF}^{-1}$ pour le traitement Zero S. Ceci s'explique probablement par la forte proportion d'acides aminés S dans cette métalloprotéine bactérienne très abondante. Le S intervient au niveau de son centre catalytique (4Fe-4S) et chaque complexe actif de cette enzyme contient environ 75 acides aminés soufrés (Curatti *et al.*, 2006).

La quantité de légghémoglobine passe quant à elle de $0.22 \mu\text{g.mgMF}^{-1}$ en condition de forte disponibilité en S (High S) à $0.13 \mu\text{g.MF}^{-1}$ en condition d'absence de S. Dans le Chapitre I des résultats, nous avons observé des nodules très peu colorés en rose pour la

lignée faiblement fixatrice (VLF), qui traduisait des faibles teneurs en léghémoglobine. Pour les lignées fixatrices (NNU et LNU) la proportion de nodules colorés augmente quand le S est ajouté. Conformément à ce que Scherer *et al.* (2008) ont montré chez le pois ou la luzerne, la quantité de léghémoglobine du trèfle est réduite lors de l'insuffisance en S. Le S sous forme de S-adénosylméthionine (SAM) intervient dans la synthèse de l'hème ferrique utilisé dans la synthèse de la léghémoglobine. Le rôle de la léghémoglobine permet de maintenir une faible concentration en oxygène libre dans les nodules des légumineuses (Gordon *et al.*, 2001) et de limiter les dégâts liés aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Becana *et al.*, 2000 ; Naya *et al.*, 2007). Le S exercerait un contrôle important dans l'approvisionnement en O₂ des nodules. La leghémoglobine serait donc un point de contrôle important.

Ces modulations des protéines nodulaires du trèfle sont associées à une accumulation d'acides aminés riches en N dans les racines nodulées (Chapitre II des résultats). Ainsi la teneur en asparagine passe de 221 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS dans les racines nodulées du traitement High S à 1055 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS pour Zéro S, et les teneurs en arginine de 30 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS pour High S à 103 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS pour Zéro S. Ces données montrent que la déficience en S altère la synthèse des protéines des nodules. Il est probable que le manque de S réduise cette synthèse en raison du rôle clef des acides aminés S, comme cela a été observé dans les racines d'orge (Karmoker *et al.*, 1991a, 1991b). Tisdale *et al.* (1950) ont d'ailleurs montré une diminution de l'accumulation de cystéine et de méthionine chez la luzerne cultivée sur des solutions nutritives de concentration décroissante en sulfate.

Scherer et Lange (1996) et Neo et Layzell, (1997) ont postulé que l'accumulation de ces acides aminés pouvait diminuer la fixation du N₂ via un mécanisme de répression par rétrocontrôle chez le lupin et le soja. Chez le trèfle, un rétrocontrôle de la fixation par les acides aminés a été proposé en condition de déficience en P (Almeida *et al.*, 2000) et en eau (Serraj *et al.*, 2001).

III.3. Adaptation des nodules de trèfle face à la disponibilité en S

Malgré cette forte perturbation du métabolisme des nodules, il faut noter que l'absence de sulfate dans la solution nutritive réduit beaucoup plus la nodulation que la quantité d'N fixé. Ainsi, dans le chapitre II des résultats, la masse de nodules par plante est réduite de 99% alors que la quantité d'N fixé n'est réduite que de 81 % chez les plantes Zéro S comparativement aux plantes High S. Cette comparaison suggère que les nodules produits en absence de sulfate ont une activité spécifique particulièrement élevée.

Une forte augmentation de l'activité spécifique a également été observée chez le trèfle blanc cultivé en absence de PO_4^{2-} (Almeida *et al.*, 2000), ou cultivé en présence de concentration élevée en azote minéral (Zanetti *et al.*, 1998). Il a été montré que l'alimentation en O_2 pourrait jouer un rôle clef dans la régulation de la fixation en cas de stress nutritif. Ainsi, Neo et Layzell (1997) postulent que les acides aminés diminuent la fixation du N_2 en augmentant la résistance du nodule à l' O_2 . Ce mécanisme permettrait la régulation de la perméabilité aux gaz au sein du nodule probablement en considérant ces acides aminés accumulés en tant qu'osmoticum. Cette régulation de l'oxygène par l'intermédiaire d'osmoticum a également été émise par VandenBosch *et al.*, (1994) et Denison et Kinraide (1995).

Chez le trèfle, nous avons pu mettre en évidence une plasticité morphologique des nodules face à la disponibilité en S, elle se traduit par la variation de leur nombre et de leur forme, ainsi qu'une plasticité physiologique liée notamment aux protéines clefs de la fixation. L'intégration d'une composante physiologique et morphologique à l'analyse de la plasticité a permis de mettre en évidence une plasticité fonctionnelle de la fixation du N_2 .

C

onclusion et perspectives de recherche

« Ecoutez beaucoup afin de diminuer vos doutes ; soyez attentif à ce que vous dites afin de ne rien dire de superflu ; alors vous commettrez rarement des fautes. »
(Confucius)

Conclusion

L'association des outils d'écologie et de physiologie a permis de préciser l'effet de la disponibilité en S sur les performances du trèfle. Le trèfle est plastique vis-à-vis de la disponibilité en S. Cette plasticité a été mise en évidence au niveau du fonctionnement de la plante entière. En effet, le soufre est un macroélément, primordial notamment en tant que constituant protéique. Une déficience en S pénalise donc l'ensemble des fonctions biologiques de la plante. L'identification d'une carence en S chez le trèfle est rendue difficile du fait de cet effet global. Néanmoins, le ratio N/S rapporté à l'âge de la plante peut constituer un bon indicateur de la nutrition soufrée.

Nous avons choisi d'étudier la nutrition S parallèlement à la nutrition N, puisque l'N est l'élément clef du maintien des trèfles en prairie. Les travaux de cette thèse montrent une interaction très forte entre acquisition du S et acquisition de l'N. Si la réduction de l'absorption du nitrate résulte d'une moindre croissance racinaire, la réduction de la fixation du N₂ est spécifiquement modulée par la disponibilité en S. La baisse de la fixation chez les plantes déficientes en S s'explique essentiellement par une très forte réduction de la nodulation. Toutefois, nous avons parallèlement mis en évidence une réduction de la synthèse de protéines clefs comme la légghémoglobine et la nitrogénase. La sensibilité des Fabacées à la nutrition S résulte donc d'un rôle clef du S dans l'acquisition de l'N dans ces plantes fixatrices.

Le soufre module la biomasse finale du trèfle et l'effet du S sur la croissance est apparu relativement tôt dans nos cultures. La période d'accélération de croissance est très certainement la phase où la demande en S est la plus forte. Elle correspond donc à une période propice à la fertilisation.

Nos travaux ont également montré que le S du sol ne constitue pas la seule source de S utilisée par le trèfle. En effet, l'utilisation de ³⁴S nous a permis de montrer que le soufre atmosphérique peut constituer une source importante pour la croissance, à travers le dépôt foliaire.

Les engrais apportés aux prairies intègrent généralement les éléments N, P et K. Ce travail de thèse met en évidence l'importance de l'intégration du S dans les fertilisants.

L'apport de S, à l'inverse de l'apport de N pourrait permettre un maintien prolongé du trèfle dans les prairies.

Perspectives de Recherche

Nos résultats nous orientent vers une recherche d'indicateurs de la carence en S. Les fluctuations du rapport N/S au cours de la croissance du trèfle posent des problèmes lors de l'évaluation de l'état nutritionnel de la plante. L'identification d'un organe, tel que les jeunes feuilles, où le rapport N/S serait stable quelque soit l'âge du végétal donnerait accès à un indicateur pertinent du statut nutritionnel de la plante.

Notre étude a montré que le trèfle cultivé sur des solutions contenant peu ou pas de sulfate présente des capacités d'utilisation du S déposé par voie foliaire supérieures à celles des trèfles cultivés sur de plus fortes concentrations en sulfate. Les mécanismes impliqués n'ont pas pu être précisés. Il est établi que le flux entrant de S atmosphérique est fortement dépendant du gradient de concentration entre l'atmosphère et les tissus foliaires, et il serait intéressant de mesurer des teneurs en sulfate dans les feuilles pour évaluer ce gradient.

Jusqu'ici, nous nous sommes concentrés sur l'impact d'une déficience en S. Les traitements soufrés ont été choisis afin d'obtenir des disponibilités contrastées en S mais surtout limitantes pour la croissance du trèfle. Les courbes de dilution obtenues dans le chapitre IV des résultats, laissent penser que tout comme l'azote, il serait possible d'obtenir une valeur de teneur critique en S pour le trèfle. La mise en place de cultures comportant une plus large gamme de fertilisation soufrée et de balance N/S du substrat permettra d'établir de nouvelles courbes de dilution du S et ainsi d'identifier des teneurs critiques en soufre maximisant la production de biomasse aérienne du trèfle blanc. Ces valeurs permettront une meilleure gestion de la productivité des agrosystèmes constitués de trèfle et de mieux comprendre les relations entre nutrition azotée et soufrée.

Afin de replacer le trèfle dans le contexte d'une communauté végétale prairiale, il serait pertinent de comparer la plasticité du trèfle à celle de ses espèces compagnes, notamment les Poacées dans des situations de nutriments soufrés contrastés. D'autre part les capacités d'utilisation du dépôt foliaire du S du trèfle doivent être comparées à celles des autres espèces comme les Poacées. Dans des conditions de déficience en S, le dépôt foliaire permet-il un maintien du trèfle au sein des communautés malgré la forte fertilisation en N ?

Ce travail de thèse a également mis en évidence la forte interaction entre la nutrition en S et en N. Dans une optique de mise en place de fertilisation utilisant les éléments N, P, K et S, il faudrait s'intéresser aux interactions entre les éléments S-K, S-P et S-N-P-K.

Références

Références

A

- [1] **Abberton MT, Michaelson-Yeates TPT, Macduff JH.** 1998. Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). I. Dynamics of plant growth and nodule development in flowing solution culture. *Euphytica* **103**, 35–43.
- [2] **Abrol YP, Ahmad A.** 2003. Sulphur in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [3] **Ahmad A, Abdin MZ.** 2000. Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilisation. *Physiologia Plantarum* **110**, 144–149.
- [4] **Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Lüscher A.** 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **51**, 1289–1297.
- [5] **Anderson AJ, Spencer D.** 1950. Sulphur in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes. *Australian Journal of Scientific Research* **3**, 431–449.
- [6] **Andrieu N, Josien E, Duru M.** 2007. Relationships between diversity of grassland vegetation, field characteristics and land use management practices assessed at the farm level. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **120**, 359–369.
- [7] **Appels MA, Haaker H.** 1988. Identification of cytoplasmic nodule-associated forms of malate dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. *European Journal of Biochemistry* **171**, 515–522.
- [8] **Appleby CA.** 1984. Leghaemoglobin and rhizobial respiration. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 443–478.
- [9] **Appleby CA.** 1992. The origin and functions of haemoglobin in plants. *Science in Progress* **76**, 365–398.
- [10] **Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas RV.** 1998. Plant Hemoglobins. *Plant Physiology* **118**, 1121–1125.
- [11] **Atkin OK, Loveys BR, Atkinson LJ, Pons TL.** 2006. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *Journal of Experimental Botany* **57**(2), 267–281.
- [12] **Aulakh MS, Dev G, Arora BR.** 1976. Effect of sulphur fertilization on the nitrogen-sulphur relationships in alfalfa (*Medicago sativa* L. Pers.). *Plant and Soil* **45**, 75–80.

B

- [13] **Bailey JS, Laidlaw AS.** 1999. The interactive effects of phosphorus potassium, lime and molybdenum on the growth and morphology of white clover (*Trifolium repens* L.) at establishment. *Grass and Forage Science* **54**, 69–76.
- [14] **Barney BM, Igarashi RY, Dos Santos PC, Dean DR, Seefeldt LC.** 2004. Substrate Interaction at an Iron-sulfur face of the FeMo-cofactor during Nitrogenase catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 53621–53624.

- [15] **Bell CI, Clarkson DT, Cram WJ.** 1995. Sulphate supply and its regulation of transport in roots of a tropical legume *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. *Journal of Experimental Botany* **46**, 65-71.
- [16] **Benizri E, Amiaud B.** 2005. Relationships between plant and microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 2055-2067.
- [17] **Bergersen FJ.** 1982. Root Nodules of Legumes: structure and functions. Research Studies Press, Chichester RSP/J Wiley and Sons, Chichester.
- [18] **Bergersen FJ.** 1991. Physiological control of nitrogenase and uptake hydrogenase. In: Dilworth MJ, Glenn AR (eds.), *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, Elsevier, Amsterdam, 76–102.
- [19] **Beuve N, Rispaill N, Laîné P, Cliquet JB, Ourry A, Le Deunff E.** 2004. Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1035–1046.
- [20] **Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP.** 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulphur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* **118**, 1337-1344.
- [21] **Bloom A, Chapin FS, Mooney HA.** 1985. Resource limitation in plants. An economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 363-392.
- [22] **Blum H, Beier H, Gross HJ.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gel. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- [23] **Bohn HI, Barrow NS, Rajan SSS, Parfitt RL.** 1986. Reaction of inorganic sulphur in soils. In: Tabatabai MA (eds) *Sulphur in agriculture*. Agronomy Monograph, ASA, CSSA and ISSA, Madison WI, 233–249.
- [24] **Bolaños L, Martin M, El Hamdaoui A, Rivilla R, Bonilla I.** 2006. Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and be alleviated by B and Ca. *Plant and Soil* **280**, 135-142.
- [25] **Boller BC, Nösberger J.** 1987. Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrasses at low levels of ¹⁵N-fertilization. *Plant and Soil* **104**, 219-226.
- [26] **Bradford MM.** 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- [27] **Bradshaw AD.** 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* **13**, 115-155.
- [28] **Briggs WH, Goldman IL.** 2002. Variation in economically and ecologically important traits in onion plant organs during reproductive development. *Plant, Cell and Environment* **25**, 1031-1037.
- [29] **Bromfield AR.** 1972. Absorption of atmospheric sulphur by mustard (*Sinapis alba*) grown in a glasshouse. *Journal of agriculture Science* **78**, 343-344.
- [30] **Brunold C, Schmidt A.** 1978. Regulation of sulphate assimilation in plants. Cysteine inactivation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase in *Lemna minor* L.. *Plant Physiology* **61**, 342-347.
- [31] **Buchner P, Stuiver CEE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ.** 2004. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulphate nutrition. *Plant Physiology* **139**, 3396-3408.
- [32] **Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ.** 2004. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and longdistance transport. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1765-1773.
- [33] **Buis R.** 1991. On the generalization of the logistic law of growth. *Acta Biotheoretica* **39**, 185-195.

- [34] **Bullock JM, Pywell RF, Walker KJ.** 2007. Long-term enhancement of agricultural production by restoration of biodiversity. *Journal of Applied Ecology* **44**, 6-12.
- [35] **Burris RH.** 1974. Biological Nitrogen Fixation, 1924-1974. *Plant Physiology* **54**, 443-449.

⧻

- [36] **Caradus JR, Hay MJM, Mackay AD, Thomas VJ, Dunlop J, Lambert MG, Hart AL, Van den Bosch J, Wewala S.** 1993. Variation within white clover (*Trifolium repens* L.) for phenotypic plasticity of morphological and yield related characters, induced by phosphorus supply. *New Phytologist* **123**, 175-184.
- [37] **Carlsson G, Huss-Danell K.** 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legume in the fields. *Plant and soil* **253**, 353-372.
- [38] **Ceccotti SP.** 1996a. A global review of the nutrient sulphur balance, fertilizers, and the environment. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* Nov./Dec, 18-21.
- [39] **Ceccotti SP.** 1996b. Plant nutrient sulphur, a review of nutrient balance, environmental impact and fertilizers. *Fertilizer Research* **43**, 117-125.
- [40] **Ceccoti SP, Messick DL.** 1997. A global review of crop requirements, supply and environmental impact on nutrient sulphur balance. In: Cram WJ, De Kok LJ, Stulen I, Brunold C, Rennenberg H (eds.), *Sulphur Metabolism in Higher Plants*, Blackhuys Publishers, Leiden, 155-163.
- [41] **Chapin III FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH.** 1987. Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* **37**, 49-57.
- [42] **Chapin FS III, McGuire AD, Randerson J, Pielke R, Baldocchi D, Hobbie SE, Roulet N, Eugster W, Kasischke E, Rastetter EB, Zimov SA, Running SW.** 2000. Arctic and boreal ecosystems of western North America as components of the climate system. *Global Change Biology* **6**, 211-23.
- [43] **Cheng SH, Moore BD, Jingrui W, Edwards GE, Ku MSB.** 1989. Photosynthetic Plasticity in *Flaveria brownii* : Growth Irradiance and the Expression of C₄ Photosynthesis. *Plant Physiology* **89**, 1129-1135.
- [44] **Chopra J, Kaur N, Gupta AK.** 1998. Carbohydrate status and sucrose metabolism in mung bean roots and nodules. *Phytochemistry* **49**, 1891-1895.
- [45] **Citepa.** 2008. Air Emission in France, Mainland France, Substances causing acidification, eutrophication and photochemical pollution. (www.citepa.org).
- [46] **Clarkson DT, Smith FW, Van Den Berg PJ.** 1983. Regulation of sulphate transport in a tropical legume, *Macroptilium atropurpureum*, cv.Siratro. *Journal of Experimental Botany* **34**, 1463-1483.
- [47] **Clarkson DT, Saker LR.** 1989. Sulphate influx in wheat and barley roots becomes more sensitive to specific protein-binding reagents when plants are sulphate-deficient. *Planta* **178**, 249-257.
- [48] **Clarkson DT, Saker LR, Purves JV.** 1989. Depression of nitrate and ammonium transport in Barley plants with diminished sulphate status. Evidence of Co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *Journal of Experimental Botany*. **40**, 953-963.
- [49] **Clergue B, Amiaud B, Pervanchon F, Lasserre-Joulin F, Plantureux S.** 2005. Biodiversity: function and assessment in agricultural areas. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 1-16.
- [50] **Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, Kopka J, Udvardi MK.** 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* **39**, 487-512.

- [51] Coleman JS, McConnaughay KDM, Ackerly DD. 1994. Interpreting phenotypic variation in plants. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 187–191.
- [52] Cowling DW, Jones LHP, Lockyer DR. 1973. Increased yield through correction of sulphur deficiency in ryegrass exposed to sulphur dioxide. *Nature* **243**, 479-480.
- [53] Cram WJ. 1983. Sulphate accumulation is regulated at the tonoplast. *Plant Science Letters* **31**, 329-338.
- [54] Crick JC, Grime JP. 1987. Morphological plasticity and mineral nutrient capture in two herbaceous species of contrasted ecology. *New Phytologist* **107**, 403-414.
- [55] Crockard MA, Bjourson AJ, Dazzo FB, Cooper JE. 2002. A white clover nodulin gene, dd23b, encoding a cysteine cluster protein, is expressed in roots during the very early stages of interaction with *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii and after treatment with chitolipooligosaccharide Nod factors. *Journal of Plant Research* **115**, 439–447.
- [56] Cumino C, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL. 2007. Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation. *Plant Physiology* **143**, 1385 - 1397.
- [57] Curatti L, Ludden PW, Rubio LM. 2006. Nif B-dependent in vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5207-5301.
- [58] Curtin D, Syers JK. 1990. Extractability and adsorption of sulphate in soils. *Journal of Soil Science* **41**, 305-312.
- [59] Cusset. 1991. Les modèles sigmoïdes en biologie végétale. *Acta Biotheoretica* **39**, 197-205.

D

- [60] Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 61–71.
- [61] Dazzo F, Hubbell DH. 1975. Cross-Reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-Clover association. *Applied Microbiology* **30(6)**, 1017-1033.
- [62] Dazzo FB, Yanke WE, Brill WJ. 1978. Trifoliin: a *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Biochimica et Biophysica Acta* **539**, 279-286.
- [63] de Jong G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* **166** (1), 101-117.
- [64] de Jong G. 1990. Quantitative genetics of reaction norms. *Journal of Evolutionary Biology* **3**, 447-468.
- [65] De Kok LJ. 1990. Sulfur metabolism in plants exposed to atmospheric sulfur. In: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I (eds.), *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: fundamental, environmental, and agricultural aspects*, SPB Academic Publishing, The Hague, 111-130.
- [66] De Kok LJ, Stulen I, Grill D, Tausz M. 2002. Special Issue: Responses of plant metabolism to air pollution and global change. *Phyton* **42**, 272pp.
- [67] De Kok LJ, Westerman S, Stuiver CEE, Weidner W, Stulen I, Grill D. 2002. Interaction between atmospheric hydrogen sulfide deposition and pedospheric sulfate nutrition in *Brassica oleracea* L. *Phyton* **42**, 35-44.
- [68] De Kok LJ, Castro A, Durenkamp M, Koralewska A, Posthumus FS, Elisabeth C, Stuiver E, Yang L, Stulen I. 2005. Pathway of plant sulfur uptake and metabolism-an overview. *Laudbauforschung Völkenrode* **283**, 5-13.

- [69] **De Kok LJ, Durenkamp M, Yang L, Stulen I.** 2007. Atmospheric sulfur. In: Hawkesford MJ, De Kok LJ (eds.), *Sulfur in plants - an ecological perspective*, Springer-Verlag, Dordrecht, 91-106.
- [70] **Dean DR, Bolin JT, Zheng L.** 1993. Nitrogenase metallo-clusters: structures, organization, and synthesis. *Journal of Bacteriology* **175**, 6737-6744.
- [71] **DeBoer DL, Duke SH.** 1982. Effects of sulphur nutrition on nitrogen and carbon metabolism in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Physiologia Plantarum* **54**, 343-350.
- [72] **Dedourge O, Vong PC, Lasserre-Joulin F, Benizri E, Guckert A.** 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-S-35, microbial biomass-S-35 and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science* **55**, 649-656.
- [73] **Denison RF, Kinraide TB.** 1995. Oxygen-Induced Membrane Depolarizations in legume Root Nodules. *Plant Physiol* **108**, 235-240.
- [74] **Derome J, Nieminen T, Saarsalmi A.** 2004. Sulphur dioxide absorption in Scots pine canopies exposed to high ammonia emissions near a Cu-Ni smelter in SW Finland. *Environmental Pollution* **129**, 79-88.
- [75] **DeWitt TJ.** 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity: tests with predator-induced morphology and life history in a freshwater snail. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 465-480.
- [76] **DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS.** 1998. Costs and limits to benefits as constraints on the evolution of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 77-81.
- [77] **D'Haeze W, Holsters M.** 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**, 79R - 105R.
- [78] **Dijkshoorn W, Van Wijk AL.** 1967. The sulphur requirements of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter. A review of published data. *Plant and Soil* **26**, 129-157.
- [79] **Dixon ROD, Wheeler CT.** 1986. *Nitrogen Fixation in Plants*. Chapman and Hall, New York, 157pp.
- [80] **Drennan PM, Nobel PS.** 1998. Root growth dependence on soil temperature for *Opuntia ficus-indica*: influences of air temperature and a doubled CO₂ concentration. *Functional Ecology* **12**, 959-964.
- [81] **Droux M.** 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79**, 331-348.



- [82] **Elberse IAM, van Damme JMM, van Tienderen PH.** 2003. Plasticity of growth characteristics in wild barley (*Hordeum spontaneum*) in response to nutrient limitation. *Journal of Ecology* **91**, 371-382.



- [83] **Falkowski PG.** 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* **387**, 272-275.
- [84] **Faurie O, Soussana J-F.** 1993. Oxygen-induced recovery from short-term nitrate inhibition of N₂ fixation in white clover plants from spaced and dense stands. *Physiologia Plantarum* **89**, 467-475.
- [85] **Filner P, Rennenberg H, Sekiya J, Bressan RA, Wilson LG, Le cureux L, Shimeri T.** 1984. Biosynthesis and emission of hydrogen sulfide by higher plants. In: Kiziol J, Whatley FR (eds.), *Gaseous air pollutants and plant metabolism*, Butterworth, London, 291-312.

- [86] Fisher RA. 1921. Some remarks on the methods formulated in a recent article on 'The quantitative analysis of plant growth'. *Annals of applied Biology* **7**, 367-372.
- [87] Fismes J, Vong PC, Guckert A, Frossard E. 2000. Influence of sulphur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* **12**, 127-141.
- [88] Forde BG. 2002a. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. Annual Review of *Plant Biology*. **53**, 203–224.
- [89] Forde BG. 2002b. The role of long distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany* **53**, 39-43.
- [90] Forde BG, Lorenzo H. 2001. The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**, 51–68.
- [91] Frankow-Lindberg BE. 1999. Effects of adaptation to winter stress on biomass production, growth and morphology of three contrasting white clover cultivars. *Physiologia Plantarum* **106**, 196-202.
- [92] Friedrich JW, Schrader LE. 1978. Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. *Plant Physiology* **61**, 900-903.
- [93] Friend JP. 1973. The global sulphur cycle. In: Rasool SI (ed.), Chemistry of the lower atmosphere, Plenum Press, New York, 177-201.
- 
- [94] Garland T Jr, Kelly SA. 2006. Phenotypic plasticity and experimental evolution. *The Journal of Experimental Biology* **209**, 2344-2361.
- [95] Garnier E. 1992. Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *Journal of Ecology* **80**, 665-675.
- [96] Gastal F, Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of experimental Botany* **53**, 789-799.
- [97] Gautier H, Varlet-Grancher C, Membré JM. 2001. Plasticity of petioles of white clover (*Trifolium repens*) to blue light. *Physiologia Plantarum* **112**, 293–300.
- [98] Gedroc JJ, McConnaughay KDM, Coleman JS. 1996. Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? *Functional Ecology* **10**, 44-50.
- [99] Gilbert MA, Robson AD. 1984. The effect of sulfur supply on the root characteristics of subterranean clover and annual ryegrass. *Plant and Soil* **77**, 377-380.
- [100] Gilbert SM, Clarkson DT, Cambridge M, Lambers H, Hawkesford MJ. 1997. SO₄²⁻ deprivation has an early effect on the content of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiology* **115**, 1231-1239.
- [101] Goggin DE, Lipscombe R, Fedorova E, Millar H, Mann AJ, Atkins CA, Smith PMC. 2003. Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotide synthetase in cowpea. *Plant Physiology* **131**, 1033-1041.
- [102] Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* **120**, 867–877.
- [103] Gordon AJ, Kessler W, Minchin FR. 1990a. Defoliation-Induced Stress in Nodules of White Clover: I. Changes in physiological parameters and protein synthesis. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1245-1253.

- [104] **Gordon AJ, Kessler W.** 1990b. Defoliation-Induced Stress in Nodules of White Clover: II. Immunological and enzymic measurements of key proteins. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1255-1262.
- [105] **Gordon AJ, Lea PJ, Rosenberg C, Trinchant JC.** 2001. Nodule formation and function. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF (eds.), *Plant Nitrogen*, Springer-Verlag/Institute National de la Recherche Agronomique, Berlin, 101-138.
- [106] **Goulas E, Le Dily F, Teissedre L, Corbel G, Robin C, Ourry A.** 2001. Vegetative Storage Proteins in White Clover (*Trifolium repens* L.): Quantitative and Qualitative Features. *Annals of Botany* **88**, 789-795.
- [107] **Goulas E, Le Dily F, Simon JC, Ourry A.** 2002. Morphological pattern of development affects the contribution of nitrogen reserves to regrowth of defoliated white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **53**, 1941-1948.
- [108] **Grime JP.** 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. Wiley, Chichester, 222pp.
- [109] **Grime JP.** 2001. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*, John Wiley & sons, Chichester.
- [110] **Grime JP, Hunt R.** 1975. Relative growth rate: Its range and adaptive significance in a local flora. *Journal of Ecology* **69**, 393-422.
- [111] **Grime JP, Crick JC, Rincon JE.** 1986. The ecological significance of plasticity. In: Jennings DH, Trewavas AJ (eds.), *Plasticity in plants*, Company of Biologists, Cambridge, 5-30.
- [112] **Grime JP, Hodgson JG, Hunt R.** 1988. *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*, Unwin Hyman, London, 742pp.
- [113] **Grime JP, Mackey JML.** 2002. The role of plasticity in resource capture by plants. *Evolutionary Ecology* **16**, 299-307.
- [114] **Grünhage L, Dammgen U, Haenel HD, Jäger HJ.** 1998. Response of a grassland ecosystem to air pollutants. VI. The chemical climate: concentrations and potential flux densities of relevant criteria pollutants. *Environmental Pollution* **101**, 215-220.
- [115] **Guckert A, Hay RKM.** 2001. The Overwintering, Spring Growth, and Yield in Mixed Species Swards, of White Clover in Europe. *Annals of Botany* **88**, 667-668.
- [116] **Gunttrip J, Sibly RM.** 1998. Phenotypic plasticity, genotype-by-environment interaction and the analysis of generalism and specialization in *Callosobruchus maculatus*. *Heredity* **81**, 198-204.
- [117] **Gylfadóttir T, Helgadóttir A, Høgh-Jensen H.** 2007. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. *Plant and Soil* **297**, 93-104.



- [118] **Abtemichial KH, Singh BR, Aune JB.** 2007. Wheat response to N₂ fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulfur fertilization and rhizobial inoculation in semi-arid Northern Ethiopia. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**, 412-418.
- [119] **Halbleid CM, Ludden PW.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition* **130**, 1081-1084.
- [120] **Haneklaus S, Bloem E, Schnug E.** 2003. The global sulphur cycle and its links to plant environment. In: Abrol YP, Ahmad A (eds) *Sulphur in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-28.

- [121] **Hartwig UA.** 1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation : a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**, 92–120.
- [122] **Hartwig UA, Heim I, Lüscher A, Nösberger J.** 1994. The nitrogen sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiologia Plantarum* **92**, 375-382.
- [123] **Harutyunyan EH, Safonova TN, Kuranova IP, Popov AN, Teplyakov AV, Obmolova GV, Rusakov AA, Vainshtein BK, Dodson GG, Wilson JC, Perutz MF.** 1995. The Structure of Deoxy- and Oxy-leghaemoglobin from Lupin. *Journal of Molecular Biology* **251**, 104–115.
- [124] **Hawkesford MJ.** 2003. Transporter gene families in plants: the sulfate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* **117**, 155-163.
- [125] **Hawkesford MJ, Buchner P, Hopkins L, Howarth JR.** 2003. The plant sulfate transporter family: specialized functions and integration with whole plant nutrition. In: Davidian JC, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H (eds.), *Sulfur Transport and Assimilation in Plants: Regulation, Interaction, Signaling*, Backhuys Publishers, Leiden, 45-56.
- [126] **Hawkesford MJ, Davidian JC, Grignon C.** 1993. Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* **190**, 297-304.
- [127] **Hawkesford MJ, De Kok LJ.** 2006. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment* **29**, 382-395.
- [128] **Haynes RJ.** 1980. Competitive aspects of the grass-legume association. *Advances in Agronomy* **33**, 227-261.
- [129] **Hedin LO, Likens GE.** 1996. Atmospheric dust and acid rain. *Scientific American* **275**, 88-92.
- [130] **Heidstra R, Nilsen G, Martinez-Abarca F, van Kammen A, Bisseling T.** 1997. Nod factor–induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH₄NO₃ inhibition on root hair deformation. *The American Phytopathological Society* **10**, 215–220.
- [131] **Heller M.** 1984. *Physiologie végétale. Tome II. Développement*, Masson, Paris, 20pp.
- [132] **Hellsten A, Huss-Danell K.** 2000. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science* **50**, 135–142.
- [133] **Hermanutz LA, Weaver SE.** 1996. Agroecotypes or phenotypic plasticity? Comparison of agrestal and ruderal populations of the weed *Solanum ptycanthum*. *Oecologia* **105**, 271-280.
- [134] **Hesse H, Nikiforova V, Gakière B, Hoefgen R.** 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* **55** (401), 1283-1292.
- [135] **Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K.** 2003. Global expression profiling of sulfur starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal* **33**, 651-653.
- [136] **Hodge A.** 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**, 9-24.
- [137] **Hoffmann WA, Poorter H.** 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany* **80**, 37-42.
- [138] **Hoffmann C, Stockfisch N, Koch H.** 2004. Influence of sulphur supply on yield and quality of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)-Determination of a threshold value. *European Journal of agronomy* **21**, 69-80.

- [139] Høgh-Jensen H. 2003. The effect of potassium deficiency on growth and N₂-fixation in *Trifolium repens*. *Physiologia Plantarum* **119**, 440-449.
- [140] Høgh-Jensen H. 2006. Commentary: The nitrogen transfer between plants: an important but difficult flux to quantify. *Plant and Soil* **282**, 1-5.
- [141] Høgh-Jensen H, Schjoerring JK. 2000. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by ¹⁵N leaf feeding compared with indirect dilution of soil ¹⁵N. *Plant and Soil* **227**, 171-183.
- [142] Høgh-Jensen H, Schjoerring JK. 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 439-448.
- [143] Høgh-Jensen H, Schjoerring JK, Soussana JF. 2002. The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover plants. *Annals of Botany* **90**, 754-753.
- [144] Høgh-Jensen HH. 2003. The effect of potassium deficiency on growth and N₂-fixation in *Trifolium repens*. *Physiologia Plantarum* **119**, 440-449.
- [145] Hooper DU, Chapin III FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J., Wardle DA. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**, 3-35.
- [146] Hopkins L, Parmar S, Blaszczyk A, Hesse H, Hoefgen R, Hawkesford MJ. 2005. O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in Potato. *Plant Physiology* **138**, 433-440.
- [147] Hopmans P, Chalk PM, Douglas LA. 1983. Symbiotic N₂ fixation by legumes growing in pots. I: Fixation of ¹⁵N-labelled N₂ and C₂H₂ reduction by *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil* **74**, 325-332.
- [148] Howard JB, Rees DC. 2006. How many metals does it take to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17088-17093.
- [149] Hu ZY, Zhao FJ, McGrath SP. 2005. Sulphur fractionation in calcareous soils and bioavailability to plants. *Plant and Soil* **268**, 103-109.
- [150] Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew A. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany* **90**, 485-488.
- [151] Hunt S, Layzell DB. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 483-511.
- [152] Hunt WF, Loomis RS. 1976. Carbohydrate-limited growth kinetics of Tobacco (*Nicotiana rustica* L.) Callus. *Plant Physiology* **57**, 802-805.



- [153] Jmsande J. 1998. Iron, Sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in Plant Physiology. *Physiologia Plantarum* **103**, 139-144.
- [154] Israel DW. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology* **84**, 835-840.

J

- [155] **Jacquemyn H, Brys R, Hermy M.** 2003. Short-term effects of different management regimes on the response of calcareous grassland vegetation to increased nitrogen. *Biological Conservation* **111**, 137-147.
- [156] **Joggi D, Hofer U, Nösberger J.** 1983. Leaf area index, canopy structure and photosynthesis of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant, Cell and Environment* **6**, 611-616.
- [157] **Johnson HA, Biondini ME.** 2001. Root morphological plasticity and nitrogen uptake of 59 plant species from the Great Plains grasslands, U.S.A. *Basic and Applied Ecology* **2**, 127-143.
- [158] **Jouven M, Baumont R.** 2008. Simulating grassland utilization in beef sucker systems to investigate the trade-offs between production and floristic diversity. *Agricultural Systems* **96**, 260-272.

K

- [159] **Kalia VC, Drevon JJ.** 1985. Variation in nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) during the in situ incubation of root nodules of *Glycine max* (L.) Merr. *Comptes Rendus Biologie* **301**, 591-596.
- [160] **Karmoker JL, Clarkson DT, Saker LR, Rooney JM, Purves JV.** 1991. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and osmotic hydraulic conductance of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* **185**, 269-278.
- [161] **Kawashima K, Suganuma N, Tamaoki M, Kouchi H.** 2001. Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. *Plant Physiology* **125**, 641-651.
- [162] **Kertesz MA, Mirleau P.** 2004. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1939-1945.
- [163] **Kikham FW, Tallowin JRB, Sanderson RA, Bhogal A, Chambers BJ, Stevens DP.** 2008. The impact of organic and inorganic fertilizers and lime on the species-richness and plant functional characteristics of hay meadow communities. *Biological Conservation* **141**, 1411-1427.
- [164] **Kim H, Hirai MY, Hayashi H, Chino M, Naito S, Fujiwara T.** 1999. Role of O-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulphur and nitrogen nutrition. *Planta* **209**, 282-289.
- [165] **Kirongo BB, Mason EG.** 2003. Decline in relative growth rate of 3 juvenile radiata pine clones subjected to varying competition levels in Canterbury, New Zealand. *Annals of Forest Science* **60**, 585-591.
- [166] **Knop E, Kleijn D, Herzog F, Schmid B.** 2006. Effectiveness of the Swiss agri-environment scheme in promoting biodiversity. *Journal of Applied Ecology* **43**, 120-127.
- [167] **Kopriva S, Koprivova A.** 2004. Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1775-1783.
- [168] **Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Krämer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N, Udvardi MK.** 2005. The Sulfate Transporter SST1 is Crucial for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* Root Nodules. *The Plant Cell* **17**, 1625-1636.
- [169] **Kurkdjian A, Guern J.** 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 271-303.
- [170] **Kuzma MM, Hunt S, Layzell DB.** 1993. Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiology* **101**, 161-169.

L

- [171] **Labarre M.** 2006. Les hémoglobines tronquées de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Thèse, Laval, Quebec, 139pp.
- [172] **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the heat bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- [173] **Lange A.** 1998. Einfluß der Schwefel-Versorgung auf die biologische Stickstoff-Fixierung von Leguminosen. Ph.D. thesis, University of Bonn, Germany.
- [174] **Lappartient AG, Touraine B.** 1996. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. *Plant Physiology* **111**, 147-157.
- [175] **Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B.** 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulphurylase and sulphate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant Journal* **18**, 89-95.
- [176] **Larcher W.** 1995. Physiological Plant Ecology. Springer-Verlag, Berlin, 506pp.
- [177] **Lavorel S, McIntyre S, Landsberg J, Forbes TDA.** 1997. Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Tree* **12**, 474-478.
- [178] **Le Roux MR, Khan S, Valentine AJ.** 2008. Organic acid accumulation may inhibit N_2 fixation in phosphorus-stressed lupin nodules. *New Phytologist* **177**, 956-964.
- [179] **Ledgard SF, Steele KW.** 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil* **141**, 137-153.
- [180] **Lee SC, Holm RH.** 2003. Speculative synthetic chemistry and the nitrogenase problem. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **100**, 3595-3600.
- [181] **Lee TD, Reich PB, Bolstad PV.** 2005. Acclimation of leaf respiration to temperature is rapid and related to specific leaf area, soluble sugars and leaf nitrogen across three temperate deciduous tree species. *Functional Ecology* **19**, 640-647.
- [182] **Lessmann JM, Brix H, Bauer V, Clevering OA, Comin FA.** 2001. Effect of climatic gradients on the photosynthetic responses of four *Phragmites australis* populations. *Aquatic Botany* **69**, 109-126.
- [183] **Lesuffleur F.** 2007. Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Doctorat de l'Université de Caen. 190pp.
- [184] **Leustek T, Saito K.** 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **120**, 637-644.
- [185] **Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP.** 2000. Pathways and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 141-165.

M

- [186] **Macduff JH, Jackson SB.** 1992. Influx and Efflux of Nitrate and Ammonium in Italian Ryegrass and White Clover Roots: Comparisons between Effects of Darkness and Defoliation. *Journal of Experimental Botany* **43**, 525-535.
- [187] **Macduff JH, Jarvis SC, Davidson IA.** 1996. Inhibition of N_2 fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) at low concentrations of NO_3^- in flowing solution culture. *Plant and Soil* **180**, 287-295.

- [188] **Majernik O, Mansfield T.** 1971. Effects of SO₂ pollution on stomatal movements in *Vicia Faba*. *Journal of Phytopathology* **71**, 123-128.
- [189] **Malcolm DC, Garforth MF.** 1977. The sulphur: nitrogen ratio of conifer foliage in relation to atmospheric pollution with sulphur dioxide. *Plant and Soil* **47**, 89-102.
- [190] **Mann ME, Bradley RS, Malcolm K., Hughes MK.** 1998. Global-scale temperature patterns and climate forcing over the past six centuries. *Nature* **392**, 779-787.
- [191] **Marissink M, Hansson M.** 2002. Floristic composition of Swedish semi-natural grassland during six years of elevated atmospheric CO₂. *Journal of Vegetation Science* **13**, 733-742.
- [192] **Martinez-Meier A, Sanchez L, Pastorino M, Gallo L, Rozenberg P.** 2008. What is hot in tree rings? The wood density of surviving Douglas-firs to the 2003 drought and heat wave. *Forest Ecology and Management* **256**, 837-843.
- [193] **Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H.** 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effect on sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology* **132**, 597-605.
- [194] **Mathot M, Mertens J, Verlinden G, Lambert R.** 2008. Positive effects of sulphur fertilisation on grasslands yields and quality in Belgium. *European Journal of Agronomy* **28**, 655-658.
- [195] **May MK, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D.** 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649-667.
- [196] **McConnaughay KDM, Coleman JS.** 1999. Biomass allocation in plants: ontogeny or optimality? A Test along three resource gradients. *Ecology* **80**, 2581-2593.
- [197] **Mc Neill AM, Eriksen J, Bergström L, Smith KA, Marstop H, Kirchmann H, Nilsson I.** 2005. *Soil use and Management* **21**, 82-93.
- [198] **Mechin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C.** 2003. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**, 1299-1302.
- [199] **Mertz T, Matsumoto H.** 1956. Further studies on the Amino Acids and Proteins of Sulfur-Deficient Alfalfa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **63**, 50-63.
- [200] **Meziane D, Shipley B.** 1999. Interacting components of interspecific relative growth rate: constancy and change under differing conditions of light and nutrient supply. *Functional Ecology* **13**, 611-622.
- [201] **Michaelson-Yeates TPT, Macduff JH, Abberton MT, Raistrick N.** 1998. Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). II. Variation in N₂ fixation, NO₃⁻ uptake and their interactions. *Euphytica* **103**, 45-54.
- [202] **Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M.** 2000. Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules: cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* **124**, 1381-1392.
- [203] **Morin X, Viner D, Chuine I.** 2008. Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *Journal of Ecology* **96**, 784-794.
- [204] **Moriuchi KS, Winn AA.** 2005. Relationships among growth, development and plastic response to environment quality in a perennial plant. *New Phytologist* **166**, 149-158.
- [205] **Morris RJ.** 2007. Sulphur in Agriculture: Global Overview. *Fertilizer Focus. Sulphur in Agriculture.* (January/February): 12-16.

- [206] **Mortensen J, Eriksen J.** 1994. Effect of sulphur deficiency on amino acid composition. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **15**, 135–142.
- [207] **Morton JD, Smith LC, Metherell AK.** 1999. Pasture yield response to phosphorus, sulphur and potassium applications on North Otago soils, New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **42**, 133-146.
- [208] **Mosquera-Losada MR, Fernandez-Nunez E, Rigueiro-Rodríguez A.** 2004a. Shrub and tree potential as animal food in Galicia, NW Spain. In: Anderson, F., Birot, Y., Päivinen, (eds.), Towards the Sustainable Use of Europe's Forests—Forests Ecosystem and Landscape Research: Scientific Challenges and Opportunities. European Forest Institute, Joensuu, 285– 294.
- [209] **Mosquera-Losada MR, Gonzalez-Rodriguez A, Rodriguez AR.** 2004b. Fertilization with nitrogen and potassium on pastures in temperate areas. *Journal of Range Management* **57**, 280-290.
- [210] **Mountford JO, Lakhani KH, Holland RJ.** 1996. Reversion of grassland vegetation following the cessation of fertilizer application. *Journal of vegetation Science* **7**, 219-228.
- [211] **Mulder L, Hogg B, Bersoult A, Cullimore JV.** 2005. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum* **123**, 207-218.
- [212] **Murphy MD.** 2002. Beneficial Effects of Sulphur fertilization on Agricultural Crops and some Implications for Livestock Nutrition. *Sulphur Fertilization* **3**, 47-57.
- [213] **Murphy MD, Boggan JM.** 1988. Sulphur deficiency in herbage in Ireland. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **27**, 83-90.
- [214] **Murphy MD, Quirke WA.** 1997. The effect of sulphur/nitrogen/selenium interactions on herbage yield and quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **36**, 31-38.
- [215] **Murray F.** 1985. Some responses of Ladino Clover (*trifolium repens* L. regal) to low concentration of sulphur dioxide. *New Phytologist* **100**, 57-62.

N

- [216] **Návas ML, Garnier E.** 2002. Plasticity of whole plant and leaf traits in *Rubia peregrina* in response to light, nutrient and water availability. *Acta Oecologica* **23**, 375-383.
- [217] **Naya L, Ladrera R, Ramos J, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Minchin FR, Becana M.** 2007. The Response of Carbon Metabolism and Antioxidant Defences of Alfalfa Nodules to Drought Stress and to the Subsequent Recovery of Plants. *Plant Physiology* **144**, 1104–1114.
- [218] **Neo HH, Layzell DB.** 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology* **113**, 259-267.
- [219] **Noble IR, Slatyer RO.** 1980. The use of vital attributes to predict successional changes in plant communities subject to recurrent disturbances. *Vegetatio* **43**, 5-21.
- [220] **Noquet C, Avice JC, Rossato L, Beauclair P, Henry MP, Ourry A.** 2004. Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**, 1007-1018.
- [221] **Novoplansky A.** 2002. Developmental plasticity in plants: implications of noncognitive behavior. *Evolutionary Ecology* **16**, 177–188.



- [222] **Okano K, Machida T, Totsuka T.** 1988. Absorption of atmospheric NO₂ by several herbaceous species: estimation by the ¹⁵N dilution method. *New Phytologist* **109**, 203-210.
- [223] **Olivera M, Tejera N, Iribarne, Ocana A, Lluch C.** 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* **121**, 498-505.



- [224] **Pacyna S, Schulz M, Scherer HW.** 2006. Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*Vicia faba minor* L.). *Biology and Fertility of Soils* **42**, 324-329.
- [225] **Pardos M, Puértolas J, Aranda I, Pardos JA.** 2006. Can CO₂ enrichment modify the effect of water and high light stress on biomass allocation and relative growth rate of cork oak seedlings? *Trees* **20**, 713-724.
- [226] **Parsons R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI.** 1993. Nodule growth and activity may be regulated by feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant, Cell and Environment* **16**, 125-136.
- [227] **Pasricha NS, Fox RL.** 1993. Plant nutrient sulphur in the tropics and sub-tropics. *Advances in Agronomy* **50**, 209-269.
- [228] **Pasricha NS, Abrol YP.** 2001. Food production and plant nutrient sulphur. In: Abrol YP, Ahmad A (eds.), Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers, London, 29-44.
- [229] **Patriarca EJ, Tatè R, Iaccarino M.** 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 203-222.
- [230] **Paynel F, Murray PJ, Cliquet JB.** 2001. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and Ryegrass. *Plant and Soil* **229**, 235-243.
- [231] **Peiser G, Yang SF.** 1985. Biochemical and physiological effects of SO₂ on non photosynthetic processes in plants. In: Winner WE, Mooney HA, Golstein RA (eds), Sulfur dioxide and vegetation, Stanford University Press, Stanford California, 148- 161.
- [232] **Peiser GD, Yang SF.** 1977. Chlorophyll Destruction by the Bisulfite-Oxygen System. *Plant Physiology* **60**, 277-281.
- [233] **Pfanz H, Martinoia E, Lange OL, Heber U.** 1987. Flux of SO₂ into leaf cells and cellular acidification by SO₂. *Plant Physiology* **85**, 928-933.
- [234] **Philip-Hollingsworth S, Hollingsworth RI, Dazzo FB, Djordjevic MA, Rolfe BG.** 1989. The effect of interspecies transfer of Rhizobium host-specific nodulation genes on acidic polysaccharide structure and in situ binding by host lectin. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 5710-5714.
- [235] **Pigliucci M.** 1997. Ontogenetic phenotypic plasticity during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **84**, 887-895.
- [236] **Pigliucci M.** 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 481-486.
- [237] **Pigliucci M.** 2006a. Evolutionary biology: Puzzle solving or paradigm shifting? *The quarterly Review of Biology* **81**, 377-379.
- [238] **Pigliucci M.** 2006b. Genetic variance-covariance matrices: a critique of the evolutionary quantitative genetics research program. *Biology and Philosophy* **21**, 1-23.

- [239] **Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD.** 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* **209**, 2362-2367.
- [240] **Piper JK.** 1995. Composition of prairie plant-communities on productive versus unproductive sites in wet and dry years. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1635-1644.
- [241] **Poorter H.** 1989a. Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. In: Lambers H, Cambridge ML, Konings H, Pons TL (eds.) Causes and consequences of variation in growth rate and productivity in higher plants. SPB Academic Publishing, The Hague, 49–68.
- [242] **Poorter H.** 1989b. Plant growth. *Physiologia Plantarum* **75**, 237-244.
- [243] **Poorter H, Remkes C.** 1990. Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia* **83**, 553-559.
- [244] **Portsmuth A, Niinemets Ü.** 2007. Structural and physiological plasticity in response to light and nutrients in five temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Functional Ecology* **21**, 61-77.
- [245] **Potvin C, Tousignant D.** 1996. Evolutionary consequences of simulated global change: genetic adaptation or adaptive phenotypic plasticity. *Oecologia* **108**, 683-693.
- [246] **Power ME, Tilman D, Estes JA, Menge BA, Bond WJ, Mills LS, Daily G, Castilla JC, Lubchenco J, Paine RT.** 1996. Challenges in the quest for keystones. *BioScience* **46**, 609-620.
- [247] **Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT.** 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* **52**, 113-121.
- [248] **Puppo A, Monny C, Davies MJ.** 1993. Glutathione-dependent conversion of ferryl leghaemoglobin into the ferric form: a potential protective process in soybean (*Glycine max*) root nodules. *Biochemistry Journal* **289**, 435-438.
- [249] **Purcell LC, Sinclair TR.** 1994. An osmotic hypothesis for the regulation of oxygen permeability in soybean nodules. *Plant, Cell and Environment* **17**, 837-843.
- [250] **Pywell RF, Bullock JM, Tallowin JB, Walker KJ, Warman EA, Masters G.** 2007. Enhancing diversity of species-poor grasslands: an experimental assessment of multiple constraints. *Journal of Applied Ecology* **44**, 81-94.



- [251] **Ramade F.** 1993. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Ediscience international, Paris, 822pp.
- [252] **Ranieri A, Pieruccetti F, Panicucci A, Castagna A, Lorenzini G, Soldatini GF.** 1999. SO₂-induced decrease in photosynthetic activity in two barley cultivars. Evidence against specific damage at the protein-pigment complex level. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 919-929.
- [253] **Rausch T, Wachter A.** 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* **10**, 503–509.
- [254] **Rehfeldt G, Wykoff WR, Ying CC.** 2001. Physiologic plasticity, evolution, and impacts of a changing climate on *Pinus contorta*. *Climatic Change* **50**, 355–376.
- [255] **Reich PB, Tilman D, Vraine J, Ellsworth D, Tjoelker MGT, Knops J, Wedin D, Naoem S, Bahaeddin D, Goth J, Bengtson W, Lee TD.** 2001. Do species and functional groups differ in acquisition and use of C, N and water under varying atmospheric CO₂ and N availability regimes? A field test with 16 grassland species. *New Phytologist* **150**, 435–448.

- [256] **Rennenberg H, Polle A.** 1994. Metabolic consequences of atmospheric sulphur influx into plants. In Alscher RG, Wellburn AR (eds), *Plant responses to the gaseous environment*, Chapman & Hall, London, 165-180.
- [257] **Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L.** 1979. Long distance transport of sulphur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* **147**, 57-62.
- [258] **Reuveny Z, Dougall DK, Trinity PM.** 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **77**, 6670-6672.
- [259] **Richard CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M.** 2006. Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters* **9**, 981-993.



- [260] **Saito K.** 2000. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulphur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 188-195.
- [261] **Saito K.** 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling read. *Plant Physiology* **136**, 2443-2450.
- [262] **Saito, K, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Sirko A, Rennenberg H.** 2005. Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the Post Genomic Era. Backhuys Publishers, Leiden, 365pp.
- [263] **Sangakkara UR, Hartwig UA, Nösberger J.** 1996. Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic nitrogen fixation in faba bean and common bean. *Plant and Soil* **184**, 123-130.
- [264] **Santana MA, Pihakaski-Maunsbach K, Sandal N, Marker KA, Smith AG.** 1998. Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiology* **116**, 1259-1269.
- [265] **Scheiner SM.** 1993. Evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 35-68.
- [266] **Scherer HW.** 2001. Sulphur in crop production-Invited paper. *European Journal of Agronomy* **14**, 81-111.
- [267] **Scherer HW, Lange A.** 1996. N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biology and Fertility of Soils* **23**, 449-453.
- [268] **Scherer HW, Pacyna S, Manthey N, Schulz M.** 2006. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N₂ fixation. *Plant and Soil Environment* **52**, 72-77.
- [269] **Scherer HW, Pacyna S, Spoth KR, Schulz M.** 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biology and Fertility of Soils* **44**, 909-916.
- [270] **Schlichting CD.** 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecological Systems* **17**, 667-693.
- [271] **Schlichting CD.** 2002. Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biology* **17**, 85-88.
- [272] **Schnug E.** 1998. Sulfur in Agroecosystems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 221 pp.
- [273] **Schnug E, Evans EJ.** 1992. Monitoring of the sulphur supply of agricultural crops in Northern Europe. *Phyton* **32**, 119-122.
- [274] **Schnug E, Ernst WHO, Kratz S, Knolle F, Haneklaus.** 2004. Aspect of ecotoxicology of sulphur in the Harz region – a guided excursion. *Landbauforschung Völkenrode* **3**, 129-143.

- [275] Schubert S. 1995. Nitrogen assimilation by legumes-processes and ecological limitations. *Fertilizer Research* **42**, 99-107.
- [276] Schultze M, Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics* **32**, 33-57.
- [277] Schulze J, Drevon JJ. 2005. P-deficiency increases the O₂ uptake per N₂ reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1779-1784.
- [278] Schwedock JS, Long SR. 1992. *Rhizobium meliloti* Genes Involved in Sulfate Activation: The Two Copies of *nodPQ* and a New Locus, *saa*. *Genetics* **132**, 899-909.
- [279] Sekiya J, Schmidt A, Wilson LG, Filner P. 1982a. Emission of Hydrogen Sulfide by Leaf Tissue in Response to L-Cysteine. *Plant Physiology* **70**, 430-436.
- [280] Sekiya J, Wilson LG, Filner P. 1982b. Resistance to Injury by Sulfur Dioxide: Correlation with Its Reduction to, and Emission of, Hydrogen Sulfide in Cucurbitaceae. *Plant Physiology* **70**, 437-441.
- [281] Serraj R, Sinclair TR, Rurcell LC. 1999. Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* **50**, 143-155.
- [282] Sexton JP, Mc Kay JK, Sala A. 2002. Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in north America. *Ecological Application* **12**, 1652-1660.
- [283] Shen H, Tang Y, Washitani I. 2006. Morphological plasticity of *Primula nutans* to hummock-and hollow microsites in an alpine wetland. *Journal of Plant Research* **119**, 257-264.
- [284] Shipley B. 2000. Plasticity in relative growth rate and its components following a change in irradiance. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1207-1216.
- [285] Shipley B. 2006. Net assimilation rate, specific leaf area and leaf mass ratio: which is most closely correlated with relative growth rate? A meta -analysis. *Functional Ecology* **20**, 565-574.
- [286] Shipley B, Hunt R. 1996. Regression smoothers for estimating parameters of growth analyses. *Annals of Botany* **78**, 569-576.
- [287] Simon JC, Leconte D, Vertès F, Le Meur D. 1997. Maîtrise de la pérennité du trèfle blanc dans les associations. *Fourrages* **152**, 483-498.
- [288] Simpson FB. 1987. The hydrogen reactions of nitrogenase. *Physiologia Plantarum* **69**, 187-190.
- [289] Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS. 1997. Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant Journal* **12**, 875-884.
- [290] Sokal RR, Rohlf FJ. 2003. Biometry, 3thd edn. W.H. Freeman and Compagny, New York, 887pp.
- [291] Soussana JF, Hartwig UA. 1995. The effects of elevated CO₂ on symbiotic N₂ fixation: a link between the carbon and nitrogen cycles in grassland ecosystems. *Plant and Soil* **187**, 321-332.
- [292] Soussana JF, Minchin FR, Macduff JF, Raistrick N, Abberton MT, Michaelson-Yeates TPT. 2002. A simple model of feedback regulation for nitrate uptake and N₂ fixation in contrasting phenotypes of white clover. *Annals of Botany* **90**, 139-147.
- [293] Sprent JI, Sprent P. 1990. Nitrogen fixing organism. Pure and Applied Aspects, Chapman and Hall, London, 256pp.
- [294] Stearns SC. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience*. **39**, 436-445.

- [295] **Stewart BA, Porter LK.** 1969. Nitrogen-sulfur relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.), corn (*Zea mays*), and beans (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomy Journal* **61**, 267-271.
- [296] **Sultan E.** 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science* **5**, 537-542.
- [297] **Sultan SE.** 2004. Promising directions in plant phenotypic plasticity. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **6**, 227-233.
- [298] **Sultan SE.** 2005. An emerging focus on plant ecological development. *New Phytologist* **166**, 1-8.
- [299] **Svenning MM, Junttila O, Macduff JH.** 1996. Differential rates of inhibition of N₂ fixation by sustained low concentrations of NH₄⁺ and NO₃⁻ in northern ecotypes of white clover (*Trifolium repens* L). *Journal of Experimental Botany* **47**, 729-738.
- [300] **Syrtsova LA, Tukhvatulin IA, Goryachev NS, Shkondina NI.** 2006. The role of P-Cluster in the nitrogenase ATPase reaction. *Russian Chemical Bulletin, International* **55**, 755-761.

J

- [301] **Jabe L, Hagan N, Higgins TJV.** 2002. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 212-217.
- [302] **Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blacke-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Saito K.** 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23**, 171-182.
- [303] **Taltec T.** 2008. Effets d'un double gradient azote/soufre sur la structure des communautés végétales des prairies Bas-Normande : Dynamique de l'acquisition des ressources minérales et des interactions compétitives. Thèse de l'université de Caen. 165pp.
- [304] **Taltec T, Diquélou S, Lemauiel S, Cliquet JB, Lesuffleur F, Ourry A.** 2008. Nitrogen:Sulfur ratio alters competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne* under cutting : Production and competitive abilities. *European Journal of Agronomy* **29**, 94-101.
- [305] **Taylor GE Jr, Tingey DT.** 1983. Sulphur dioxide flux into leaves of *Geranium carolinianum* L. Evidence for a nonstomatal or residual resistance. *Plant Physiology* **11**, 237-244.
- [306] **Thompson K, Askew AP, Grime JP, Dunnet NP, Willis AJ.** 2005. Biodiversity, ecosystem function and plant traits in mature and immature plant communities. *Functional Ecology* **19**, 355-358.
- [307] **Thumfort PP, Layzell DB, Atkins CA.** 1999. Diffusion and reaction of oxygen in the central tissue of ureide-producing legume nodules. *Plant and Cell Environment* **22**, 1351-1363.
- [308] **Tilman D.** 2004. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: A stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10854-10861.
- [309] **Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E.** 1997. The Influence of Functional Diversity and Composition on Ecosystem Processes. *Science* **277**, 1300-1302.

V

- [310] **Vadez V, Sinclair TR, Serraj R.** 2000. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiologia Plantarum* **110**, 215-223.
- [311] **Valladares F, Gianolis E, Gomez.** 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* **176**, 749-763.

- [312] Valladares F, Sanchez-Gomez D, Zavala M. 2006. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* **94**, 1103-1116.
- [313] Van Der Kooij TAW, De Kok LJ, Haneklaus S, Schnug E. 1997. Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **135**, 101-107.
- [314] van Kleunen M, Fischer M. 2005. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**, 49-60.
- [315] Van Rhijn P, Vanderleyden J. 1995. The Rhizobium symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**, 124-142.
- [316] Vance CP, Heichel GH. 1991. Carbon in N₂ Fixation: Limitation or Exquisite Adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 373-392.
- [317] VandenBosch KA, Rodgers LR, Sherrier DJ, Kishinevsky BD. 1994. A Peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiology* **104**, 327-337.
- [318] Varin S, Lemauiel-Lavenant S, Cliquet JB, Diquélou S, Michaelson-Yeates TPT. Functional plasticity of *Trifolium repens* L. in response to sulphur and nitrogen availability. *Plant and Soil* (DOI 10.1007/s11104-008-9800-4) in press.
- [319] Via S. 1994. The Evolution of Phenotypic Plasticity: What Do We Really Know? In: Real LA (ed.), *Ecological Genetics*, Princeton University Press, Princeton, 35-57.
- [320] Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD, Van Tienderen PH. 1995. Adaptive Phenotypic Plasticity: Consensus and Controversy. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 212-217.
- [321] Violle C, Navas ML, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E. 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**, 882-892.
- [322] Voisin AS, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B. 2002. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* **242**, 251-262.
- [323] Volis S, Mendlinger S, Ward D. 2002. Differentiation in populations of *Hordeum spontaneum* Koch along a gradient of environmental productivity and predictability: plasticity in response to water and nutrient stress. *Biological Journal of the Linnean Society* **75**, 301-312.
- [324] Vong PC, Piutti S, Benizri E, Slezack-Deschaumes S, Robin C, Gukert A. 2007. Water-soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulphatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil* **294**, 19-29.

W

- [325] Walker TW, Adams AFR, Orchiston HD. 1956a. The effect of levels of calcium sulphate on the yield and composition of a grass and clover pasture. *Plant and Soil* **7**, 290-300.
- [326] Walker TW, Adams AFR, Orchiston HD. 1956b. The fate of labelled nitrate and ammonium nitrogen when applied to grass and clover grown separately and together. *Soil Science* **2**, 339-351.
- [327] Walker TW, Adams AFR. 1958. Competition for sulphur in a grass-clover association. *Plant and Soil* **9**, 353-366.
- [328] Walker TW, Adams AFR. 1958. Residual effects of calcium sulphate on the yield and composition of a grass-clover association. *Plant and Soil* **10**, 176-182.

- [329] **Walsh KB.** 1995. Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 367-655.
- [330] **Wang S, Wang Y, Haneklaus S, Xing X, Hu Z, Fan X, Chan Z, Schnug E.** 2005. Influence of nitrogen and elemental-sulfur fertilization on sulfur oxidation and mineralization in relation to soil moisture on a calcareous soil of the inner Mongolia steppe of China. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**, 228-232.
- [331] **Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresto M.** 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369-2375.
- [332] **Waters JK, Hughes BL, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW.** 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12038-12042.
- [333] **Weiher E, Keddy PA.** 1999. Relative abundance and evenness patterns along diversity and productivity gradients in herbaceous wetlands. *Oikos* **87**, 355-361.
- [334] **Weiher E, van der Werf A, Thompson K, Roderick M, Garnier E, Eriksson O.** 1999. Challenging Theophrastus : a common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science* **10**, 609-618.
- [335] **Welham CVJ, Turkington R, Sayre C.** 2002. Morphological plasticity of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to spatial and temporal resource heterogeneity. *Oecologia* **130**, 231-238.
- [336] **Wellburn AR, Higginson C, Robinson D, Walmsley C.** 1981. Biochemical explanation of more than additive inhibitory effects of low atmospheric levels of sulphur dioxide plus nitrogen dioxide upon plants. *New Phytologist* **88**, 223-237.
- [337] **Westerman S, Stulen I, Suter M, Brunold C, De Kok LJ.** 2001. Atmospheric H₂S as sulphur source for *Brassica oleracea*: Consequences for the activity of the enzymes of the assimilatory sulphate reduction pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 425-432.
- [338] **Westerman S, De Kok LJ, Stuiver EE, Stulen I.** 2000. Interaction between metabolism of atmospheric H₂S in the shoot and sulphate uptake by roots of curly kale (*Brassica oleracea*). *Physiologia plantarum* **109**, 443-449.
- [339] **White J, Prell J, James EK, Poole P.** 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology* **144**, 604-614.
- [340] **Wichern M, Gehring T, Fischer K, Andrade O, Manfred L, Koch K, Gronauer A, Hern H.** 2008. Monofermentation of grass silage under mesophilic conditions: Measurements and mathematical modeling with ADM1. *Bioresource Technology* **100**, 1675-1681.
- [341] **Williams WM.** 1987. Adaptive variation. In: Baker MJ, Williams WM (eds.), White Clover, CAB International, Wallingford, 299-321.
- [342] **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.
- [343] **Witty JF, Sköt L, Revsbech NP.** 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* **38**, 1129-1140.
- [344] **Wright SD, McConnaughay KDM.** 2002. Interpreting phenotypic plasticity: the importance of ontogeny. *Plant Species Biology* **17**, 119-131.
- [345] **Wyss HR, Brunold C.** 2006. Regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase by sulfur dioxide in primary leaves of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **50**, 161-165.

Y

- [346] **Yakumin AF, Hallenbeck PC.** 1998. Short-Term Regulation of Nitrogenase Activity by NH₄ in *Rhodobacter capsulatus*: Multiple In Vivo Nitrogenase Responses to NH₄ Addition. *Journal of Bacteriology* **180**, 6392-6395.
- [347] **Yoch DC, Carithers RP.** 1979. Bacterial Iron-Sulfur proteins. *Microbiological Reviews* **43**, 384-421.

Z

- [348] **Zanetti S, Hartwig UA, Nosberger J.** 1998. Elevated atmospheric CO₂ does not affect *per se* the preference for symbiotic nitrogen as opposed to mineral nitrogen of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* **21**, 623-630.
- [349] **Zhao FJ, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK.** 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the science of food and agriculture* **63**, 29-37.
- [350] **Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP.** 1999a. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science* **30**, 1-17.
- [351] **Zhao FJ, Salmon SE, Withers PJA, Monaghan JM, Evans PR, Shewry PR, McGrath SP.** 1999b. Variation in the Breadmaking Quality and Rheological Properties of Wheat in Relation to Sulphur Nutrition under Field Conditions. *Journal of Cereal Science* **30**, 19-31.
- [352] **Zhao FJ, Wood AP, McGrath SP.** 1999c Effects of sulphur nutrition on growth and nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* **212**, 209-219.
- [353] **Zhao FJ, McGrath SP, Hawkesford MJ.** 2001. Sulphur nutrition and the sulphur cycle. *Institute of Arable Crops Research Report 2000-2001*: 36-39.
- [354] **Zhao FJ, Knights JS, Hu ZY, Mc Grath SP.** 2003. Stable sulfur isotope ratio indicates long-term changes in sulfur deposition in the Bradback Experiment since 1845. *Journal of Environmental Quality* **32**, 33-39.

Nombre total de références : 354

Table des illustrations

Table des illustrations

Table des Figures :

Figure 1. Evolution des quantités de dioxyde de soufre (SO₂) dans l'air (en kt) et origines des émissions de SO₂ de 1960 à 2007 en France métropolitaine. Entre 1973 et 2004, les émissions de SO₂ ont chuté de plus de 86 %. (d'après le Citepa, Mai 2008).

Figure 2. Confrontation de deux plants d'*Arabidopsis thaliana* ayant le même génotype. Ils n'ont pas le même phénotype lorsqu'ils sont soumis à des environnements différents : (a) stimulation mécanique (b) pas de stimulation. (Pigliucci, 2005).

Figure 3. Variation de l'expression du génotype (production de différents phénotypes) en fonction des variations de l'environnement. (Sultan, 2000).

Figure 4. La norme de réaction est un miroir qui refléchet l'environnement sur le phénotype. (Stearn, 1989).

Figure 5. Trois scénarios d'interaction génotype – environnement mis en évidence par la norme de réaction des génotypes : (a) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique (b) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique et à la plasticité phénotypique, (c) la variabilité phénotypique est due à la variabilité génotypique et à la plasticité phénotypique à leur interaction. (D'après Guntrip & Sibly, 1998).

Figure 6. Le rapport biomasse racinaire / biomasse aérienne (Root/Shoot ratio) est modifié chez quatre populations d'*Hordeum spontaneum* selon les traitements : optimal, stress hydrique, oligotrophie, oligotrophie et stress hydrique. (Volis *et al.*, 2002).

Figure 7. Plasticité de la prolifération racinaire de l'Orge. Des plants cultivés en solution nutritive avec une portion des racines exposée à une concentration 100 fois supérieure en phosphate, nitrate, ammonium et potassium à la concentration du reste du substrat sont comparés à un plant témoin pour lequel les nutriments sont concentrés dans tout le profil racinaire. (LHL (Low High Low) et HHH (High High High) font référence aux concentrations en nutriments dans les trois portions du substrat). (D'après Drew (1975) dans Hodge 2004).

Figure 8. Schéma présentant les composantes de la plasticité (d'après Wright & McConaughay, 2002).

Figure 9. Schéma illustrant les trois phases de la vie d'une plante : a) annuel ; b) pérenne. (Grime *et al.*, 1988).

Figure 10. a. Variation au cours du temps de la masse sèche de *Carex flacca*. **b.** Variation au cours du temps du RGR calculé selon trois méthodes; l'approche classique via la moyenne de la biomasse produite dans un intervalle de temps, l'approche fonctionnelle, et une approche « combinée » des deux méthodes précédentes. (D'après Poorter, 1989).

Figure 11. Chez l'érable à feuille de platane soumis à des variations de lumière et de disponibilité en nutriments, le RGR (Relative Growth Rate) est directement dépendant du NAR (Net Assimilation Rate). (Porthmuth & Niinemets, 2007).

Figure 12. Description schématique du flux d'azote entrant dans l'écosystème terrestre basé sur l'atmosphère, la biosphère, le concept de la pédosphère. (Hartwig, 1998).

Figure 13. Mécanisme actuellement proposé pour la fixation biologique de N_2 et de ces différents substrats alternatifs. La ferrédoxine réduite ou le $Na_2S_2O_4$ réduit la Fe-protéine de la nitrogénase. La Fe-protéine réduite est liée au MgATP, son potentiel est abaissé environ à -490 mV, et acquiert le potentiel réducteur pour réduire la MoFe-protéine du complexe nitrogénase. La MoFe-protéine réduite sert de siphon électronique et de site catalytique permettant la réduction des divers substrats. La MoFe-protéine est ensuite oxydée. Les quatre côtés du rectangle schématisant la nitrogénase illustrent les sites enzymatiques utilisés par les substrats alternatifs de cette enzyme par exemple le N_2 et les N_2O concourent pour un emplacement commun, et N_3^- , CN^- , et CH_3NC concourent pour un emplacement commun et enfin l'acétylène C_2H_2 molécules concurrent qui est utilisé dans la méthode ARA. L'évolution de la production du H_2 est prise en charge par l'intermédiaire de l'hydrogénase enzyme n'exigeant pas d'ATP. (Burris, 1974).

Figure 14. Echange moléculaire entre la légumineuse et la bactérie symbiotique (*Rhizobium*) durant la symbiose fixatrice du N_2 . Les flavonoïdes produites par la légumineuse induisent la production des facteurs de nodulation (facteurs Nod) issue de l'activation des gènes de nodosités (*nod*). Ces facteurs de nodulation (facteurs Nod) sont des lipochitoooligosaccharides (LCOs). Ils sont modifiés et spécifiques de l'espèce bactérienne impliquée dans la symbiose. Les différents substituant possible sont : en R1 : méthyl ; R2 et R3 : carbamyl ; R4 acétyl ou carbamyle ; R5 : sulfate, acétyl, D-arabinose et différents fucoses. L'agrandissement montre un cordon d'infection passant dans la racine induisant la division cellulaire chez la plante qui va former un nodule primaire. (Shultze & Kondorosi, 1998).

Figure 15. Présentation schématique de l'élongation d'un nodule indéterminé, BA, bactérie; BTs, bactéroïdes; SBs, symbiosomes; SG, grain d'amidon; CS, stèle centrale; VB, vascularisation. Les différentes zones nodulaires (z) impliquées dans l'élongation. (Patriarca *et al.*, 2002).

Figure 16. Présentation : **a.** du bilan réactionnel de la fixation du N_2 , **b.** du détail de cette réaction catalysée par la nitrogénase et **c.** de la structure de la nitrogénase. **b.** La ferrédoxine réduit la Fe protéine en se liant à celle-ci et permet l'hydrolyse de l'ATP au niveau de la Fe protéine, ce qui provoque un changement de conformation facilitant les réactions redox. La Fe protéine réduit la MoFe protéine. Puis, la MoFe protéine réduit le N_2 . Il est possible que deux Fe protéines se lient en même temps à la MoFe protéine. (Les flèches présentent le transfert des électrons lors de la réaction). **d. et e.** Description de la nitrogénase qui est composée de plusieurs sous-unités codées par les gènes *nifD*, *nifH* et *nifK*. La transcription de ces gènes est contrôlée par le régulateur NifA. **e.** Elle comprend deux composantes à centre fer/S. (d'après Halbleid & Ludden, 2000 ; Howard & Rees, 2006 ; Lee & Holm, 2003 ; Syrtosa *et al.*, 2006).

Figure 17. Présentation des échanges d'éléments nutritifs et moléculaires au sein des nodules de Fabacées. Dans les nodules déterminés, il y a habituellement plusieurs bactéroïdes inclus dans la membrane du symbiosome à la différence du bactéroïde simple des nodules

indéterminés. La synthèse d'uréides se produit seulement dans des cellules non infectées des nodules déterminées. (White *et al.*, 2007).

Figure 18. Transport de l'Ammonium dans le bactéroïde. L'ammoniaque produit dans le bactéroïde se diffuse dans l'espace pér bactéroidien (PBS). La molécule est protonée dans l'environnement acide de cet espace. La suppression de l'ammonium empêche le recyclage de l'ammonium dans le bactéroïde. Le mouvement des ions ammonium dans le cytoplasme des cellules infectées de la Fabacée exige le fonctionnement d'un canal ionique. L'assimilation d'ammoniaque en acide aminé se produit dans les bactéries du bactéroïde et également dans les cellules végétales infectées. (d'après Day *et al.*, 2001).

Figure 19. La légghémoglobine est une protéine d'environ 15 kDa. Elle fait partie de la super famille des hémoglobines dont l'hème ferrique est produit par la légumineuse et la globine par la bactérie symbiotique (Rhizobium). (Santana *et al.*, 1998 ; Labarre, 2006).

Figure 20. Schéma de quelques itinéraires métaboliques du nodule impliquant la Légghémoglobine (Lb), le Glutathion (GSH) et les ROS. A) Métabolisme du carbone et de l'azote dans les nodules d'une Fabacée productrice d'amides tel que la luzerne. B) Production de ROS et quelques systèmes antioxydants importants des nodules de légumineuse. AAT, Asp aminotransférase ; ASC, ascorbate ; Etc., chaîne de transfert d'électron ; GS, Gln synthétase ; OAA, oxaloacétate ; le ox met, métabolisme oxydant ; PEP, phosphoenolpyruvate ; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase ; MDH, malate déshydrogénase ; TCA, cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs. (Naya *et al.*, 2007).

Figure 21. Modification des concentrations en N total (symboles noirs) et en NO_3^- (symboles blancs) dans la matière sèche des nodules pendant les 14 jours suite à l'apport de NH_4^+ (cercle) ou NO_3^- (triangle), comparé à une plante contrôle pour la fixation du N_2 (carré) chez des trèfles blancs de quatre origines géographiques. (Svenning *et al.*, 1996).

Figure 22. Modification au cours du temps : **a.** du poids sec de nodule total par plante, **b.** de la masse moyenne d'un nodule et **c.** du nombre de nodules par plante pour quatre lignées de trèfle blanc après un approvisionnement de $20\mu\text{M}$ de NO_3^- (symboles noirs) comparé aux plantes dépendant seulement de la fixation de N_2 (symboles blancs). (i) Lignée A (rond), lignée B (triangle), lignée C (triangle inversé) et D (carré). (ii) Moyennes et erreurs standards ($n=4$). (Abberton *et al.*, 1998).

Figure 23. Masse sèche totale (A), Masse de nodule par plante (B), Pourcentage d'N issu de la symbiose fixatrice du N_2 (C), et Taux spécifique de fixation du N_2 (D) chez le trèfle blanc cultivée pendant 30 jours sur quatre solutions nutritives de concentration en phosphate (PO_4^{2-}) différentes (0.0027, 0.0075, 0.67 et 2 mM) et à deux pCO_2 atmosphériques 35 Pa (cercle blanc) et 70 Pa (cercle noir). Moyennes et erreurs standards ($n=4$). (Almeida *et al.*, 2000).

Figure 24. Activité de la Nitrogénase par unité de matière fraîche de racine (A) et par unité de matière sèche de nodule (B) chez le trèfle blanc cultivé en condition de fertilisation en potassium (cercle noir) et en déficience en potassium (cercle blanc). Moyennes et erreurs standards ($n=4$). (Høgh-Jensen, 2003).

Figure 25. Influence de la fertilisation en S sur : **a.** le Nombre de nodules par pot. et **b.** sur la Masse sèche d'un nodule moyen chez *Medicago sativa* L., *Trifolium pratense* L., *Vicia faba* L. et *Pisum sativum* L.; Effet d'approvisionnement en S sur **c.** l'activité de nitrogénase de

Medicago sativa L.. Les différentes lettres indiquent la différence significative existant entre les moyennes pour un $P < 0.05$ suite à une ANOVA. (Scherer & Lange, 1996).

Figure 26. Quantité de glucose disponible **a.** dans les parties aériennes et **b.** dans les nodules du pois. Les différents lettres indiquent une différence significative pour un $p < 0.05$ suite à une ANOVA. (Scherer *et al.*, 2006).

Figure 27. **a.** Teneur en ferrédoxine ($\mu\text{g.g}^{-1}$ matière fraîche) des bactéroïdes nodulaires du pois. **b.** Teneur en ATP (nmol.kg^{-1} matière fraîche) des bactéroïdes nodulaires du pois. **c.** Teneur en ATP (nmol.kg^{-1} matière fraîche) des mitochondries des nodules du pois. **d.** Teneur en Léghémoglobine (mg.g^{-1} matière fraîche) des nodules du pois. Les différentes lettres indiquent la différence significative pour un $P < 0.05$ via une ANOVA ; Les barres d'erreurs représentent les écarts types. (Scherer *et al.*, 2008).

Figure 28. Arbre phylogénétique représentant les cinq familles de gènes de transporteurs du sulfate chez *Arabidopsis thaliana* L.. (Hawkesford & De Kok, 2006).

Figure 29. Modèle d'absorption et des mouvements de sulfate au niveau de la plante entière. Illustration de l'absorption, de la distribution, de l'importation, de la remobilisation, et de l'exportation du sulfate qui est proposée en fonction du type de tissu et de la demande spécifique en soufre au cours du développement de la plante. Les flèches présentent l'absorption et les mouvements xylémique et phloémique potentiels du sulfate dans le végétal. (Buchner *et al.*, 2004).

Figure 30. Section transversale simplifiée de racine d'*Arabidopsis thaliana* présentant la spécificité cellulaire des transporteurs de sulfate. (Buchner *et al.*, 2004).

Figure 31. Rôle proposé de SST1 dans le transport du sulfate chez le bactéroïde (B) du nodule de soja. SST1 est un transporteur du sulfate présent dans la membrane pér bactéroïdienne permettant le transport du sulfate du cytoplasme de la cellule hôte vers le symbiosome (SS), où la disponibilité en soufre permet la fixation de l'azote (B). Le transport est favorisé par la charge nette positive de la surface intérieure de la membrane pér bactéroïdienne (SM), qui est produit par une H^+ -ATPase. (Krusell *et al.*, 2005).

Figure 32. Présentation des mouvements transmembranaires du sulfate, des forces d'entraînement, des mécanismes adaptés : au cytoplasme, à la vacuole et au plaste (concentrations en sulfate dans le plaste, pH, et forces d'entraînement tonoplastique et mécanisme d'absorption membranaire plasmique). Les flèches indiquent des flux transmembranaires en sulfate. (Buchner *et al.*, 2004).

Figure 33. Régulation inter-organes des mouvements du soufre en présence du SO_2 atmosphérique. Les flèches en pointillés présentent l'action du glutathion (GSH) sur des points de régulation des mouvements du sulfate. (Rennenberg & Polle, 1994).

Figure 34. Schéma illustrant: i) les diverses destinations pour les électrons de la membrane photosynthétique ($--\blacktriangleright$), ii) certaines utilisations des produits réduits et la participation de l'ATP dans divers processus dépendant de la photosynthèse ($- \blacktriangleright$), Les gaz polluants peuvent exercer leurs effets simultanément sur plusieurs parties des processus photosynthétiques. (Wellburn *et al.*, 1981).

Figure 35. Conversion métabolique du SO₂ dans le cytoplasme des cellules foliaires. (Rennenberg & Polle, 1994).

Figure 36. Flux de SO₂ dans les feuilles et conversion apoplastique du SO₂ (en haut à droite). Les lettres correspondent aux points d'entrées des différents types de dépôts foliaires de soufre. **a.** dépôt sec sur la surface des feuilles, **b.** diffusion par les stomates ; **c.** dépôt humide sur la surface des feuilles. (Rennenberg & Polle, 1994).

Figure 37. Métabolisme d'assimilation du soufre dans les compartiments sub-cellulaires des cellules végétales. a) réaction générale de la réduction du sulfate. b) Le noir indique le nom des métabolites : Ac-CoA, acetyl-CoA ; APS, adenosine 5'-phosphosulfate ; CN-Ala, b-cyano-Ala ; GSH, glutathion réduit ; GS-X, glutathion conjugué ; OAS, O-acetyl-Ser ; PAPS, 3'-phosphoadenosine-5' phosphosulfate (3'-phosphoadenylylsulfate) ; SMM, S-méthyl-Met. Le bleu indique des noms des cofacteurs : GSH, glutathion réduit ; Fdred, ferrédoxine réduite. Le rouge indique le nom des enzymes : APS kinase ; APR, adenosine 5'-phosphosulfate reductase ; APS, ATP sulfurylase ; BCS, b-cyano-Ala synthase ; OASTL, OAS(thiol)-lyase ; SAT, Ser acetyltransférase ; SIO, sulfite oxidase ; SIR, sulfite reductase ; SULTR, transporteur de sulfate. (Saito, 2004).

Figure 38. Circuit de régulation impliquant le complexe protéique de la Sérine acétyltransférase (sphères) et OAS(thiol)-lyase (carrés). Les concentrations en OAS(thiol)-lyase sont supérieures à celles de la Sérine acétyltransférase. Les OAS(thiol)-lyases liées sont positivement modulées par l'activité de la Sérine acétyltransférase présente dans le complexe protéique. La forme libre de l'OAS(thiol)-lyase catalyse la formation de la cystéine (Cys) par une répression de l'activité de la Sérine acétyltransférase. La déficience en soufre induit une augmentation d'OAS ayant pour conséquence la dissociation du complexe protéique. La forme libre de la sérine acétyltransférase a une activité limitée. Par ailleurs, l'offre importante du soufre accumulé sous forme de sulfure favorise la formation du complexe enzymatique. (Saito, 2004).

Figure 39. Schéma présentant la régulation positive et négative lors de l'assimilation du soufre. L'OAS agit en tant que facteur d'induction à effet positif. Le développement des plantes, les rythmes circadiens, et les hormones influencent le métabolisme du soufre de manière positive ou négative. La Cys et le GSH sont des régulateurs négatifs spécifiques de certaines étapes du métabolisme soufré. Les flèches indiquent un effet positif, et les barres indiquent un effet négatif. (Saito, 2004).

Figure 40. Prédiction des déficits en soufre pour 2010 dans le monde. ● Zone d'apparition actuel de déficiences en soufre) ; (■ : Déficit < 1Mio t S/ans ; ■ : Déficit > 1Mio t S/ans ; ■ : Déficit > 5Mio t S/ans). (d'après Ceccotti, 1996 ; Ceccotti & Messick, 1997 ; Mc Neill *et al.*, 2005 ; Morris, 2007).

Figure 41. Cumul des besoins annuels minimums en S (en kg.ha⁻¹) chez différentes espèces végétales : le colza (rond), la betterave sucrière (triangle), la pomme de terre (carré), le blé d'hiver (losange), et les espèces prairiales (traits continus). Le colza est très exigeant en S au cours de son développement (~ 40 kg.ha⁻¹ de S) contrairement aux espèces prairiales (~ 20 kg.ha⁻¹). (Oenema & Postma, 2003 in Abrol & Ahmad, 2003).

Figure 42. **a.** Zone de déficience en soufre sur une culture de colza aux champs (flèche) **b.** Effet d'une déficience en soufre sur les très jeunes feuilles de colza oléagineux, laissant des

zones vertes le long des nervures et **c.** Enrichissement en anthocyanine des feuilles de colza suite à une déficience en soufre extrême. **d.** Déformations et marbrures dans des jeunes feuilles provoquées par l'insuffisance en soufre tôt dans la période de croissance du colza. (Schnug *et al.*, 2004).

Figure 43. Symptômes de la déficience en soufre chez blé sur une culture aux champs. (Zhao *et al.*, 2001).

Figure 44. Production totale d'herbage en quantité absolue et en pourcentage du maximum en fonction des quantités des fertilisants N et S appliqués. (Murphy, 2002).

Figure I.1. Variation of four traits chosen to describe a/potential competitive ability b/ photosynthesis, c/potential vegetative reproduction, c/ sexual reproduction, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

Figure I.2. Variation of four traits chosen to describe N acquisition, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

Figure I.3. Variation of S content, chosen to describe S acquisition, with nitrogen and sulphur fertilisation treatments in each white clover line (means and standard errors). Letters indicate the results of Tukey tests or signed-ranks tests, when parametric conditions were not realised, an absence of a common letter indicates a significant difference at $p < 0.05$.

Figure II.1. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on shoot and root dry mass of 140-days old plants of white clover. Values are presented as means $\pm$ SE ($n=5$). Different letters on bars indicate significant differences of total dry mass between treatments ($p < 0.005$).

Figure II.2. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on nodules of 140-days old plants of white clover. A. Quantity of nodules per plant, B. Volume of nodules per plant, C. Dry mass (DM) of nodules per unit of root length. Values are presented as means $\pm$ SE ($n=5$). Different letters on bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

Figure II.3. Proteome maps of nodules proteins from *Trifolium repens* L.-*Rhizobium leguminosarium* bv trifolii T350 symbiosomes. (A) Nodules proteins were separated by 2-D SDS-PAGE (12% Acrylamide) and stained with silver nitrate. (B) Nodules proteins were revealed after immunoblot with anti NifH. Immunodetected spots are numbered from the higher to the lower molecular mass. (C) Identification of nodule proteins immunodetected by the anti- FeMoCo Nitrogenase antibodies. Experimental and theoretical pI/Mr , number of LC-MS/MS matched peptides, and the percentage of sequence coverage of the protein by matched peptides were also indicated. The assigned protein of the best matched is given with the organism in which it has been identified and its GenBank protein accession number. a PM, number of peptides matched; b % SC, percentage of sequence coverage.

Figure II.4. A. SDS-PAGE profiles of protein in nodules of white clover grown with increasing sulphate concentration in the nutrient solution B. Effect of sulphate concentration

of the nutrient solution on total soluble proteins, Nitrogenase and Leghaemoglobin obtained from image analysis of gels from 5 independent replicates C. Immunodetection of Nitrogenase NifH component and Leghaemoglobin following SDS-PAGE and western blotting of nodule extracts of white clover grown with increasing sulphate concentration in the nutrient solution. MM : Molecular markers (kDa). Different letters on bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

Figure III.1. Variation of plant dry mass (means and standard errors ($n=4$)) in the last four harvests, for the three sulphur availability levels. Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest ($p < 0.05$).

Figure III.2. Variation of (a) N/S atom ratio, (b) S mass, (c) S content in roots, (d) S content in shoots, (e) N mass and (f) the proportion (%) of N fixed from day 56 to the end of the experiment, for the three sulphur availability levels. Values are mean and standard errors ($n=4$). Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest ($p < 0.05$).

Figure III.3. Regression models of white clover growth (DM: dry mass = $f(t: \text{time})$), segmented in two parts (a and b) for the three sulphur availability levels. Plant dry mass is expressed on a logarithmic scale. (***: $p < 0.001$).

Figure III.4. Variation of RGR (Relative Growth Rate) for the three sulphur availability levels (means and standard errors ($n=4$)). Letters correspond to the results of signed-ranks tests for each harvest ($p < 0.05$).

Figure IV.1. Variation of plant dry mass in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (* corresponds to the Tukey test and indicates a difference between two means at $p < 0.001$).

Figure IV.2. Dilution curves of sulphur in shoots. Shoot dry mass, increasing with harvest time (35, 70, 105 and 140 days) is compared to %S. Variation of plant dry mass in time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors.

Figure IV.3. Variation of (a) S mass, (b) the proportion of S derived from atmospheric deposition (S_{dad}) and (c) the ratio of S_{dad} to leaf area in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (letters correspond to the results of Tukey tests for each harvest $p < 0.05$).

Figure IV.4. Variation of (a) Root:Shoot ratio, (b) Leaf:Stolon ratio in the time course of growth for the three sulphur availability levels. Mean and standard errors. (letters correspond to the results of Tukey tests for each harvest $p < 0.05$, ns : non significant).

Nombre total de figures : 59

Table des Tableaux :

Table I.1. Nitrogen (N) and sulphur (S) fertilisation effects on functional traits. Results of ANOVAs or Kruskal-Wallis tests and significance. F: ANOVA statistics; Trans.: Transformation; H : Kruskal Wallis statistics, in italic (ns : non significant, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$).

Table II.1. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on the amounts of N absorbed from the nutrient solution and N fixed from the atmosphere for 140-day old plants of white clover, expressed as total amount of N absorbed or fixed per plant or per unit length of roots. Values are presented as means ($n=5$). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

Table II.2. Effect of sulphate concentration of the nutrient solution on free amino acid concentration (expressed as $\mu\text{mol. g}^{-1}$ dry mass of nodulated roots of 140-d old white clover. Values are presented as means ($n=5$). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.005$).

Table III.1. Effects of sulphur availability on the biomass (DM: Dry Mass) of white clover components for each growth period. H values of the Kruskal - Wallis test are given (ns: not significant, * : $p < 0.05$).

Table III.2. Pearson product-moment correlation coefficients (*** : $p < 0.001$) between white clover components dry masses (DM : Dry Mass).

Nombre total de tableaux : 5

VARIN Sébastien. 2009.

Titre – Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc en réponse à la disponibilité en soufre. Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie/ Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée/ Thèse de l'université de Caen, 338 p.

Résumé – Les programmes de diminution des principaux polluants industriels ont entraîné d'importantes réductions des teneurs en S atmosphérique et par conséquent un appauvrissement des sols en S dans les prairies du Nord de l'Europe. Le travail de thèse centré sur le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) en tant qu'espèce clef des prairies, s'est attaché à analyser sa plasticité en réponse à la disponibilité en S. La plasticité du trèfle a été évaluée par la variation de traits fonctionnels le long d'un gradient de fertilisation azoté et soufré appliquée sur un sol pauvre, ou de concentration en SO_4^{2-} en système hydroponique. Un double marquage $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$ a été réalisé pour évaluer l'absorption de l'N et du S de la solution ainsi que la fixation du N_2 et le dépôt foliaire du soufre atmosphérique. Les résultats ont mis en évidence une plasticité phénotypique, à la fois morphologique et physiologique, importante du trèfle. Le soufre module sa biomasse finale ainsi que ses fonctions biologiques ; aptitude potentielle à la compétition, multiplication végétative, photosynthèse et acquisition du S et de N. Il intervient notamment via la fixation de N_2 . La réduction de la fixation du N_2 observée chez les plantes déficientes en S résulte principalement d'une réduction de la nodulation, mais une moindre synthèse de protéines nodulaires, la nitrogénase et la légghémoglobine a été observée. Le S atmosphérique s'est révélé être une source importante pour la croissance, à travers le dépôt foliaire. La déficience en soufre accroît l'absorption foliaire par unité de surface. L'apport d'engrais soufrés, à l'inverse d'apports azotés pourrait permettre un maintien prolongé du trèfle dans les prairies.

Mots clés :

Indexation rameau : Carence en soufre / Sol-Teneur en soufre / Azote-Fixation / Plasticité / Trèfle blanc / Ecologie des Prairies

Indexation libre : Absorption du soufre / Dépôt foliaire du soufre / Isotopes stables

Title – Functional plasticity of white clover in response to sulphur availability. Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie/ Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée/PhD thesis in university of Caen, 338 p.

Abstract – Recent control of atmospheric S pollution is leading to important soil sulphur impoverishment. As a result, a decrease in soil sulphur content has appeared in the last decades in grasslands of Northern Europe. White clover (*Trifolium repens* L.) is a key species in grasslands and was chosen as a model species. These PhD focused on clover response to sulphur availability. Clover plasticity was assessed through the measurement of a set of functional traits along a gradient of nitrogen and sulphur fertilisation applied on a poor soil or a gradient of sulphate concentration when cultivated on a hydroponic system. A $^{15}\text{N} / ^{34}\text{S}$ double labelling was used to measure nitrate and sulphate uptake, N_2 fixation and atmospheric S foliar deposition. White clover traits showed a great phenotypic plasticity, due to both morphological and physiological plasticity. Sulphur availability modify clover biomass as well as major functions such as the potential competitive ability, the vegetative reproduction, photosynthesis and sulphur and nitrogen acquisition. Sulphur effect on clover is linked to N_2 fixation. N_2 fixation was drastically reduced in S deficient plants mainly as a consequence of a decreased nodule development, but also as a consequence of decreased protein synthesis in nodules. Nitrogenase and leghaemoglobin were lower in S deficient nodules. S derived from the atmospheric deposition (S_{dad}) through foliar deposition appeared to be a significant source of S for clover growth. S_{dad}:leaf area ratio increased with decreasing S concentration in the nutrient solution. In contrast with N fertilisation, S fertilisation could help to maintain white clover in grassland.

Keywords:

Indexation rameau : Sulphur deficiencies / Soil-Sulphur content / Nitrogen-Fixation / Plasticity / white clover / grassland

Indexation libre : Sulphur uptake / Foliar S deposition of S / Stable isotopes

VARIN Sébastien. 2009.

Titre – Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc en réponse à la disponibilité en soufre. Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie/ Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée/ Thèse de l'université de Caen, 338 p.

Résumé – Les programmes de diminution des principaux polluants industriels ont entraîné d'importantes réductions des teneurs en S atmosphérique et par conséquent un appauvrissement des sols en S dans les prairies du Nord de l'Europe. Le travail de thèse centré sur le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) en tant qu'espèce clef des prairies, s'est attaché à analyser sa plasticité en réponse à la disponibilité en S. La plasticité du trèfle a été évaluée par la variation de traits fonctionnels le long d'un gradient de fertilisation azoté et soufré appliquée sur un sol pauvre, ou de concentration en SO_4^{2-} en système hydroponique. Un double marquage $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$ a été réalisé pour évaluer l'absorption de l'N et du S de la solution ainsi que la fixation du N_2 et le dépôt foliaire du soufre atmosphérique. Les résultats ont mis en évidence une plasticité phénotypique, à la fois morphologique et physiologique, importante du trèfle. Le soufre module sa biomasse finale ainsi que ses fonctions biologiques ; aptitude potentielle à la compétition, multiplication végétative, photosynthèse et acquisition du S et de N. Il intervient notamment via la fixation de N_2 . La réduction de la fixation du N_2 observée chez les plantes déficientes en S résulte principalement d'une réduction de la nodulation, mais une moindre synthèse de protéines nodulaires, la nitrogénase et la légghémoglobine a été observée. Le S atmosphérique s'est révélé être une source importante pour la croissance, à travers le dépôt foliaire. La déficience en soufre accroît l'absorption foliaire par unité de surface. L'apport d'engrais soufrés, à l'inverse d'apports azotés pourrait permettre un maintien prolongé du trèfle dans les prairies.

Mots clés :

Indexation rameau : Carence en soufre / Sol-Teneur en soufre / Azote-Fixation / Plasticité / Trèfle blanc / Ecologie des Prairies

Indexation libre : Absorption du soufre / Dépôt foliaire du soufre / Isotopes stables

Title – Functional plasticity of white clover in response to sulphur availability. Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie/ Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée/PhD thesis in university of Caen, 338 p.

Abstract – Recent control of atmospheric S pollution is leading to important soil sulphur impoverishment. As a result, a decrease in soil sulphur content has appeared in the last decades in grasslands of Northern Europe. White clover (*Trifolium repens* L.) is a key species in grasslands and was chosen as a model species. These PhD focused on clover response to sulphur availability. Clover plasticity was assessed through the measurement of a set of functional traits along a gradient of nitrogen and sulphur fertilisation applied on a poor soil or a gradient of sulphate concentration when cultivated on a hydroponic system. A $^{15}\text{N} / ^{34}\text{S}$ double labelling was used to measure nitrate and sulphate uptake, N_2 fixation and atmospheric S foliar deposition. White clover traits showed a great phenotypic plasticity, due to both morphological and physiological plasticity. Sulphur availability modify clover biomass as well as major functions such as the potential competitive ability, the vegetative reproduction, photosynthesis and sulphur and nitrogen acquisition. Sulphur effect on clover is linked to N_2 fixation. N_2 fixation was drastically reduced in S deficient plants mainly as a consequence of a decreased nodule development, but also as a consequence of decreased protein synthesis in nodules. Nitrogenase and leghaemoglobin were lower in S deficient nodules. S derived from the atmospheric deposition (S_{dad}) through foliar deposition appeared to be a significant source of S for clover growth. S_{dad}:leaf area ratio increased with decreasing S concentration in the nutrient solution. In contrast with N fertilisation, S fertilisation could help to maintain white clover in grassland.

Keywords:

Indexation rameau : Sulphur deficiencies / Soil-Sulphur content / Nitrogen-Fixation / Plasticity / white clover / grassland

Indexation libre : Sulphur uptake / Foliar S deposition of S / Stable isotopes
