



**HAL**  
open science

# Minéralisation du phosphore organique par le micro-réseau trophique du sol

Maëlle Maestrali

► **To cite this version:**

Maëlle Maestrali. Minéralisation du phosphore organique par le micro-réseau trophique du sol. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04358394

**HAL Id: dumas-04358394**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04358394>**

Submitted on 21 Dec 2023

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

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

L'Institut Agro Rennes-Angers

Site d'Angers     Site de Rennes

Année universitaire : 2022-2023 Spécialité : Amélioration, Production, Valorisation du Végétal (APVV) Spécialisation (et option éventuelle) : Fonctionnement et Gestion des Agrosystèmes	Mémoire de fin d'études De master de l'Institut Agro Rennes-Angers (institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
--	--

Minéralisation du phosphore organique par le micro-réseau trophique du sol



Par : Maëlle MAESTRALI

Soutenu à Rennes le 21 juin 2023

Devant le jury composé de : Matthieu Carof, Edith Le Cadre, Anne Jaffrezic

Président : Matthieu Carof

Maitre de stage : Jean Trap

Enseignant référent : Edith Le Cadre

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers et l'université de Rennes 1

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Margot Brondani et Jean Trap, pour leur accueil au sein de l'équipe mais aussi pour tout ce qu'ils m'ont apporté pendant ces 6 mois de stage. Leurs conseils avisés m'ont permis d'apprendre énormément et ils ont toujours su répondre présents lorsque j'en avais besoin. Mon stage s'est déroulé de la meilleure des manières qu'il soit et je leur exprime aujourd'hui toute ma gratitude.*

*Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance à Chiara Pistocchi, toujours disponible pour m'aiguiller et me donner des conseils, je la remercie pour sa disponibilité et son implication tout au long de mon stage.*

*À éco et sol, j'ai pu découvrir et partager le quotidien d'une équipe bienveillante, conviviale et dynamique. Cette expérience constituera un atout important pour mon futur parcours professionnel, au cours duquel j'espère avoir l'opportunité d'échanger à nouveau avec eux.*

## MINERALISATION DU PHOSPHORE ORGANIQUE PAR LE MICRO-RESEAU TROPHIQUE DU SOL.....

REMERCIEMENTS .....	
GLOSSAIRE.....	
1-INTRODUCTION .....	1
2-MATERIEL ET METHODES.....	3
2.1-Échantillonnage du sol.....	3
2.2 -Préparation du sol.....	4
2.2.1 -Séchage et stérilisation du sol.....	4
2.2.2 -Préparation de la suspension microbienne .....	4
2.2.3 -Préparation de la solution nutritive .....	4
2.2.4 -Solution de composés carbonés mimant la rhizodéposition .....	4
2.3 -Nématodes bactérivores.....	4
2.4 -Mise en place de l'expérience .....	4
2.4.2 -Préparation des microcosmes.....	5
2.5 -Analyses du sol, des microorganismes et des nématodes en fin d'expérience.....	5
2.5.1 -Humidité du sol .....	5
2.5.2 -Extraction de nématodes .....	5
2.5.3 – Analyse de la composition bactérienne .....	5
2.5.4 – Enzymologie.....	5
2.6 - P du sol.....	5
2.6.1 -Extraction du P résine sol et du P résine microbien ( $P_{res}$ et $P_{resmic}$ ) .....	5
2.6.2 -Extraction du P Olsen .....	6
2.6.3 -Extraction du P résine sol et du P résine microbien ( $P_{res}$ et $P_{mic}$ ) pour les analyses isotopiques .....	6
2.6.3 -Ajustement de la méthode d'extraction pour les analyses isotopiques.....	6
2.6.4 – Dosage du P .....	6
2.6.5 -Préparation des extractions de P pour analyses isotopiques .....	6
2.7 -L'azote (N) du sol .....	7
2.8 -Analyses TOC (carbone organique total) /TN (azote total) .....	7
2.9 -Analyses statistiques.....	7
3-RESULTATS .....	8
3.1- Densité de nématodes à la fin de l'expérience .....	8
3.2-Concentration en P.....	8
3.2.1 - P Olsen .....	8
3.2.2 -P résine microbien ( $P_{resmic}$ ) .....	8
3.3-Éléments Co-limitants.....	9
3.3.1-Concentrations en N minéral ( $NH_4$ ) .....	9
3.3.2 – Analyses du Carbone Organique Total (TOC) et de l'azote Total (TN) .....	9
3.4 – Analyse de la composition bactérienne.....	9
3.5 – Enzymologie .....	9
3.6 – Analyses multivariées.....	10
3.7 – Analyses isotopiques .....	10
4-DISCUSSION.....	10
4.1- Dynamique des populations de nématodes.....	10
4.2-Nématodes et pools de P dans le sol .....	11
4.2.1-P extractible Olsen .....	11
4.2.2- P de la biomasse microbienne .....	12
4.3-Éléments co-limitants .....	12
4.4-Composition des communautés bactériennes.....	13
4.5-Enzymologie.....	13
4.6- Pertinence des conditions simplifiées pour étudier le réseau micro-trophique du sol .....	14
5-CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	14



## Index des figures

- Figure 1 : Cycle simplifié du P, les flèches noires représentent les flux de P, les flèches jaunes représentent la boucle microbienne du sol .....
- Figure 2 : Schéma des trois principales voies par lesquelles les nématodes impactent la nutrition en P et la croissance des plantes .....
- Figure 3 : Schéma conceptuel des processus du cycle du P et suivi des traceurs ( $^{32}\text{P}$  et  $^{18}\text{O}$ ) dans les ions ortho-phosphates .....
- Figure 4 : Abondance en nématodes dans les différents microcosmes au jours 14, 28 et 50 .....
- Figure 5 : Teneur en P Olsen pour les différentes conditions au jour 14, 28 et 50, la ligne en pointillés représente la teneur en P extractible Olsen au temps 0. Les résultats complets de l'analyse statistique sont présentés dans un tableau en annexe 4. ....
- Figure 6 : Teneur en P microbien pour les différents traitements au jour 14, 28 et 50 .....
- Figure 7 : Teneur en N minéral pour les différentes conditions aux jours 14, 28 et 50, la ligne en pointillés représente la teneur en  $\text{NH}_4$  au temps 0 .....
- Figure 8 : A) Teneur en Carbone Total Organique (TOC) dans les cosmes B) Teneur en azote (N) Total organique et inorganique (TN) .....
- Figure 9 : A) Nonmetric Multidimensional Scaling with stable solution (NMDS) avec une distance de Bray-Curtis sur la composition bactérienne des cosmes (à la famille), les clusters sont calculés par traitement à chaque date. B) Histogramme des distances entre les centroïdes contrôles (C) et les centroïdes des cosmes avec nématodes (A=Acrobeloides, B=Brevibucca) aux jours 14, 28 et 50. ....
- Figure 10 : Résultats des analyses enzymologiques réalisées sur la phytase pour le jour 28, avec A : La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et B : La vitesse maximale ( $V_{max}$ ) .....
- Figure 11 : Courbes de Réponse Principale pour les traitements nématodes avec des observations répétées (PRC) avec les cosmes contrôle (C), les nématodes Acrobeloides (A) et Brevibucca (B). Le bi-plot sur le côté gauche représente les trajectoires temporelles des différents traitements (A, B, C). ....



## Glossaire

Cp1 : Nématodes opportunistes caractérisés par un cycle de vie court, une activité métabolique élevée et une tolérance au stress et à la pollution. Ces nématodes produisent des petits œufs par rapport à la taille de la femelle et en grande quantité. Lorsque l'activité microbienne diminue ou que les conditions environnementales deviennent défavorables, ces nématodes passent à l'état « dauer larvae ».

Cp2 : Nématodes caractérisés par un cycle de vie court, un taux de reproduction modeste et une tolérance aux stress. Ils sont peu sensibles à la disponibilité de nourriture. Contrairement aux cp1, les nématodes cp2 n'ont pas la possibilité de passer à l'état dauer larvae mais sont capables de cryptobiose (quiescence forte).

Dauer larvae: Stade de développement alternatif des nématodes si les conditions environnementales sont défavorables (quiescence faible). Ce stade est caractérisé par une double cuticule du nématode, une fermeture de la bouche et l'apparition d'une réserve de graisse au niveau de l'intestin.

Gradient colonisateurs-persistants : Classement des nématodes selon leur stratégie de vie allant des taxons colonisateurs aux taxons persistants (cp1 à cp5). Les taxons colonisateurs sont caractérisés par un cycle de vie court, un taux de reproduction élevé, une capacité de colonisation importante et une grande tolérance aux perturbations du milieu. Les taxons considérés comme persistants sont à l'inverse caractérisés par un taux de reproduction bas, un cycle de vie long, une faible capacité de colonisation et une tolérance réduite face aux perturbations.



## 1-Introduction

Le phosphore (P) est un élément essentiel pour la croissance des plantes ainsi qu'un composant structurel et fonctionnel de nombreuses molécules, e.g. acides nucléiques, lipides membranaires, métabolites énergétiques, intermédiaires activés pendant la photosynthèse, etc (Poirier et Bucher, 2002). Les ions phosphore (Pi) jouent également un rôle crucial dans les cascades de transduction des signaux (Poirier et Bucher, 2002). Cependant, la faible concentration des ions orthophosphates dans le sol et leur coefficient de diffusion très faible (de l'ordre du millimètre), font du P un facteur limitant la croissance des plantes presque partout dans le monde (Smit et al., 2009). La fourniture de P assimilable par les plantes dans le sol détermine fortement la capacité de production des agro-écosystèmes. Certains sols, en particulier en Afrique, en Australie, au Brésil et en Inde, ont des sols qui diffusent les ions orthophosphates à des taux insuffisants pour permettre des rendements élevés sans apport extérieur (Smit et al., 2009; Richardson et al., 2011).

Pour faire face à la carence en P assimilable, les producteurs·trices apportent de grandes quantités d'engrais phosphatés issus des réserves en apatite. Cependant, ces réserves de P minéral s'épuisent rapidement face à l'augmentation de la demande en engrais phosphatés dans le monde, et sont sources de tensions géopolitiques (Cordell et White, 2015). Au-delà du coût financier des engrais minéraux pour les producteurs·trices, les apports en P minéral sont polluants, en particulier en métaux lourds tels que le cadmium. En effet, la fertilisation phosphatée est la première source de pollution au cadmium en Europe (Cordell et al., 2009; Pan et al., 2010). Ces apports massifs d'engrais sont également connus pour avoir des effets environnementaux ; (i) sur l'eutrophisation des écosystèmes lacustres et côtiers (Delgado et Scalenghe, 2008) ; (ii) sur les communautés biologiques natives des sols, en affectant la composition initiale et éventuellement l'abondance de certains taxons (champignons, communauté bactérienne, nématodes) (Johnson, 1993 ; Ding et al., 2019 ; Hu et al., 2022) mais également en sélectionnant des souches de champignons mycorhiziens peu efficaces (Johnson, 1993).

De grandes quantités de P organique et de P inorganique adsorbé, représentant d'importants réservoirs de P non disponible directement pour les plantes, sont présents dans le sol (voir cycle du P Figure 1). Ces réservoirs pourraient être exploités pour fournir du P assimilable aux cultures. Ainsi, développer des stratégies rendant disponible ce P aux plantes pourrait constituer une alternative durable à l'utilisation des engrais minéraux phosphatés.

Les nématodes, du grec « nema » qui signifie aiguille, et « eidos » qui signifie « forme », sont des vers au corps cylindrique classés parmi les ecdysozoaires. Ils représentent les animaux les plus abondants de la faune des sols (Wharton, 1986). Les nématodes libres que l'on trouve dans l'eau, les sols ou encore les sédiments comprennent notamment les nématodes bactériophages (se nourrissant de bactéries), qui affectent la décomposition de la matière organique (Freckman, 1988). Les nématodes bactériophages, les plus abondants des nématodes des sols, constituent une voie d'étude intéressante car ils sont capables de remobiliser les éléments séquestrés dans la biomasse microbienne à proximité des racines en consommant les micro-organismes (Bonkowski, 2004). Il s'agit de la boucle microbienne du sol (Clarholm, 2005; Bonkowski, 2004), qui repose sur la reminéralisation des nutriments immobilisés dans la biomasse microbienne par les bactériophages « *the consumer-driven nutrient recycling theory* » (Elser et Urabe, 1999). Cette boucle est initiée par la libération d'exsudats racinaires par les plantes, ce qui accroît la croissance bactérienne dans la rhizosphère (zone d'influence des racines). En effet, le carbone (C) émis par les racines, notamment par rhizodéposition (Nguyen, 2003), entraîne une forte augmentation de la biomasse et de l'activité microbienne autour des racines (Alphei, Bonkowski, et Scheu, 1996) où les nutriments issus de la matière organique du sol se retrouvent temporairement séquestrés : c'est le « *rhizosphere priming effect* » (Huo et al., 2017;

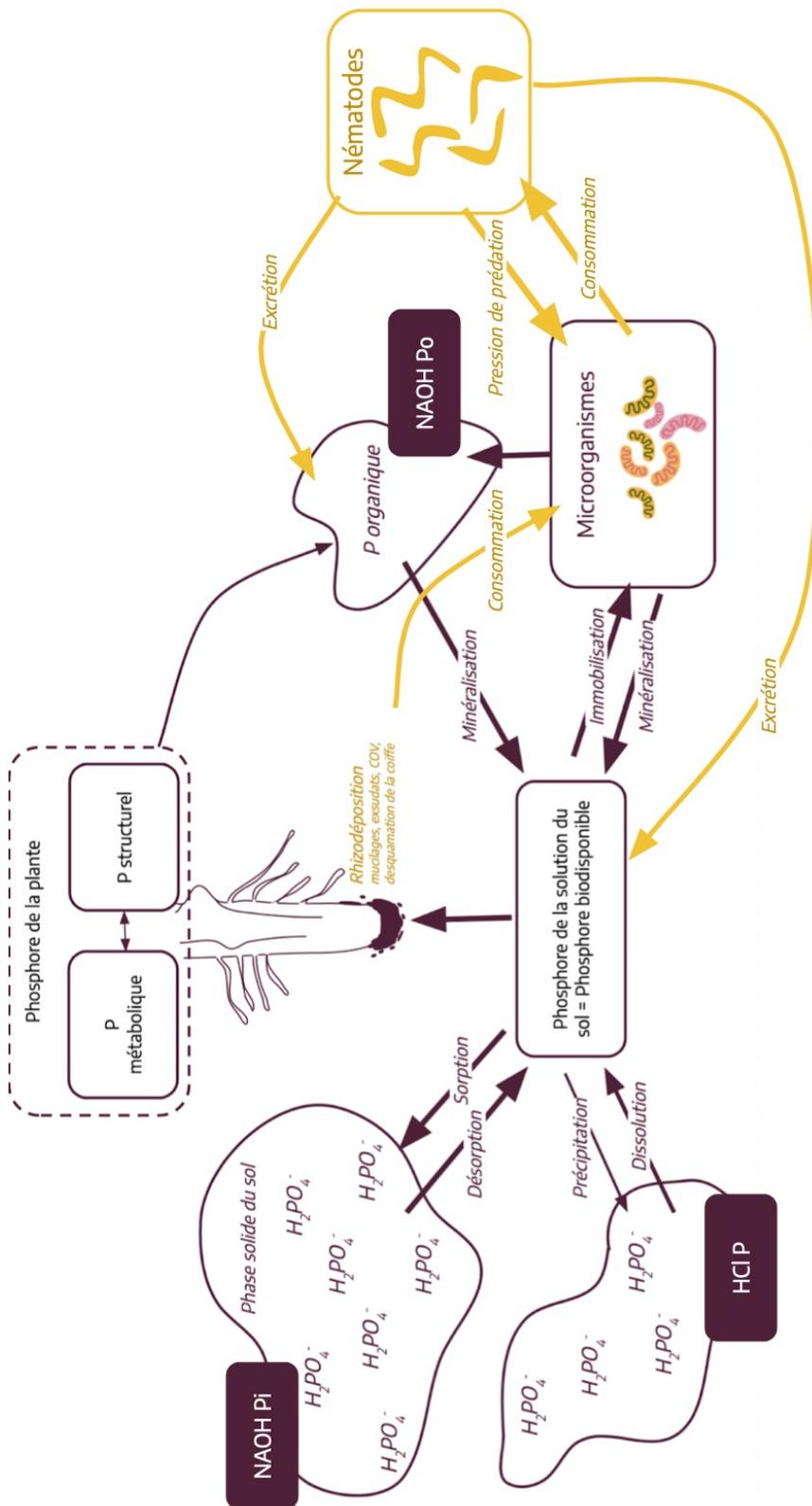


Figure 1 : Cycle simplifié du P, les flèches noires représentent les flux de P, les flèches jaunes représentent la boucle microbienne du sol

Kou et al., 2018). Ces populations bactériennes, via leur respiration, attirent les nématodes bactérovores qui se nourrissent près des racines. Le nombre de nématodes libres peut-être multiplié par 15 à proximité des racines d'orge et de pois au bout d'une semaine d'expérimentation (Griffiths, 1990). L'activité trophique des nématodes bactérovores va libérer les nutriments immobilisés dans la biomasse microbienne et déterminer leur vitesse de recyclage. Ils vont ainsi améliorer fortement la biodisponibilité des nutriments minéraux pour les plantes (Bonkowski, 2004; Griffiths, 1990).

Dans le cadre théorique de la boucle microbienne du sol, trois voies (voir Figure 2) peuvent être avancées pour expliquer l'effet bénéfique des nématodes sur la disponibilité des nutriments ; (i) la voie directe (Clarholm, 1985), qui correspond à l'excrétion des nutriments par les nématodes pour le maintien de leur homéostasie stœchiométrique ; (ii) la voie indirecte (Bonkowski et al., 2009), liée à la modification de l'activité et de la structure des communautés bactériennes sous la pression de prédation des nématodes et (iii) la voie hormonale (Bonkowski, 2004; Bonkowski et Clarholm, 2012), qui repose sur la capacité des prédateurs à stimuler le développement de l'architecture racinaire via une modification de la composition de la communauté microbienne en favorisant notamment les bactéries nitrifiantes et productrices d'auxines.

Bien que toutes les études ne révèlent pas d'effets des nématodes sur la croissance des plantes (Bardgett et Chan, 1999), de nombreux auteurs démontrent que les nématodes bactérovores peuvent favoriser cette croissance (Alphei et al., 1996; Bonkowski et al., 2000). En outre, au regard des résultats obtenus lors d'une méta-analyse (41 études) concernant les effets des organismes bactérovores sur les fonctions des sols (Trap et al., 2016), l'ajout d'organismes bactérovores semble induire une forte disponibilité des nutriments ainsi qu'un gain dans la croissance et la nutrition des plantes. Des effets positifs peuvent être constatés sur la biomasse aérienne (+ 153 %) et racinaire (+ 133 %) en présence d'*Acrobeloides sp* (Ingham et al., 1985). Djigal et al. (2004) montrent également que la présence de *Z. punctuata* permet d'augmenter significativement la teneur en P dans les parties aériennes de plants de maïs (+ 38 % par rapport au contrôle).

Toutefois, les mécanismes par lesquels les nématodes libèrent le P restent encore mal caractérisés. La minéralisation par excrétion semble être la principale voie, mais aucune étude ne l'a quantifié. Aussi, il est possible que les nématodes favorisent la désorption du P minéral de par leur action sur le pH via la respiration. Les sols abritent plusieurs espèces de nématodes qui diffèrent dans leur stratégie écologique et leurs caractéristiques morpho-anatomiques (*i.e.* traits fonctionnels). Des études ont notamment observé l'existence d'un *pattern* idiosyncratique dépendant des espèces chez les nématodes bactérovores (Fu et al., 2005; Cheng et al., 2011). Il est donc possible que les effets des nématodes bactérovores sur les flux de P diffèrent selon les espèces, en particulier selon leur stratégie de vie (Postma-Blaauw et al., 2005; Brondani et al., 2022). Ainsi, il est important de voir en quoi les différentes espèces de nématodes bactérovores, ainsi que leur stratégie de vie (groupes cp), affectent la disponibilité du P pour les plantes et d'identifier les principaux mécanismes impliqués.

Une stratégie inédite pour évaluer la dynamique des flux et les transformations du P dans le sol consiste à cibler la composition isotopique de l'oxygène des ions orthophosphates, dans lesquelles un atome de P est lié à quatre atomes d'oxygène (O). Les changements dans la composition isotopique de l'oxygène associé au P peuvent fournir des informations sur l'impact de l'activité des phosphatases sur la dynamique du P du sol. La technique d'incubation isotopique de  $^{18}\text{O}$  a été en particulier appliquée par Siegenthaler et al. (2020) en parallèle du radioisotope  $^{32}\text{P}$  pour étudier le cycle du P dans les sols.

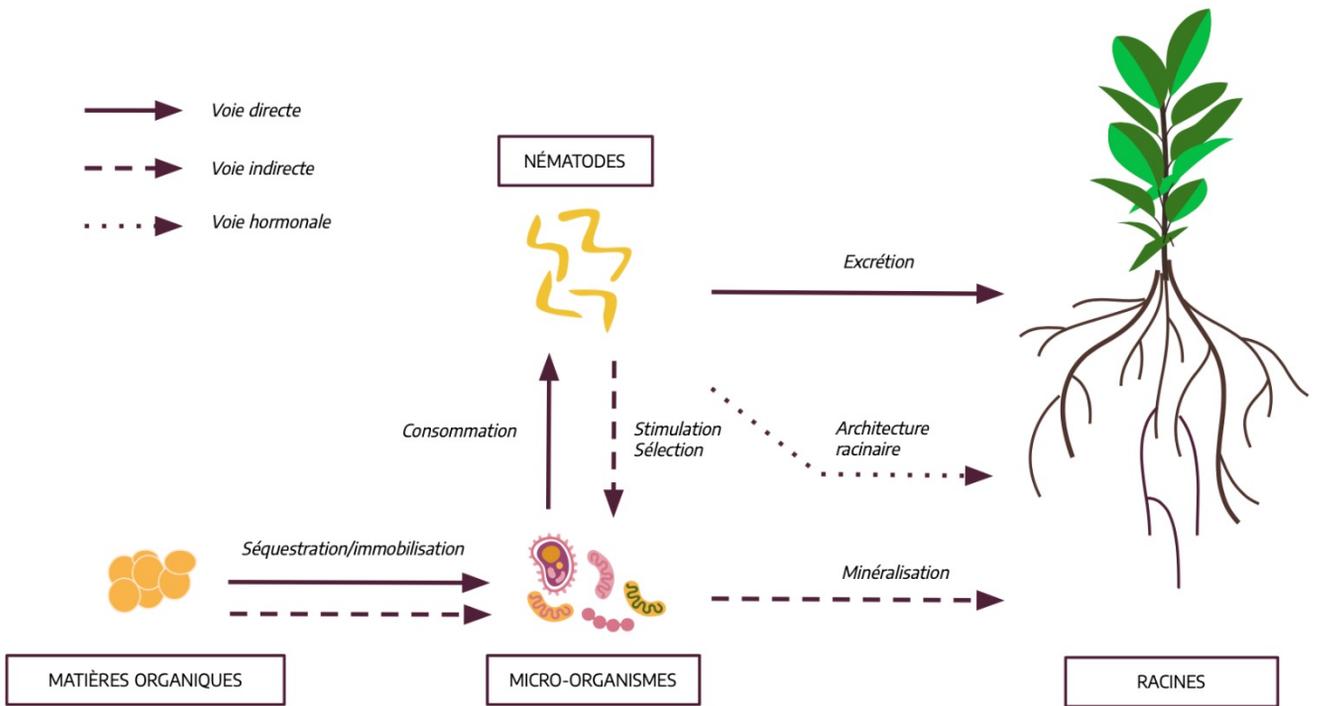


Figure 2 : Schéma des trois principales voies par lesquelles les nématodes impactent la nutrition en P et la croissance des plantes

Ces travaux s'appuient sur divers processus liés aux flux de P (Siegenthaler et al., 2020) ; (I) les flux qui impliquent des molécules de phosphate se déplaçant comme des unités inchangées d'un *pool* à un autre (les liaisons P-O restent intactes) comme la désorption des ions orthophosphates ; (II) ceux qui clivent les liaisons P-O comme la minéralisation. Deux catégories peuvent être distinguées au sein des processus (II), ceux qui conduisent à un transfert de phosphate d'un *pool* à un autre (IIa), et ceux qui ne conduisent pas à un transfert de phosphate d'un *pool* à un autre (IIb). Ces différents processus permettent de distinguer, via une approche isotopique, le P libéré par désorption depuis le complexe argilo-humique (I), et le P libéré par minéralisation du P organique (II) (Voir Figure 3). En effet, en l'absence d'activité biologique, la liaison P-O dans le phosphate est stable et la composition isotopique de l'O associée au P ( $\delta^{18}\text{O-P}$ ) reste constante (Blake, 2005; Siegenthaler et al., 2020). Ainsi, les processus de sorption/désorption et de précipitation/dissolution n'ont pas d'effet sur la composition isotopique de l'O. Les réactions médiées par les enzymes (comme les phosphatases) ont au contraire un fort impact sur le  $\delta^{18}\text{O-P}$ . Elles conduisent à un clivage de la liaison P-O et à l'échange d'atome d'O entre le phosphate et l'eau ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ), ce qui entraîne soit l'équilibre du  $\delta^{18}\text{O-P}$  avec l' $^{18}\text{O}$  de l'eau, soit des effets cinétiques de fractionnement isotopique. L'hydrolyse du P organique clive une (monoester) ou deux (diester) liaisons P-O. Les atomes d'oxygène de l'eau sont ensuite intégrés dans le phosphate nouvellement formé (Liang et Blake, 2006; Siegenthaler et al., 2020).

Lors de ce stage, associé au projet ANR O-NEMATO-P (voir annexe 1), l'objectif est (i) de caractériser les effets des nématodes sur la disponibilité en P et la communauté microbienne du sol, (ii) de vérifier que l'augmentation de la quantité de P libérée par les microorganismes en présence de nématodes repose majoritairement sur la minéralisation du P organique et non sur la désorption du P sur le complexe argilo-humique, et (iii) que ce mécanisme est générique au sein des différentes stratégies de vie des nématodes bactérivores. Pour se faire, la minéralisation du P organique sous l'effet de la prédation des nématodes est étudiée à l'aide de l'isotope  $\delta^{18}\text{O}$ . Deux espèces de nématodes bactérivores (*Brevibucca sp* souche SB261; *Acrobeloides butschlii* souche DWF1107) présentant des gradients colonisateurs-persistants\* (cp) distincts (respectivement cp1\* ; cp2\*) dans une condition d'apport en C mimant la rhizodéposition (Shi et al., 2011), sont utilisées pour étudier des liens éventuels entre les nématodes, leurs stratégies de développement et la minéralisation du P. Dans le cadre de ce travail, les hypothèses testées sont (i) les nématodes cp1 ont un effet sur le P extractible Olsen, la composition bactérienne et l'activité enzymatique dès les premières semaines de l'expérience ; (ii) les effets des nématodes cp2 ne sont visibles qu'à long terme ; (iii) l'augmentation de la quantité de P extractible Olsen repose majoritairement sur la minéralisation du phytate (source récalcitrante de P organique). Les hypothèses de travail testées pour les analyses isotopiques qui ne seront pas abordées ici sont détaillées en annexe 2).

## 2-Matériel et méthodes

### 2.1-Échantillonnage du sol

Les 15 premiers centimètres d'un sol sableux de la station expérimentale de l'INRAE Cestas à Pierroton (N 44° 44' 30" ; O 0° 46' 59 " ; altitude : 58m) ont été prélevés sur deux sessions : le 13-14 avril puis le 15-20 octobre 2022. Le site est en prairie (fétuque) depuis 2019 avec un précédent maïs. Le sol (podzol cultivé) a une texture de sable grossier, il présente un C:N de 20,5 ; un pH eau de 6,30 ; un pH KCl de 5,55 et contient 2,26 mg de P Olsen par kg de sol. La biomasse microbienne C, N et P par fumigation-extraction est de 79,1 mg-C, 6,9 mg-N, et 8,2 mg-P par kg de sol sec. Les teneurs en C et N organiques dissous sont de 37 mg-C et 6,6 mg-N

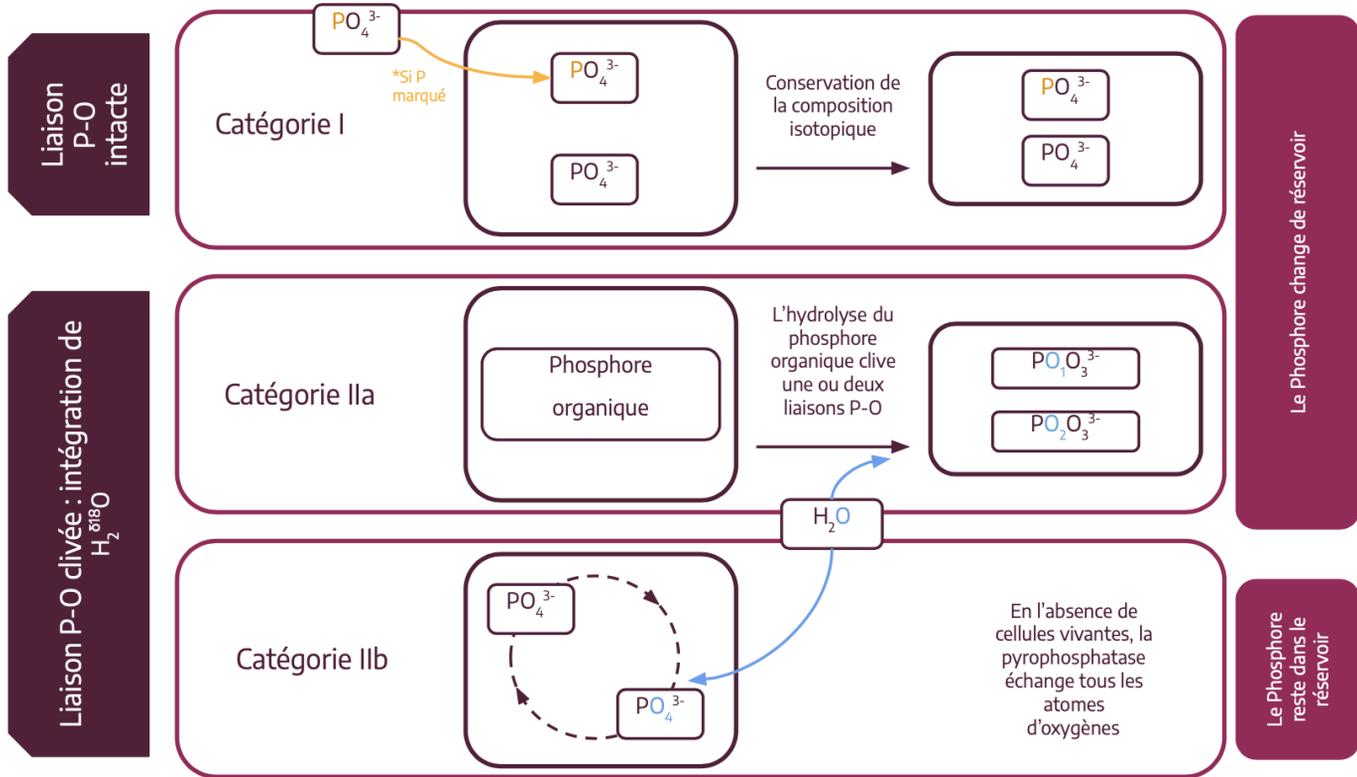


Figure 3 : Schéma conceptuel des processus du cycle du P et suivi des traceurs ( $^{32}\text{P}$  et  $^{18}\text{O}$ ) dans les ions orthophosphates

par kg de sol sec. Les teneurs en ammonium et nitrates sont très faibles, autour de 1.5 mg-N kg de sol sec. Sur la zone prélevée la fertilisation en P minéral est de 10 kg P.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>.

## 2.2 -Préparation du sol

### 2.2.1 -Séchage et stérilisation du sol

Le sol, conservé au réfrigérateur à 4°C, est tamisé à 2 mm puis séché à température ambiante (environ 20 °C) pendant trois jours. Il est de nouveau humidifié (autour de 35 % d'humidité) pour une défaunation par autoclavage (cette étape permet de tuer les nématodes présents dans le sol). La défaunation se fait en 2 cycles d'autoclavage, espacés de 72 h, à 121 °C durant 30 minutes. Le sol est finalement séché à 60 °C pendant 48 h à l'étuve.

### 2.2.2 -Préparation de la suspension microbienne

400 g de sol frais sont mis en suspension dans 2 L d'eau déminéralisée puis décantés pendant 30 min. La suspension est ensuite filtrée deux fois à 45 µm, puis une fois à 20 µm avant d'être filtrée au travers d'un dispositif de Baermann pour retenir les œufs de nématodes. On vérifie l'absence de nématodes dans 5 mL de la suspension sous loupe binoculaire. Cette suspension microbienne permet de réinoculer les microorganismes natifs dans le sol après autoclavage.

### 2.2.3 -Préparation de la solution nutritive

Pour atteindre une humidité à 80 % de la capacité au champs (= 29 %), on apporte 21 mL de solution nutritive pour 200 g de sol. Cette solution permet d'apporter des formes organiques d'azote (N) et de P dans le sol, le P est apporté sous forme de phytate, une source de P organique abondante dans les sols mais récalcitrante pour les plantes. L'<sup>δ18</sup>O est apporté avec la solution nutritive (composition décrite tableau 1).

### 2.2.4 -Solution de composés carbonés mimant la rhizodéposition

Une solution constituée d'un mélange de composés carbonés mimant la rhizodéposition est élaborée. Cette solution est apportée une fois par semaine à l'aide d'une pipette au centre du microcosme pour s'approcher au maximum du gradient de concentration observé dans le cas de rhizodéposition. La solution appliquée est similaire à celle utilisée par Shi et al. (2011), et contient du glucose [23,0 mM], du fructose [21,9 mM] et du sucrose [12,1 mM]. Cette solution mime la rhizodéposition du pin. Pour éviter toute contamination de la solution, celle-ci est stérilisée par autoclavage et stockée au congélateur.

## 2.3 -Nématodes bactérivores

On utilise ici des populations monoxéniques de *Brevibucca sp* et d'*A. butschlii* sur *Escherichia coli* souche OP50 obtenues par isolement et maintenues à 24 °C en laboratoire suivant la procédure décrite par Irshad et al. (2011). Les nématodes bactérivores sont multipliés sur des cultures de *E. coli* ajoutées à un milieu solide contenant 1 % d'agar, 3 g.L<sup>-1</sup> de bouillon de soja tryptique avec ajout de cholestérol (5 µg.L<sup>-1</sup> de milieu). Avant l'inoculation, les nématodes sont comptés sous loupe binoculaire. On apporte ensuite environ 2,5 nématodes (1 mL de solution de suspension de nématodes) par gramme de sol, ce qui correspond à la densité de nématodes observée au champ.

## 2.4 -Mise en place de l'expérience

### 2.4.1 -Design expérimental

3 traitements avec 10 répliquas sont mis en place pour trois dates d'échantillonnage distinctes (90 cosmes) ; (C) le traitement témoin sans nématode, (A) microcosmes avec *A. butschlii* et (B) microcosmes avec *Brevibucca sp*. Les sols sont échantillonnés à t<sub>14</sub>, t<sub>28</sub> et t<sub>50</sub> (respectivement 14, 28 et 50 jours après le début de l'incubation).

*Tableau I : Composition de la solution nutritive apportée dans les cosmes*

<b>Soluté (S)</b>	<b>Masse molaire S (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Masse S par gramme de sol Geoderma (mg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>[S] à apporter</b>	<b>Masse (mg) de P/N g.<sup>-1</sup> sol</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	246,47	1,15	11,46 g	
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	172,17	1,60	16,01 g	
<b>Fe citrate</b>	244,95		2,3 mL	
<b>Micronutriments</b>			1 mL	
<b>Glutamate</b>	147	0,70	7 g	0,07
<b>Phytate</b>	923	1,54	15,41 g	3,45

## 2.4.2 -Préparation des microcosmes

Le sol autoclavé pour l'expérimentation est réparti dans des bocaux en verre stériles (capacité 0,5 L ; diamètre 85 mm) à raison de 200 g de sol sec par bocal. Le sol est ré-humidifié avec 21 mL de suspension microbienne (80 % de la capacité au champ) puis pré-incubé pendant 7 jours à 24 °C à l'obscurité. À la suite de la pré-incubation, les nématodes et les *B. subtilis* sont ajoutés dans 20 mL de solution nutritive contenant l' $\delta^{18}\text{O}$ . Un mélange de composés carbonés est apporté une fois par semaine (1 mL) à l'aide d'une pipette au centre du microcosme.

## 2.5 -Analyses du sol, des microorganismes et des nématodes en fin d'expérience

### 2.5.1 -Humidité du sol

L'humidité du sol est mesurée en plaçant 5 g de sol frais dans une étuve à 105 °C pendant 48 h (jusqu'à obtention d'une masse constante). La teneur en eau du sol est ensuite exprimée en pourcentage via un rapport masse de sol sec par masse de sol frais.

### 2.5.2 -Extraction de nématodes

Les nématodes sont extraits à partir de 40 g de sol par un dispositif de Baermann immergé dans de l'eau distillée pendant 48 h. L'eau des coupelles est récupérée, et les nématodes d'un extrait de 500  $\mu\text{L}$  issu de la solution d'extraction sont comptés sous loupe binoculaire : le nombre de nématode est ensuite extrapolé au volume d'eau de la solution de nématodes. Pour observer la structure des populations, les échantillons sont ensuite fixés avec une solution de formol et de triéthanolamine (TAF) concentrée à 5 % et chauffée à 60 °C (Ryss, 2017).

### 2.5.3 – Analyse de la composition bactérienne

L'extraction de l'ADN bactérien et la construction de la bibliothèque sont réalisées par le laboratoire ADNIId du groupe Qualtech (<https://www.adnid.fr> ; Montpellier, France) suivant le même protocole que celui mis en place par Brondani et al. (2022). Le détail des techniques utilisées pour l'extraction et l'analyse des données génomiques est disponible en Annexe 3.

### 2.5.4 – Enzymologie

L'activité exoenzymatique de la phytase du sol ( $V_{\text{max}}$  et  $K_m$ ) a été mesurée pour le jour 28 par des méthodes fluorogéniques utilisant le méthylumbelli-féryl (MUB) et la 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC). Les essais enzymatiques ont été réalisés par Jérémy Puissant au laboratoire d'écologie alpine de Grenoble (UMR CNRS-UGA-USMB 5553) selon Turner (2010) et suivant les recommandations de (German et al., 2011) pour mesurer l'activité enzymatique dans la solution du sol.

## 2.6 - P du sol

Les extractions de P du sol sont faites à la fois sur des petits volumes pour dosage du P et sur des gros volumes en vue des analyses isotopiques.

### 2.6.1 -Extraction du P résine sol et du P résine microbien ( $P_{\text{res}}$ et $P_{\text{resmic}}$ )

Pour le P du sol extractible par des résines (Kouno et al., 1995), 2 g de sol de chaque microcosme sont introduits dans des tubes Falcon avec 30 mL d'eau milliQ et une résine anionique (6 x 2 cm) préalablement chargée dans une solution  $\text{NaHCO}_3$ . Les tubes Falcon sont agités pendant 16 h à 160 rpm. Les résines sont ensuite collectées, rincées dans trois bains d'eau milliQ, puis introduites dans des Falcon de 50 mL ( $\text{NaCl}/\text{HCl}$  [0,1 M]) pour élution pendant 2h avec une agitation à 160 rpm. Dans le cas du P résine microbien, les mêmes opérations sont répétées avec une fumigation : on ajoute 1 mL d'hexanol dans les tubes Falcon 50 mL avec le sol, la résine et l'eau milliQ.



### 2.6.2 -Extraction du P Olsen

Le phosphore extractible par la méthode Olsen (P inorganique extractible ; POlsen) est extrait par une solution alcaline tamponnée (Olsen 1954). Pour cela, on pèse  $5 \pm 0.10$  g de sol pour chaque microcosme. Le sol est introduit dans un pot en plastique, où sont ajoutés 200 ml de solution de  $\text{NaHCO}_3$  (pH ajusté à 8,5). La solution est agitée pendant 30 mn à température constante, puis centrifugée à 5000 tours/mn pendant 5 mn et filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$ .

### 2.6.3 -Extraction du P résine sol et du P résine microbien ( $P_{\text{res}}$ et $P_{\text{mic}}$ ) pour les analyses isotopiques

La quantité de sol extraite pour les analyses isotopiques a été ajustée pour avoir au moins 10  $\mu\text{moles}$  de P pour la purification, ce qui correspond à environ 100 g de sol frais. À  $t_0$ , 1 kg de phosphore du sol extractible par résine ( $P_{\text{res}}$ ) est extrait en 10 fois 100 g. Dans des bocaux en plastique, 100 g de sol sont ajoutés dans 400 mL d'eau Milli-Q ainsi que 12 résines (6 x 6 cm) préalablement chargées dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  [0,5 M]. Les résines sont laissées 16 h dans la solution de sol avec une agitation à 160 rpm. De la même manière, à  $t_{14}$ ,  $t_{28}$  et  $t_{50}$ , le P microbien extractible par résine ( $P_{\text{mic}}$ ) de chaque microcosme est extrait à partir de 100 g de sol. La quantité de P contenue dans la biomasse microbienne est estimée via une méthode d'extraction par fumigation (Kouno et al., 1995) : l'extraction se fait avec l'ajout d'hexanol (45 mL). Dans les deux cas ( $P_{\text{res}}$  et  $P_{\text{mic}}$ ), les résines sont déchargées après un rinçage à l'eau milliQ, dans 100 mL d'une solution de  $\text{NaCl}/\text{HCl}$  [1M] pendant 2 h avec une agitation à 160 rpm.

### 2.6.3 -Ajustement de la méthode d'extraction pour les analyses isotopiques

La qualité de l'extraction pour les analyses isotopiques n'étant pas suffisante et ne permettant pas d'atteindre la quantité minimale de P pour la purification, le protocole a été mis à jour. L'extraction de P pour le P du sol est faite en utilisant la technique du P Olsen sur 2 x 25 g de sol dans 250 mL de solution de  $\text{NaHCO}_3$  (pH ajusté à 8,5). Pour améliorer l'efficacité de l'extraction du  $P_{\text{mic}}$ , les extractions ont été effectuées en 2 fois : 50g de sol dans 400 mL d'eau milliQ, 45 mL d'hexanol et 6 résines préalablement chargées dans une solution de  $\text{NaHCO}_3$  [0,5 M].

### 2.6.4 –Dosage du P

Le dosage du P se fait par la méthode du vert de malachite (colorimétrie) (Rao et al., 1997). Après formation d'un complexe phosphomolybdique (1<sup>er</sup> réactif) associé au vert malachite (2<sup>ème</sup> réactif), l'absorbance est mesurée à 630 nm. Le P est exprimé en mg de P par kg de sol.

$$P_{\text{Total}}_{\text{mg/kg}} = (\text{ppm}_{\text{extrait}} - \text{ppm}_{\text{blanc}}) * \frac{1}{\text{dilution}} * \text{vol. extrait}_{\text{ml}} / \text{pe}_{\text{g de sol}}$$

Pour le POlsen, une étape de dégazage de deux heures avec une solution concentrée de HCl (100  $\mu\text{L}$  pour 3 mL d'extrait POlsen) est nécessaire avant le dosage.

### 2.6.5 -Préparation des extractions de P pour analyses isotopiques

Les analyses isotopiques nécessitent des étapes préalables de concentration et de purification du P. Les échantillons de P recueillis sont concentrés sur la base du protocole MAGIC (Karl et Tien, 1992). Tout d'abord, le pH de la solution est ajusté à 10 avec l'ajout de  $\text{NaOH}$  [2M]. Le P est ensuite précipité grâce à une solution de  $\text{MgCl}_2$  [2,3M]. L'extrait est centrifugé dans une bouteille Nalgène pendant 15 min à  $4^\circ\text{C}$  (6000 rpm). Le surnageant est recueilli et dosé pour vérifier que le P se trouve bien dans le précipité formé. Le culot est dissout dans le minimum possible de  $\text{HNO}_3$  [1M]. Dans le cas des échantillons extraits avec la méthode du POlsen, il est remarqué que la présence de carbonates dans l'extrait empêche la précipitation du P avec la solution de  $\text{MgCl}_2$ . Une étape préalable de deux heures de dégazage est mise en place en abaissant le pH avec une solution concentrée de HCl (3500  $\mu\text{L}$  pour 100 mL d'extrait POlsen).



La purification du P est faite en quatre étapes sur plusieurs jours suivant la méthode décrite par Tamburini et al. (2010). Tout d'abord le P est précipité sous forme d'ammonium phosphomolybdate (AMP) : le précipité se forme avec l'ajout de 25 mL d'une solution de nitrate d'ammonium [4,2M], de 40 mL d'une solution de molybdate (20 g de molybdate d'ammonium sous forme de sel tétra hydraté [1235,86 g/mol] pour 180mL d'eau milliQ) et de 0,5 mL de HSO<sub>4</sub> concentré. Les échantillons sont disposés dans un bain marie à 50°C pendant une nuit, des cristaux jaunes apparaissent. Le lendemain, les cristaux sont filtrés sur des filtres GPWP (0,2 µm) et rincés à l'aide d'une solution d'ammonium [0,6M]. Les cristaux sont collectés puis dissouts dans 20 mL d'une solution de citrate d'ammonium (10g d'acide citrique et 140 mL d'ammoniaque 30 % dans 300 mL d'eau milliQ).

La seconde étape est une étape de précipitation du P sous forme de struvite (Magnésium ammonium phosphate MAP). Le précipité se forme avec l'ajout de 25 mL d'une solution Mg (50 g de MgCl<sub>2</sub> sel hexa hydraté [203,3 g/mol] et 100g de chlorure d'ammonium [53,49 g/mol] dans 1 L d'eau milliQ avec un pH ajusté à 1 avec du HCl concentré). Après une nuit d'agitation, les cristaux blancs formés sont filtrés sur des filtres GPWP (0,2 µm) et rincés à l'aide d'une solution d'ammoniaque (1:20). Les cristaux collectés sont dissouts dans 5 mL de HNO<sub>3</sub> [0,5M].

La troisième étape consiste en la suppression des cations de la solution via l'utilisation de 6 mL de résines cationiques préalablement neutralisées dans de l'eau milliQ. Les échantillons sont agités pendant une nuit avec les résines sur agitateur rotatifs puis filtrés à l'aide de filtres en polycarbonate. L'absence de chlorures est vérifiée en ajoutant quelques mg de AgNO<sub>3</sub> dans la solution. Si la formation d'un précipité blanc est observée, la filtration est répétée. Le filtrat est collecté dans des nouveaux tubes de 50 mL.

La dernière étape de la purification est la précipitation du P sous forme d'Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Le précipité se forme par ajout de 5 mL d'une solution amine-Ag (10,2 g de sel de nitrate d'argent, 9,6 g de nitrate d'ammonium et 18,5 mL d'ammoniaque 30 % dans 81,5 mL d'eau milliQ). Des cristaux se forment après deux ou trois jours si le pH de la solution est bien ajusté à 7-8. Il est finalement possible de récolter les cristaux en les filtrant sur du polycarbonate. Les cristaux séchés sont stables et peuvent ensuite être analysés.

## 2.7 -L'azote (N) du sol

Le N minéral du sol (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) est extrait et dosé en flux continu d'après la méthode décrite par Bremner et Mulvaney (1983). 2 g de sol sont ajoutés à 20 mL de solution KCl [1M] et agités pendant 1 h sur un agitateur rotatif avant d'être filtrés à 0,2 µm. Le dosage se fait par flux continu pour NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en simultané.

## 2.8 -Analyses TOC (carbone organique total) /TN (azote total)

Pour chaque échantillon, les extractions sont faites à partir de 10 g de sol sec. 40 mL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [0,5M] sont ajoutés au sol dans des tubes Falcons de 50mL. Les solutions sont agitées sur agitateur rotatif pendant 1 h puis filtrés à 0,2 µm. Le dosage est réalisé à l'aide d'un analyseur TOC/TN à combustion à haute température.

## 2.9 -Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées sur le logiciel Rstudio (version 2022.12.0+353). Le seuil de significativité a été fixé à 5 %. Pour chaque analyse présentée, les conditions d'applications des tests ont été vérifiées (indépendance, homoscedasticité, normalité des résidus). Les valeurs aberrantes ont été écartées des données avant l'analyse statistique (voir exemple en annexe 4). Pour les données ADN, le choix a été fait de restreindre l'analyse au niveau taxonomique des familles pour réduire la quantité de données à traiter.



### 3-Résultats

#### 3.1- Densité de nématodes à la fin de l'expérience

Au bout de 14 jours d'expérience la densité des nématodes cp1 (*Brevibucca*) et celle des nématodes cp2 (*Acrobeloides*) sont relativement importantes (respectivement  $29,6 \pm 24,6$  et  $41,4 \pm 25,1$  individus par gramme de sol sec) suggérant que les nématodes sont bien installés dans les microcosmes (Figure 4). Au jour 28, on constate une augmentation significative (Anova :  $F = 18,55$  ;  $p < 0,0001$ ) de la densité des nématodes cp1 et cp2 (respectivement  $116,58 \pm 47,12$  et  $136,28 \pm 83,29$  individus par gramme de sol sec). Finalement, au jour 50, on observe une stagnation de la population pour les cp1 ( $120,58 \pm 70,50$  individus par gramme de sol sec) et une diminution de la population chez les cp2 ( $62,97 \pm 31,52$  individus par gramme de sol sec). Au jour 14 et 28 l'abondance en nématode dans le témoin est inférieure à 1 individu par gramme de sol sec, ce qui suggère une défaunation efficace. En revanche une reprise des nématodes natifs du sol est constatée au jour 50 sur plusieurs échantillons : deux cosmes sont écartés des analyses car ils présentent des abondances en nématodes supérieures à 15 individus par gramme de sol sec.

#### 3.2-Concentration en P

##### 3.2.1 - P Olsen

L'analyse des concentrations en P extractible par la méthode Olsen montre qu'il existe des différences significatives entre les cosmes ayant reçu un traitement nématode et les cosmes contrôles (Anova :  $F = 184,34$  ;  $p < 0,0001$ ) (Figure 5). En effet, au bout de 14 jours d'expérience, on observe dans les cosmes inoculés avec le nématode cp1 (*Brevibucca*), et dans les cosmes inoculés avec le nématode cp2, une quantité de P Olsen (respectivement  $30,98 \pm 13,05$  et  $41,45 \pm 10,88$  mg/Kg) supérieure de 41,17 et 88,74 % à celle observée pour les cosmes sans nématodes ( $21,93 \pm 7,22$  mg/Kg). Cette tendance se confirme au jour 28 avec une concentration en P Olsen pour les cosmes inoculés avec les cp1 ( $66,81 \pm 9,94$  mg/Kg) et les cp2 ( $72,70 \pm 16,41$  mg/Kg) supérieure de 37,92 et 50,08 % à celle observée dans les cosmes non inoculés ( $48,44 \pm 9,13$  mg/Kg). Au jour 50, il n'existe aucune différence significative entre les différents traitements : on constate une chute de la concentration en P Olsen par rapport au jour précédent avec des concentrations observées très faibles, à la fois dans les cosmes inoculés en nématodes cp1 et cp2 (respectivement  $12,61 \pm 8,23$  et  $13,42 \pm 6,84$  mg/Kg) ainsi que dans les cosmes non inoculés en nématodes ( $9,96 \pm 0,96$  mg/Kg). En outre, on montre un effet significatif du jour sur la concentration en P Olsen (Anova :  $F = 15,87$  ;  $p < 0,0001$ ) et un effet d'interaction significatif entre le jour et le traitement nématode considéré (Anova :  $F = 2,68$  ;  $p = 0,0378$ ). L'ensemble des résultats concernant les analyses « Tukey » pour P extractible Olsen est présenté en annexe 5.

La mise en relation des données d'abondance obtenues pour les nématodes et des données de concentration en P Olsen montre l'existence d'une corrélation positive ( $cor = 0,32$ ) entre ces deux variables (Pearson :  $t = 3,01$  ;  $p = 0,0035$ ). Même si cette corrélation n'est pas vérifiée pour les nématodes cp1 (*Brevibucca*), elle est d'autant plus vraie pour les nématodes cp2 (*Acrobeloides*) avec une corrélation de 0,39 (Pearson :  $t = 2,1809$  ;  $p = 0,0384$ ).

##### 3.2.2 -P résine microbienne ( $P_{resmic}$ )

Concernant le P de la biomasse microbienne (Figure 6), une analyse des concentrations obtenues montre qu'il existe un effet « temps » (*i.e.* jour d'échantillonnage) sur la biomasse microbienne (Anova :  $F = 13,29$  ;  $p < 0,0001$ ), ainsi qu'un effet d'interaction significatif entre le traitement considéré et le jour d'échantillonnage (Anova :  $F = 2,7160$  ;  $p = 0,03599$ ).

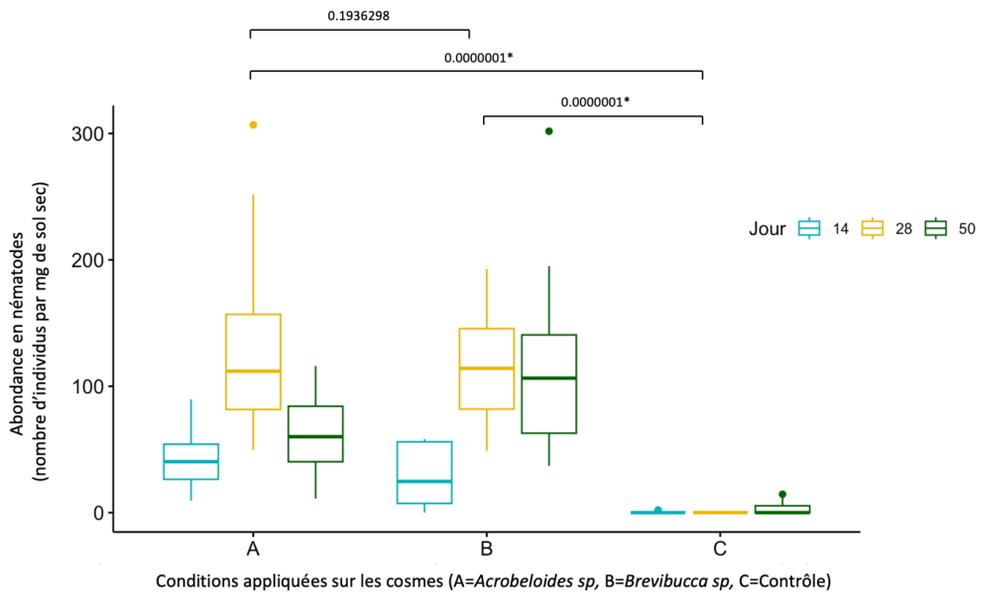


Figure 4 : Abondance en nématodes dans les différents microcosmes au jours 14, 28 et 50

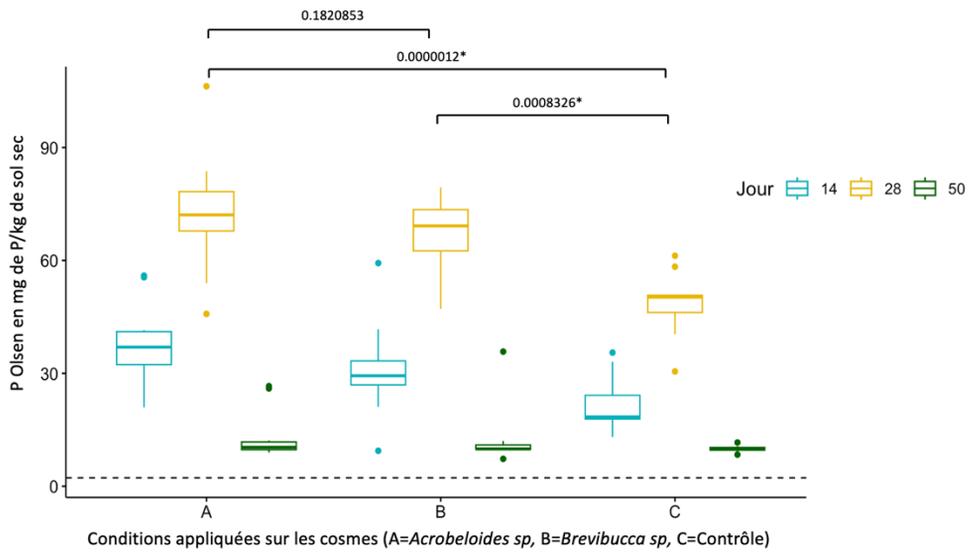


Figure 5 : Teneur en P Olsen pour les différentes conditions au jour 14, 28 et 50, la ligne en pointillés représente la teneur en P extractible Olsen au temps 0. Les résultats complets de l'analyse statistique sont présentés dans un tableau en annexe 4.

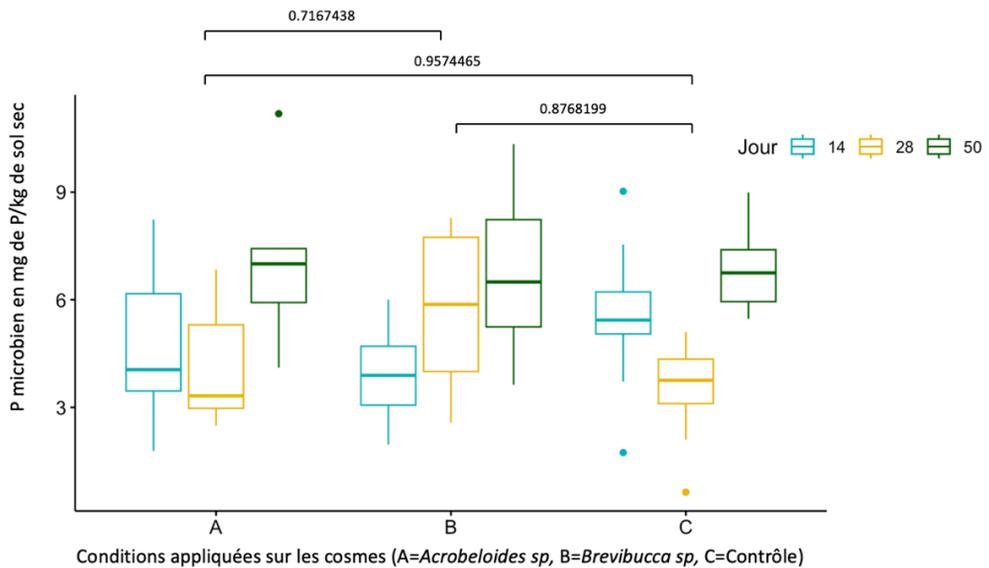


Figure 6 : Teneur en P microbien pour les différentes conditions au jour 14, 28 et 50

L'analyse montre également qu'il n'existe pas d'effet traitement sur le P microbien (Anova :  $F = 0,31$  ;  $p = 0,7331$ ).

### 3.3-Éléments Co-limitants

#### 3.3.1-Concentrations en N minéral ( $\text{NH}_4$ )

L'apport de la solution nutritive dans nos cosmes permet d'augmenter la concentration en  $\text{NH}_4$  dans le sol de manière très importante : au temps 0, la concentration en  $\text{NH}_4$  dans le sol est de  $1,46 \pm 0,20$  mg/Kg de sol contre  $36,57 \pm 15,70$  mg/Kg de sol toutes dates et conditions confondues. L'analyse des concentrations en N minéral ( $\text{NH}_4$ ) montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les cosmes ayant reçu un traitement nématodes et les cosmes contrôles (Anova :  $F = 0,12$  ;  $p = 0,8900$ ). En revanche, des effets significatifs de la date d'échantillonnage (Anova :  $F = 72,46$  ;  $p < 0,0001$ ) et des interactions date/traitement (Anova :  $F = 2,79$  ;  $p = 0,0320$ ) sont mis en évidence.

En outre, le pourcentage de minéralisation du N montre que la minéralisation du glutamate en  $\text{NH}_4$  est très efficace dès les 14 premiers jours de l'expérience ( $71 \pm 11$  %). La diminution de la quantité de N minéralisée semble indiquer une remobilisation du N par la biomasse microbienne. Les concentrations observées en ce qui concerne les nitrates, sont faibles (de l'ordre de  $0,19 \pm 0,30$  mg/Kg de sol). Les traitements n'ont pas eu d'influence sur les concentrations en nitrates (Anova :  $F = 1,21$  ;  $p = 0,3033$ ), cependant un effet du jour d'échantillonnage est mis en évidence (Anova :  $F = 26,43$  ;  $p < 0,0001$ ) avec des concentrations en nitrates significativement plus grandes au jour 50 ( $0,43 \pm 0,38$  mg/Kg de sol) qu'aux jours 14 ( $0,12 \pm 0,14$  mg/Kg de sol) et 28 ( $0,01 \pm 0,05$  mg/Kg de sol).

#### 3.3.2 – Analyses du Carbone Organique Total (TOC) et de l'azote Total (TN)

L'analyse des concentrations en C organique total (TOC) (Figure 8 A) et en N total organique et minéral (TN) (Figure 8B) montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les cosmes ayant reçu un traitement nématode et les cosmes contrôles (respectivement Anova :  $F = 0,14$  ;  $p = 0,8671$  et  $F = 1,26$  ;  $p = 0,2888$ ). En revanche, un effet significatif de la date d'échantillonnage (respectivement Anova :  $F = 176,36$  ;  $p < 0,0001$  et  $F = 27,04$  ;  $p < 0,0001$ ) est mis en évidence.

Les apports effectués via la solution nutritive au début de l'expérience et la solution carbonée chaque semaine, permettent d'augmenter la concentration totale en N (multipliée par 30) et la concentration en C organique (multipliée par 7), faisant de ces éléments des facteurs a priori non limitants pour la croissance bactérienne.

### 3.4 – Analyse de la composition bactérienne

La composition de la communauté bactérienne du sol est affectée (à la limite de la significativité Adonis :  $p = 0,057$ ) par les traitements en nématodes, comme le révèle le NMDS (Figure 9A). Les nématodes de la classe cp1 affectent davantage la composition des communautés bactériennes (à la famille) par rapport au témoin, *a contrario* des cp2 (Figure 9B). La composition bactérienne est également modifiée au cours du temps (Adonis :  $p = 0,001$ ), et un effet d'interaction temps/traitement nématode est mis en évidence. Dans le cas de *Brevibucca* (cp1), la composition de la communauté bactérienne diffère de plus en plus de celle du contrôle au cours du temps (Figure 9B et Annexe 6).

### 3.5 – Enzymologie

Concernant les analyses enzymologiques (Figure 10 A et B), le traitement statistique des données révèle que le Km (coefficient Michaelis-Menten) est affecté à la limite de la significativité ( $F = 3,79$  ;  $p = 0,05599$ ) par les différents traitements (A, B et C). Le traitement

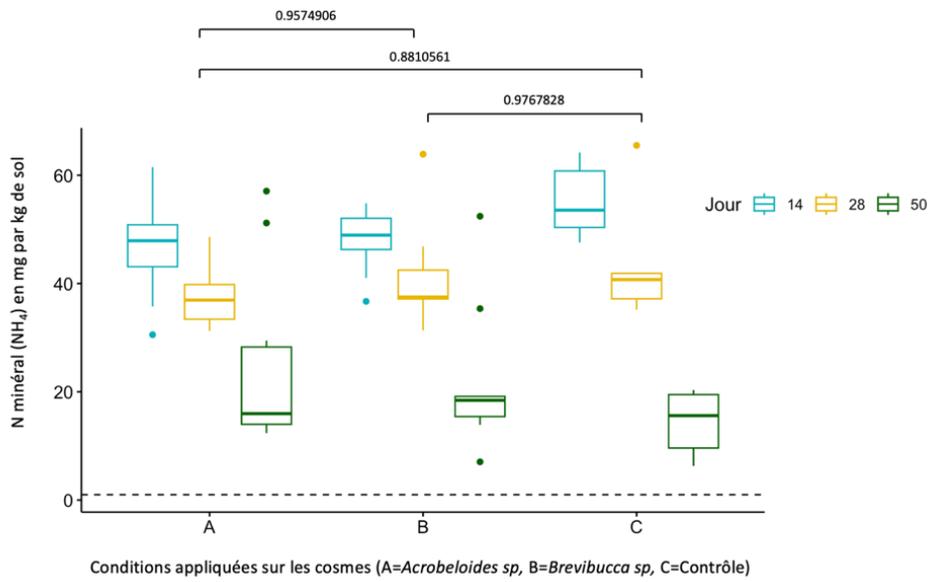


Figure 7 : Teneur en N minéral pour les différentes conditions aux jours 14, 28 et 50, la ligne en pointillés représente la teneur en  $\text{NH}_4$  au temps 0

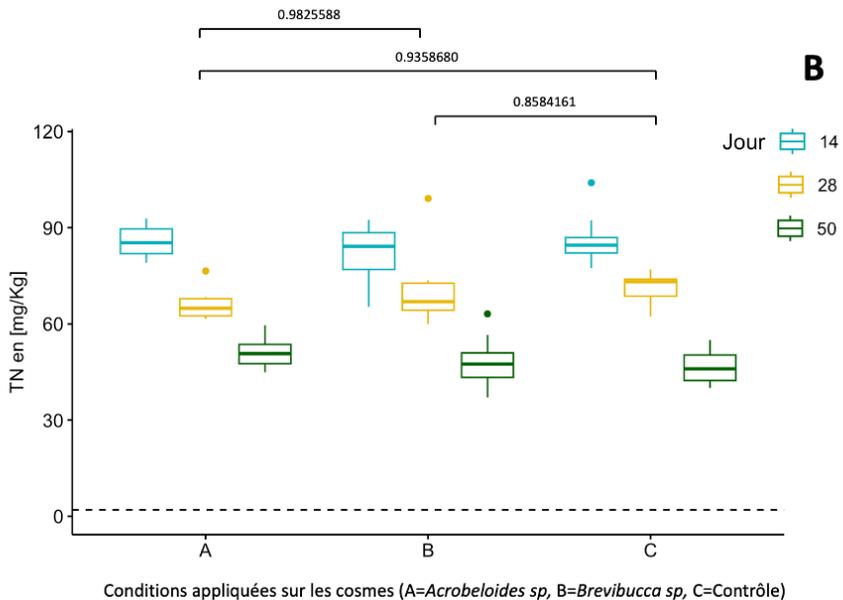
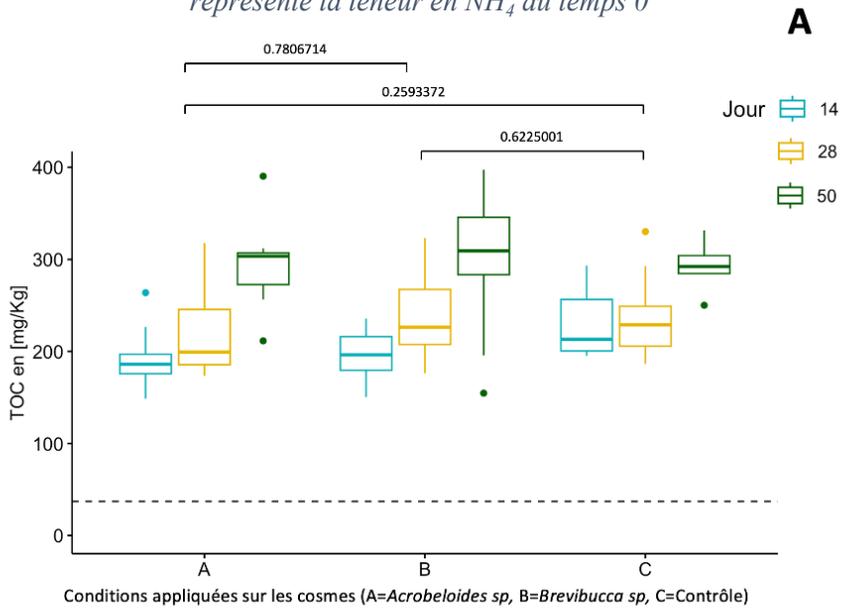


Figure 8 : A) Teneur en Carbone Total Organique (TOC) dans les cosmes B) Teneur en azote (N) Total organique et inorganique (TN) la ligne en pointillés représente les teneurs initiales (temps 0)

avec nématodes *Brevibucca* ( $10,70 \pm 1,34$ ) semble en effet abaisser le Km de la phytase par rapport au contrôle ( $15,50 \pm 3,35$ ). Des différences significatives (Anova :  $F = 8,25$  ;  $p = 0,0056$ ) sont également mises en évidence pour le Vmax, avec des valeurs de vitesse maximales plus importantes pour les phytases des cosmes contrôles ( $27,50 \pm 7,38$  nmol/min/g de sol sec) que dans les cosmes inoculés avec les nématodes *Accrobeloides* ( $13,20 \pm 2,86$  nmol/min/g de sol sec) et *Brevibucca* ( $12,20 \pm 8,39$  nmol/min/g de sol sec).

### 3.6 – Analyses multivariées

Les analyses multivariées (Figure 11 et Annexe 7) montrent que les effets des nématodes sur le P extractible Olsen sont plus forts aux jours 14 et 28. On note également que contrairement à nos hypothèses de départ, les effets transitoires des nématodes *Acrobeloides* (A) s'expriment plus fortement que ceux des nématodes *Brevibucca* (B) aux jours 14 et 28. Au jour 50, les différences observées entre les cosmes contrôles et avec nématodes s'atténuent.

### 3.7 – Analyses isotopiques

Les dosages effectués suite à la mise à jour du protocole expérimental montrent que l'utilisation du P Olsen permet d'augmenter significativement (Tukey :  $p < 0,0001$ ) le nombre de micromoles de P extraites pour les analyses isotopiques passant de  $1,34 \pm 1,79$  micromoles de P extraites en moyenne par échantillon au jour 14 et 28 contre  $16,46 \pm 10,68$  micromoles de P au jour 50. Malgré cela, il est constaté que les échantillons issus des extractions de P Olsen présentent une forte turbidité, ce qui pose problème pendant les purifications. L'ajout d'EDTA, en tant que chélateur, ainsi qu'une filtration sur filtre GPWP, permettent d'éliminer les ions métalliques (possiblement du Fer) qui empêchent la précipitation du P.

En revanche, la mise au point du protocole en ce qui concerne le P microbien, n'aide pas à améliorer la qualité de l'extraction (Tukey :  $p = 0,9999$ ), avec  $6,56 \pm 4,62$  micromoles de P extraites au jour 14 et 28, contre  $6,55 \pm 6,11$  micromoles au jour 50 et à la seconde session du jour 14. Pour les échantillons de P microbien, la décision est prise d'ajouter une quantité de P connue dans les échantillons pour atteindre les 10 micromoles nécessaires à la purification. Le contre temps entraîné par ces ajustements de protocole ne permet pas d'exploiter les résultats concernant l'isotopie des ions orthophosphates dans ce rapport en dépit du fait que ces analyses seront tout de même menées avant la fin du stage.

## 4-Discussion

### 4.1- Dynamique des populations de nématodes

L'originalité de cette expérience est qu'elle inclut 3 dates d'échantillonnage (au jour 14, 28 et 50), ce qui permet de suivre la dynamique des populations de nématodes. Les nématodes bactérivores de la classe cp1 sont des colonisateurs dont les populations sont connues pour augmenter rapidement en réponse à l'approvisionnement en C disponible. Les nématodes de classe cp2 ont un cycle de vie plus long et mettent plus de temps à coloniser un milieu (Liu et al., 2017). Contrairement à notre hypothèse de départ, consistant à dire que nous observerions une installation plus rapide des nématodes cp1 par rapport aux nématodes cp2 dans le sol, et des populations de cp2 plus importantes à long terme, nous remarquons que les populations de nématodes cp1 et cp2 se développent toutes les deux rapidement au cours des deux premières semaines suivant leur inoculation. Cela suggère que le sol inoculé avec une suspension microbienne (+ apport de *Bacillus subtilis*), et enrichi en glutamate et phytate est favorable au développement des deux classes de nématodes. Au jour 50, nous constatons une stagnation des populations de *Brevibucca* (cp1), de même qu'un effondrement de la densité pour les nématodes *Acrobeloides* (cp2). La croissance rapide des nématodes, observée aux jours 14 et

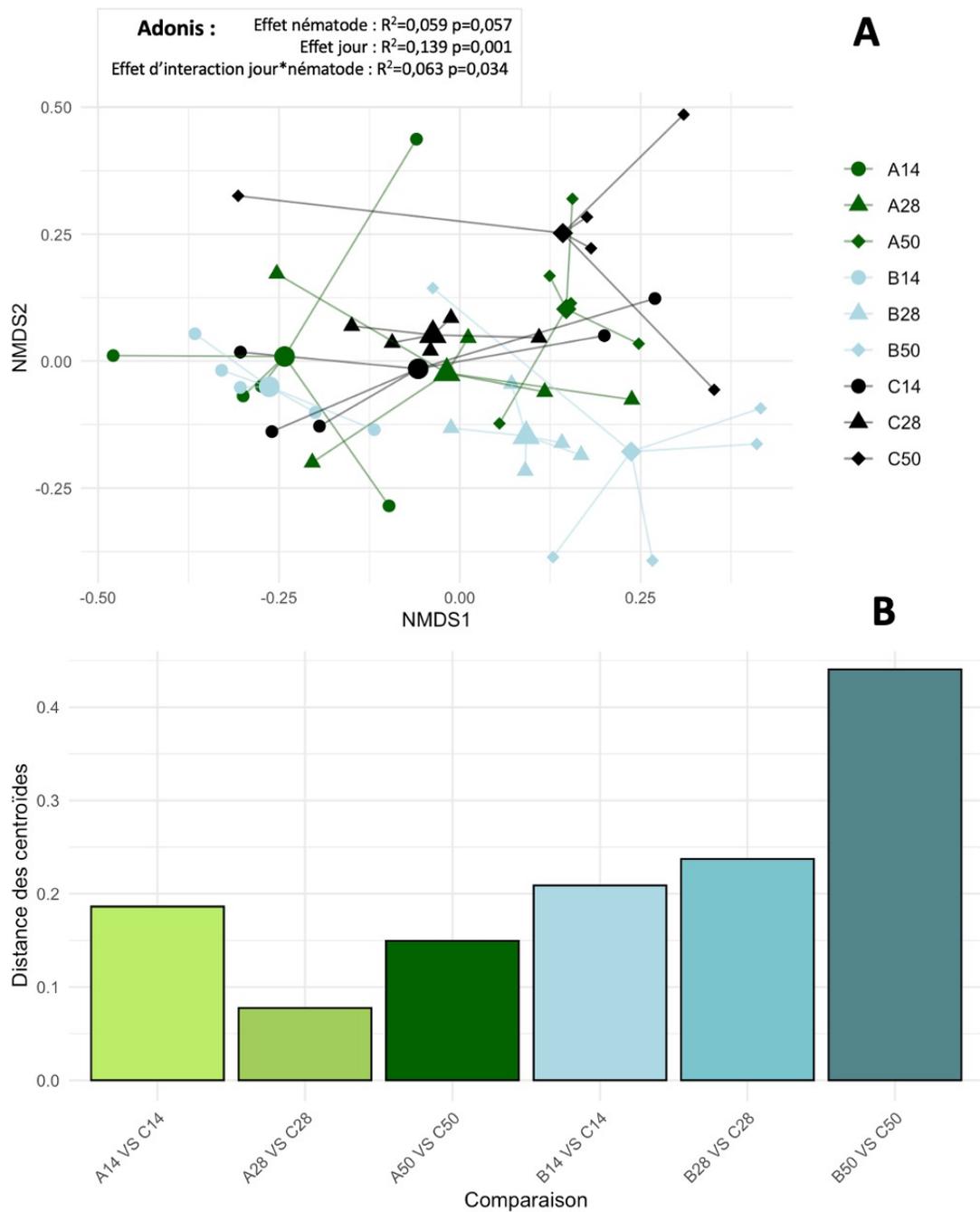


Figure 9 : A) Nonmetric Multidimensional Scaling with stable solution (NMDS) avec une distance de Bray-Curtis sur la composition bactérienne des cosmes (à la famille), les clusters sont calculés par traitement à chaque date. B) Histogramme des distances entre les centroïdes contrôles (C) et les centroïdes des cosmes avec nématodes (A=Acrobeloides, B=Brevibucca) aux jours 14, 28 et 50.

28, a pu appauvrir le sol en bactéries, entraînant une diminution rapide des populations de prédateurs.

Il a été montré qu'il existe des liens très forts entre les fluctuations de populations bactériennes et la croissance des populations de nématodes bactériorivores même si les relations prédateurs/proies observées semblent plus complexes que celles décrites par les équations Lotka-Volterra classiques (Venette et al., 1997; Zelenev et al., 2004). En effet, si les bactéries sont broutées jusqu'à un niveau refuge à partir duquel elles ne sont plus accessibles aux prédateurs (elles se trouvent dans pores trop petits pour les nématodes) (Anderson et Kirchner, 2014), les populations de nématodes décroissent en réponse à la disponibilité en nourriture. Chez les nématodes (cp1) cela peut se traduire par un passage à la forme quiescente (larve dauer). Les dynamiques de population observées dans le cas de notre expérience ne sont pas surprenantes puisqu'il est commun d'observer des diminutions rapides d'effectifs dans les populations de nématodes après un pic de densité (Sohlenius, 1969). Il est à noter que ces populations ne s'éteignent pas : au lieu de cela, le nombre d'animaux se stabilise à un niveau inférieur relativement constant.

Toujours dans ce sens, il faut ajouter que les nématodes cp1 (*Brevibucca*) sont capables de passer en forme dauer qui ne se distingue pas des nématodes « actifs » pendant les comptages. La présence de ce stade de développement alternatif des nématodes dans les populations peut-être associée à une diminution substantielle de l'activité des nématodes et donc de leurs potentiels effets sur la minéralisation du P (Anderson et Kirchner 2014). Si nous ne constatons a priori pas de différence dans la structure de la population de nématodes au jour 28 et 50 une analyse à un temps intermédiaire aurait peut-être pu permettre de déceler des dauer larva dans la population.

Une limite importante à soulever en ce qui concerne l'estimation de l'abondance des nématodes via les dispositifs de Baermann est que cette technique comptabilise uniquement les nématodes actifs (à l'exception des larves dauer évoquées précédemment). Il est connu que les nématodes peuvent entrer dans des stades cryptiques comme le « *Coiling* » : une stratégie de survie permettant aux nématodes du sol de persister dans des environnements défavorables qui s'accompagne d'un changement morphologique : un enroulement du corps pouvant être utilisé comme critère d'identification (Treonis et al., 2000). Un autre phénomène observé est l'« *Endotokia matricida* » : la naissance intra-utérine des juvéniles entraînant la mort de la mère qui est relativement fréquente chez les nématodes Rhabditides (comme *Brevibucca*) (Johnigk et Ehlers, 1999). Dans ces deux cas l'abondance en nématodes sera sous-estimée car (i) les nématodes ne seront pas extraits du sol et (ii) les nématodes juvéniles dans l'utérus de la mère ne seront pas comptabilisés.

## 4.2-Nématodes et pools de P dans le sol

### 4.2.1-P extractible Olsen

Comme déjà observé dans la littérature (Ingham et al., 1985; Alphei et al., 1996; Bonkowski et al., 2000), nous remarquons aux jours 14 et 28 que la présence de nématodes permet d'augmenter la concentration en P Olsen dans le sol, jusqu'à 40-75% plus que le contrôle. Le P Olsen est une bonne estimation du P susceptible d'être prélevé par les végétaux (P assimilable) (Fardeau et al., 1988). L'hypothèse principale que nous avançons pour expliquer ces résultats est que les nématodes améliorent l'efficacité de la minéralisation du P dans le sol (i) en favorisant l'activité « phytase » des bactéries du sol, et (ii) en minéralisant et en excréant le P. L'activité « phytase » des nématodes semble a priori ne pas être une voie majoritaire pour expliquer l'augmentation de la concentration en P (Brondani et al., 2022). Comme décrit en introduction, trois voies spécifiques permettent d'expliquer l'effet bénéfique des nématodes sur la disponibilité des nutriments (voir Figure 1). Bien qu'ici la voie hormonale soit exclue, la voie

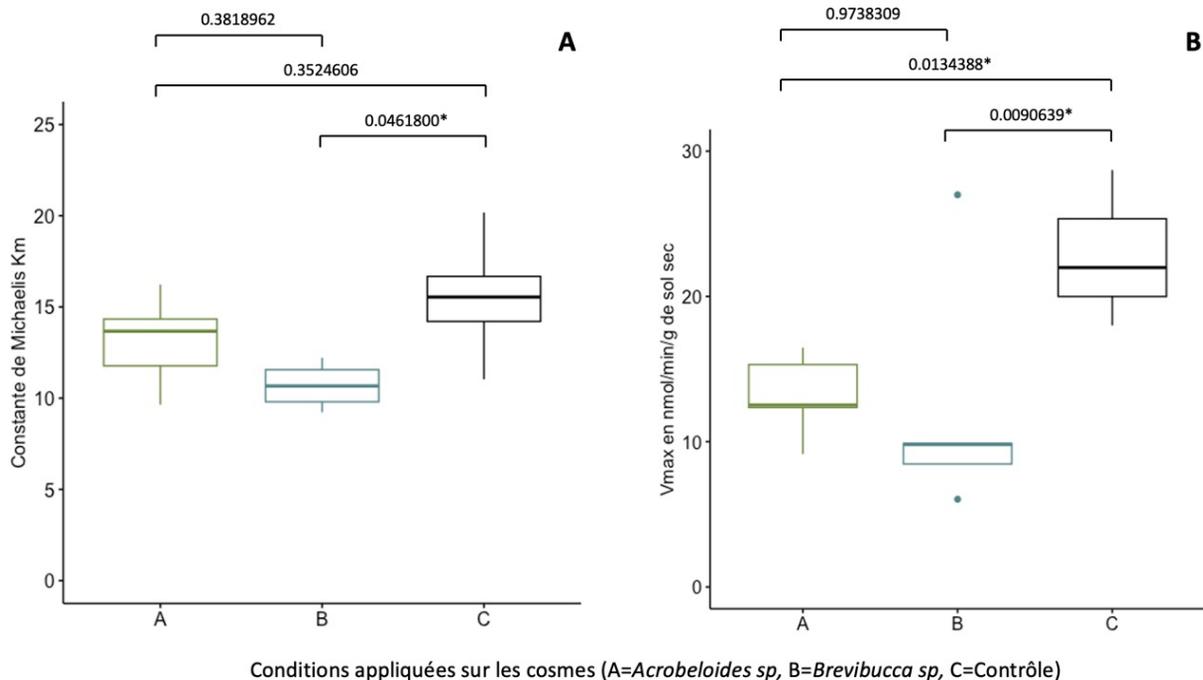


Figure 10 : Résultats des analyses enzymologiques réalisées sur la phytase pour le jour 28, avec A : La constante de Michaelis-Menten (Km) et B : La vitesse maximale (Vmax)

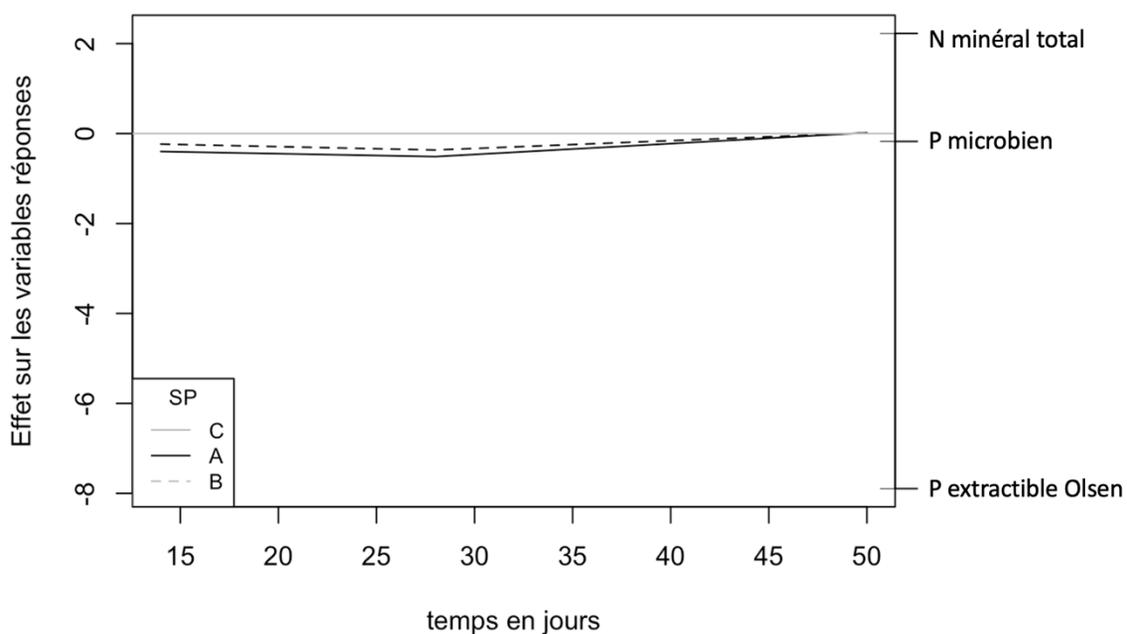


Figure 11 : Courbes de Réponse Principale pour les traitements nématodes avec des observations répétées (PRC) avec les cosmes contrôle (C), les nématodes Acrobelloides (A) et Brevibucca (B). Le bi-plot sur le côté gauche représente les trajectoires temporelles des différents traitements (A, B, C).

directe (Clarholm, 1985), et indirecte (Bonkowski et al., 2009) peuvent expliquer l'augmentation de la quantité de P biodisponible aux jours 14 et 28.

Par ailleurs, il est important de souligner que l'ajout de phytate en combinaison avec les traitements nématodes/bactéries appliqués semble avoir eu un effet direct sur la disponibilité du P dans le sol. À titre indicatif, au temps 0, avant l'ajout de phytate (sol prélevé dans les parcelles avec une fertilisation en P minéral de  $10 \text{ kg P}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ ), la concentration en P extractible Olsen est de  $2,26 \pm 0,63 \text{ mg/Kg}$  de sol. La concentration en P Olsen observée aux jours 14 et 28 dans le cas de notre expérience, toutes conditions confondues, est de  $46,72 \pm 21,54 \text{ mg/Kg}$  ce qui est même au-delà des concentrations en P relevées dans les parcelles les plus fertilisées du site de Pierroton ( $80 \text{ kg P}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ ), avec  $25,25 \pm 13,23 \text{ mg/Kg}$ . Un point toutefois relativement important à discuter est qu'il n'est pas possible de garantir que le P nouvellement biodisponible provient des phytates (source récalcitrante de P) apportés au début de l'expérience. En effet, même s'il a été montré que les nématodes peuvent augmenter la disponibilité du P dans un environnement où la seule source de P organique est le phytate (Irshad et al., 2012), nous ne pouvons pas affirmer avec certitude dans le cas présent que c'est bien le phytate qui est minéralisé. Le dosage des formes de P organique par analyse HPIC prévu par la suite permettront de répondre à ces questions.

Si la minéralisation/excrétion semble être une voie majoritaire pour expliquer l'augmentation de la disponibilité en P, il est également possible que les nématodes induisent des modifications physico-chimiques qui peuvent conduire à de la désorption du P minéral depuis le complexe argilo-humique. Dans notre cas, ces processus physico-chimiques semblent être limités car nous utilisons un sol sableux peu réactif vis-à-vis des ions phosphates. Il serait donc intéressant de reproduire cette expérience avec un sol argileux plus réactif au P.

#### 4.2.2- P de la biomasse microbienne

Le P microbien est un pool très dynamique de P dans le sol, et est soumis à des changements importants en réponse à des facteurs environnementaux tels que la température du sol, l'humidité et la disponibilité du C (Richardson et Simpson, 2011). Dans le cas de notre expérience, les conditions contrôlées limitent les variations du P microbien. Nous constatons cependant une augmentation significative de la concentration en P microbien au jour 50. Il a déjà été montré que des apports en C peuvent augmenter la concentration en P dans le pool microbien (Ehlers et al., 2010). Ainsi, les apports hebdomadaires en C peuvent expliquer l'augmentation de la biomasse microbienne au jour 50, et la séquestration d'une partie de P extractible Olsen à cette date. Malgré cela, il reste relativement difficile d'expliquer la chute du P extractible Olsen au jour 50 par la seule augmentation du P microbien. D'autres pistes de discussion devraient être envisagées, comme la sorption de P sur le complexe argilo-humique.

#### 4.3-Éléments co-limitants

Le C est généralement considéré comme le principal facteur limitant la croissance microbienne dans les sols (Maraun et Scheu, 1996), bien que le N ait également été signalé comme un facteurs limitant dans certains sols (Aldén, et al., 2001). Dans le cas de notre expérience, l'apport de la solution nutritive permet de faire du N un élément non limitant pour les bactéries du sol. Dans notre étude, le N semble être minéralisé de manière très efficace par les microorganismes. Pour ce qui est du C, nos apports hebdomadaires de solution carbonée permettent a priori de rendre cet élément non limitant pour les populations microbiennes. Les analyses de la respiration microbienne qui seront réalisées dans les semaines à venir devraient nous permettre de valider ces hypothèses.



#### 4.4-Composition des communautés bactériennes

Comme déjà abordé en introduction, les nématodes peuvent améliorer la disponibilité du P par voie indirecte, en augmentant la dissémination des bactéries (García-Sánchez et al., 2021), mais aussi en améliorant l'activité bactérienne et celles des enzymes associées à la minéralisation du P (Zheng et al., 2022), dont les effets se manifestent par un changement important dans la composition de la communauté bactérienne. Ici, nous ne relevons pas de familles bactériennes spécifiquement associées à certaines espèces de nématodes. Cependant, nos données expérimentales montrent que la composition des communautés bactériennes a tendance à diverger davantage avec le temps (voir Figure 9B) : une expérience à plus long-terme devrait permettre d'observer des différences plus importantes entre les cosmes contrôles et ceux avec nématodes. Comme déjà observé dans une étude antérieure (Brondani et al., 2022), les nématodes opportunistes de classe cp1 ont des effets plus importants sur la composition de la communauté bactérienne que les nématodes de classe cp2 : cela suggère que les caractéristiques morpho-anatomiques (*i.e.* traits fonctionnels) des nématodes conditionnent les effets qu'ils ont sur la composition bactérienne. Les changements dans l'abondance relative des différents taxons de bactéries à la suite de l'inoculation des nématodes pourraient résulter à la fois d'effets sélectifs via le choix alimentaire des nématodes et de la modification des relations concurrentielles entre les cellules bactériennes. De plus, l'inoculation des nématodes peut changer l'environnement du sol par l'excrétion de nutriments, de composés bactériens non digérés, de C labile ou encore d'éléments nutritifs (Brondani et al., 2022).

#### 4.5-Enzymologie

Parmi les formes de Po dans le sol, le phytate (myo-inositol hexakisphosphate,  $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ) est considéré comme la source la plus abondante (Turner et al., 2007) mais aussi comme la source de P la plus pauvre pour les plantes parce que la plupart des espèces végétales ne sont pas en mesure de libérer des phytases. En revanche, certaines bactéries, comme *B. subtilis* (Irshad et al., 2011) sont capables de produire des phytases (Turner et al., 2007; Ranoarisoa et al., 2020) qui peuvent favoriser la libération de Pi à partir du phytate à proximité des racines des plantes (Voir Annexe 8). Dans le cadre de notre expérience, nous constatons que le Km des phytases dans les cosmes « *Brevibucca* » est inférieur à celui observé dans les cosmes contrôles. Cela signifie que dans les cosmes contenant les nématodes cp1 (*Brevibucca*) les enzymes produites par les bactéries ont une forte affinité pour leur substrat, l'acide phytique. Précédemment, nous avons discuté de l'influence de ces nématodes sur la composition bactérienne, en vue des résultats obtenus, il est probable que les nématodes cp1 sélectionnent des souches bactériennes produisant des enzymes phytases à la structure et aux affinités chimiques différentes.

Ici, nous remarquons également que les traitements nématodes abaissaient significativement le Vmax des phytases. Ces résultats sont à priori étonnants car les données concernant le P extractible Olsen laissent penser que les vitesses maximales de réaction seraient plus longues dans le cas des cosmes contrôles et non l'inverse. Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins apporter des pistes pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, il est possible que l'action « prédateur » des nématodes et en particulier la lyse des cellules bactériennes entraîne la libération de substances qui peuvent interagir avec les phytases et abaisser la vitesse de la réaction enzymatique. Cela peut se faire (i) par inhibition compétitive, auquel cas l'action des nématodes libère des substances qui vont se lier de manière compétitive avec le substrat. (ii) Par inhibition non compétitive, ce qui implique que l'action des nématodes libère dans le milieu des substances qui peuvent se lier à l'enzyme ou à d'autres sites allostériques et ainsi altérer la catalysation de la réaction. Une autre hypothèse est que les nématodes, via leur action sur les caractéristiques physiques et chimiques du sol, entraînent la dénaturation des phytases, réduisant ainsi leur activité catalytique. Enfin, un autre élément à prendre en compte pourrait



être la disponibilité en co-facteur nécessaire à l'activité de l'enzyme, dans le cas de la phytase il s'agit du  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.6- Pertinence des conditions simplifiées pour étudier le réseau micro-trophique du sol

Dans ce travail, nous utilisons un système expérimental avec des conditions simplifiées et contrôlées pour étudier les effets du réseau micro-trophique du sol sur la minéralisation du P. Par rapport aux écosystèmes *in situ* présentant des conditions très variables, en particulier celles liées à la température et à l'humidité du sol (Ranoarisoa et al., 2020), notre expérience en conditions contrôlées nous permet de maîtriser ces deux facteurs environnementaux qui varient peu au cours du temps. Bien que stérilisé, notre sol réinoculé avec une solution microbienne permet de prendre en compte les interactions qui existent au sein de la communauté microbienne, et qui sont capables de modifier considérablement la biodisponibilité des nutriments minéraux pour les plantes (Bravin et al., 2010). Cette biodiversité « maîtrisée » permet de mettre en relief l'importance du réseau micro-trophique dans la minéralisation du P. Les conditions expérimentales définies dans notre étude sont appropriées pour caractériser les effets de la boucle microbienne du sol sur la minéralisation du P (Mezeli et al., 2020).

#### 5-Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail, nous nous attendions à observer une augmentation de la concentration des ions  $\text{Pi}$  dans la solution du sol libérés par les microorganismes en présence de nématodes. Bien que cette hypothèse se vérifie au jour 14 et 28, le jour 50 révèle que la complexité des dynamiques de population proies/prédateurs peut largement affecter la biodisponibilité du P dans le sol. Appréhender l'effet des nématodes sur la minéralisation du P implique de bien comprendre le cycle de vie de ces animaux, d'autant plus qu'il a été montré que les populations de nématodes n'ont pas les mêmes effets sur le P selon leur stade développemental ou la structure démographique de la population (Anderson et Kirchner, 2014). D'autres recherches sont donc nécessaires pour mieux comprendre la dynamique des populations des différentes classes de nématodes, et ainsi mieux quantifier la contribution de ces organismes à la minéralisation du P organique. Dans ce cadre, mettre au point un modèle démographique fiable pour les différentes classes de nématodes pour les expériences à venir semble être une étape incontournable pour résoudre les problèmes liés à la complexité des populations. Une autre approche pourrait être d'utiliser une combinaison de méthodes d'extractions permettant d'accéder à des formes cryptiques de nématodes (comme la centrifugation flottaison), et si possible, à des pas de temps plus courts pour refléter au mieux la démographie réelle des populations.

Nos résultats montrent que les nématodes cp1 (*Brevibucca*) et cp2 (*Acrobeloides*) ont des effets sur la composition de la communauté bactérienne. Pour la suite, il serait intéressant d'aller plus loin dans l'analyse taxonomique des communautés bactériennes, qui dans ce rapport s'est arrêtée au niveau de la famille. Travailler à des niveaux taxonomiques plus fins pourrait permettre d'identifier des genres, voir des espèces, qui sont potentiellement sélectionnés par les nématodes. Enfin, il faut ajouter qu'une grande partie de la communauté bactérienne ne semble pas affectée par la présence des nématodes. Dans le cas de nos analyses statistiques, ces taxons cosmopolites constituaient une communauté basale qui a pu nous empêcher de décrire clairement les familles affectées par la présence des nématodes. Identifier et écarter ces taxons cosmopolites des analyses pourrait augmenter la qualité de nos analyses statistiques.

Les résultats des analyses isotopiques, actuellement encore en attente, devraient nous donner des indices précieux pour mieux comprendre les mécanismes liés à la minéralisation du P. De



plus, l'expérience acquise pendant ces travaux, notamment pour l'amélioration de la qualité des extractions devrait permettre de reproduire ces analyses avec moins de difficultés à l'avenir.

Si travailler sur les bénéfiques et les moteurs des interactions dans la rhizosphère apparaît comme un objectif pertinent pour développer des pratiques de gestion agricole qui pourraient tirer parti des interactions bénéfiques de ces organismes, il est important de souligner que notre étude est mise en place avec des conditions très simplifiées. Il convient donc de replacer nos résultats dans leur contexte d'expérience en conditions contrôlées : *in situ*, les conditions environnementales peuvent être très variables (température, l'humidité, porosité,...) ; de plus, les communautés de nématodes dans le sol ne sont pas constituées de seulement une espèce de nématode comme dans notre expérience, mais de cortèges d'espèces qui interagissent entre elles et complexifient la boucle microbienne du sol. Une prochaine étape de ce travail pourrait être de complexifier l'expérience en utilisant différents niveaux de richesse spécifique d'organismes du sol, et éventuellement, de tester l'effet d'association de différentes espèces de nématodes.



- Aldén, L., F. Demoling, et E. Bååth. 2001. « Rapid Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1830-38. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1830-1838.2001>.
- Alpei, Jörn, Michael Bonkowski, et Stefan Scheu. 1996. « Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the Rhizosphere of *Hordelymus Europaeus* (Poaceae): Faunal Interactions, Response of Microorganisms and Effects on Plant Growth ». *Oecologia* 106 (1): 111-26. <https://doi.org/10.1007/BF00334413>.
- Anderson, Richard V., et Thomas B. Kirchner. 2014. « A SIMULATION MODEL FOR LIFE-HISTORY STRATEGIES OF BACTERIOPHAGIC NEMATODES ». In *A SIMULATION MODEL FOR LIFE-HISTORY STRATEGIES OF BACTERIOPHAGIC NEMATODES*, 157-77. University of Texas Press. <https://doi.org/10.7560/755260-012>.
- Bardgett, Richard D, et Kin F Chan. 1999. « Experimental Evidence That Soil Fauna Enhance Nutrient Mineralization and Plant Nutrient Uptake in Montane Grassland Ecosystems ». *Soil Biology and Biochemistry* 31 (7): 1007-14. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00014-0).
- Blake, R. E. 2005. « Biogeochemical Cycling of Phosphorus: Insights from Oxygen Isotope Effects of Phosphoenzymes ». *American Journal of Science* 305 (6-8): 596-620. <https://doi.org/10.2475/ajs.305.6-8.596>.
- Bonkowski, Michael. 2004. « Protozoa and Plant Growth: The Microbial Loop in Soil Revisited ». *New Phytologist* 162 (3): 617-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x>.
- Bonkowski, Michael, Weixin Cheng, Bryan S Griffiths, Jörn Alpei, et Stefan Scheu. 2000. « Microbial-Faunal Interactions in the Rhizosphere and Effects on Plant Growth » Paper Presented at the 16th World Congress of Soil Science, 20–26 August 1998, Montpellier, France. » *European Journal of Soil Biology* 36 (3): 135-47. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)01059-1](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)01059-1).
- Bonkowski, Michael, et Marianne Clarholm. 2012. « Stimulation of Plant Growth through Interactions of Bacteria and Protozoa: Testing the Auxiliary Microbial Loop Hypothesis ». *Acta Protozoologica* 51 (3). <https://bibliotekanauki.pl/articles/763461>.
- Bonkowski, Michael, Cécile Villenave, et Bryan Griffiths. 2009. « Rhizosphere Fauna: The Functional and Structural Diversity of Intimate Interactions of Soil Fauna with Plant Roots ». *Plant and Soil* 321 (1): 213-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0013-2>.
- Bravin, Matthieu N., Aurélie M. Michaud, Bourane Larabi, et Philippe Hinsinger. 2010. « RHIZOtest: A Plant-Based Biotest to Account for Rhizosphere Processes When Assessing Copper Bioavailability ». *Environmental Pollution* 158 (10): 3330-37. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.029>.
- Bremner, J.m., et C.s. Mulvaney. 1983. « Nitrogen—Total ». In *Methods of Soil Analysis*, 595-624. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c31>.
- Brondani, Margot, Claude Plassard, Estelle Ramstein, Arthur Cousson, Mickael Hedde, Laetitia Bernard, et Jean Trap. 2022. « Morpho-Anatomical Traits Explain the Effects of Bacterial-Feeding Nematodes on Soil Bacterial Community Composition and Plant Growth and Nutrition ». *Geoderma* 425 (novembre): 116068. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116068>.
- Cheng, Yanhong, Ying Jiang, Bryan S. Griffiths, Daming Li, Feng Hu, et Huixin Li. 2011. « Stimulatory Effects of Bacterial-Feeding Nematodes on Plant Growth Vary with Nematode Species ». *Nematology* 13 (3): 369-72. <https://doi.org/10.1163/138855410X528253>.



- Clarholm, Marianne. 2005. « Soil Protozoa: An under-Researched Microbial Group Gaining Momentum ». *Soil Biology and Biochemistry* 37 (5): 811-17. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.002>.
- Cordell, Dana, Jan-Olof Drangert, et Stuart White. 2009. « The Story of Phosphorus: Global Food Security and Food for Thought ». *Global Environmental Change, Traditional Peoples and Climate Change*, 19 (2): 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>.
- Cordell, Dana, et Stuart White. 2015. « Tracking Phosphorus Security: Indicators of Phosphorus Vulnerability in the Global Food System ». *Food Security* 7 (2): 337-50. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0442-0>.
- Delgado, Antonio, et Riccardo Scalenghe. 2008. « Aspects of Phosphorus Transfer from Soils in Europe ». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (4): 552-75. <https://doi.org/10.1002/jpln.200625052>.
- Ding, Jing, Dong Zhu, Qing-Lin Chen, Fei Zheng, Hong-Tao Wang, et Yong-Guan Zhu. 2019. « Effects of Long-Term Fertilization on the Associated Microbiota of Soil Collembolan ». *Soil Biology and Biochemistry* 130 (mars): 141-49. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.015>.
- Djigal, D., M. Sy, A. Brauman, T.A. Diop, D. Mountport, J.L. Chotte, et C. Villenave. 2004. « Interactions between *Zeldia Punctata* (Cephalobidae) and Bacteria in the Presence or Absence of Maize Plants ». *Plant and Soil* 262 (1): 33-44. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037022.16822.75>.
- Ehlers, Knut, Lars R. Bakken, Åsa Frostegård, Emmanuel Frossard, et Else K. Bünemann. 2010. « Phosphorus Limitation in a Ferralsol: Impact on Microbial Activity and Cell Internal P Pools ». *Soil Biology and Biochemistry* 42 (4): 558-66. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.025>.
- Elser, James J., et Jotaro Urabe. 1999. « The Stoichiometry of Consumer-Driven Nutrient Recycling: Theory, Observations, and Consequences ». *Ecology* 80 (3): 735-51. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0735:TSOCDN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0735:TSOCDN]2.0.CO;2).
- Fardeau, Jean-Claude, Christian Morel, et Raymonde Boniface. 1988. « Pourquoi choisir la méthode Olsen pour estimer le phosphore « assimilable » des sols ? » *Agronomie* 8 (7): 577-84. <https://doi.org/10.1051/agro:19880702>.
- Fu, Shenglei, Howard Ferris, David Brown, et Richard Plant. 2005. « Does the Positive Feedback Effect of Nematodes on the Biomass and Activity of Their Bacteria Prey Vary with Nematode Species and Population Size? » *Soil Biology and Biochemistry* 37 (11): 1979-87. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.018>.
- García-Sánchez, Mercedes, Mathilde Souche, Carlos Trives-Segura, et Claude Plassard. 2021. « The Grazing Activity of Sp. Drives Phytate Mineralisation within Its Trophic Relationship with Bacteria ». *Journal of Nematology* 53 (1): 1-13. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-021>.
- German, Donovan P., Michael N. Weintraub, A. Stuart Grandy, Christian L. Lauber, Zachary L. Rinkes, et Steven D. Allison. 2011. « Optimization of Hydrolytic and Oxidative Enzyme Methods for Ecosystem Studies ». *Soil Biology and Biochemistry* 43 (7): 1387-97. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.017>.
- Griffiths, B. S. 1990. « A Comparison of Microbial-Feeding Nematodes and Protozoa in the Rhizosphere of Different Plants ». *Biology and Fertility of Soils* 9 (1): 83-88. <https://doi.org/10.1007/BF00335867>.
- Hu, Jing, Guorong Chen, Wail M. Hassan, Jianbin Lan, Wantong Si, Wei Wang, Guixin Li, et



- Guozhen Du. 2022. « The Impact of Fertilization Intensity on Soil Nematode Communities in a Tibetan Plateau Grassland Ecosystem ». *Applied Soil Ecology* 170 (février): 104258. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104258>.
- Huo, Changfu, Yiqi Luo, et Weixin Cheng. 2017. « Rhizosphere Priming Effect: A Meta-Analysis ». *Soil Biology and Biochemistry* 111 (août): 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.003>.
- Ingham, Russell E., J. A. Trofymow, Elaine R. Ingham, et David C. Coleman. 1985. « Interactions of Bacteria, Fungi, and Their Nematode Grazers: Effects on Nutrient Cycling and Plant Growth ». *Ecological Monographs* 55 (1): 119-40. <https://doi.org/10.2307/1942528>.
- Irshad, Usman, Alain Brauman, Cécile Villenave, et Claude Plassard. 2012. « Phosphorus Acquisition from Phytate Depends on Efficient Bacterial Grazing, Irrespective of the Mycorrhizal Status of Pinus Pinaster ». *Plant and Soil* 358 (1): 155-68. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1161-3>.
- Irshad, Usman, Cécile Villenave, Alain Brauman, et Claude Plassard. 2011. « Grazing by Nematodes on Rhizosphere Bacteria Enhances Nitrate and Phosphorus Availability to Pinus Pinaster Seedlings ». *Soil Biology and Biochemistry* 43 (10): 2121-26. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.06.015>.
- Johnigk, Stefan-Andreas, et Ralf-Udo Ehlers. 1999. « Endotokia Matricida in Hermaphrodites of Heterorhabditis Spp. and the Effect of the Food Supply ». *Nematology* 1 (7): 717-26. <https://doi.org/10.1163/156854199508748>.
- Johnson, Nancy Collins. 1993. « Can Fertilization of Soil Select Less Mutualistic Mycorrhizae? ». *Ecological Applications* 3 (4): 749-57. <https://doi.org/10.2307/1942106>.
- Karl, David M., et Georgia Tien. 1992. « MAGIC: A Sensitive and Precise Method for Measuring Dissolved Phosphorus in Aquatic Environments ». *Limnology and Oceanography* 37 (1): 105-16. <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.1.0105>.
- Kou, Xinchang, Tongqing Su, Ningning Ma, Qi Li, Peng Wang, Zhengfang Wu, Wenju Liang, et Weixin Cheng. 2018. « Soil Micro-Food Web Interactions and Rhizosphere Priming Effect ». *Plant and Soil* 432 (1): 129-42. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3782-7>.
- Kouno, Kenji, Yasuhiro Tuchiya, et Tadao Ando. 1995. « Measurement of Soil Microbial Biomass Phosphorus by an Anion Exchange Membrane Method ». *Soil Biology and Biochemistry* 27 (10): 1353-57. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00057-L](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00057-L).
- Liang, Y., et R. E. Blake. 2006. « Oxygen Isotope Signature of Pi Regeneration from Organic Compounds by Phosphomonoesterases and Photooxidation ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 (15): 3957-69. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.04.036>.
- Liu, Ting, Li Yu, Jingjing Xu, Xiaomei Yan, Huixin Li, Joann K. Whalen, et Feng Hu. 2017. « Bacterial Traits and Quality Contribute to the Diet Choice and Survival of Bacterial-Feeding Nematodes ». *Soil Biology and Biochemistry* 115 (décembre): 467-74. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.014>.
- Maraun, Mark, et Stefan Scheu. 1996. « Changes in Microbial Biomass, Respiration and Nutrient Status of Beech (Fagus Sylvatica) Leaf Litter Processed by Millipedes (Glomeris Marginata) ». *Oecologia* 107 (1): 131-40. <https://doi.org/10.1007/BF00582243>.
- Mezeli, Malika M., Stephen Page, Timothy S. George, Roy Neilson, Andrew Mead, Martin S. A. Blackwell, et Philip M. Haygarth. 2020. « Using a Meta-Analysis Approach to Understand Complexity in Soil Biodiversity and Phosphorus Acquisition in Plants ». *Soil Biology and Biochemistry* 142 (mars): 107695. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107695>.



- Nguyen, Christophe. 2003. « Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls ». *Agronomie* 23 (5-6): 375-96. <https://doi.org/10.1051/agro:2003011>.
- Olsen, Sterling R. (Sterling Robertson). 1954. *Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate*. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture. <http://archive.org/details/estimationofavai939olse>.
- Pan, Jilang, Jane A. Plant, Nikolaos Voulvoulis, Christopher J. Oates, et Christian Ihlenfeld. 2010. « Cadmium Levels in Europe: Implications for Human Health ». *Environmental Geochemistry and Health* 32 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10653-009-9273-2>.
- Poirier, Yves, et Marcel Bucher. 2002. « Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis ». *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 1 (septembre): e0024. <https://doi.org/10.1199/tab.0024>.
- Postma-Blauw, M. B., F. T. de Vries, R. G. M. de Goede, J. Bloem, J. H. Faber, et L. Brussaard. 2005. « Within-Trophic Group Interactions of Bacterivorous Nematode Species and Their Effects on the Bacterial Community and Nitrogen Mineralization ». *Oecologia* 142 (3): 428-39. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1741-x>.
- Ranoarisoa, Mahafaka Patricia, Jean Trap, Anne-Laure Pablo, Damien Dezette, et Claude Plassard. 2020. « Micro-Food Web Interactions Involving Bacteria, Nematodes, and Mycorrhiza Enhance Tree P Nutrition in a High P-Sorbing Soil Amended with Phytate ». *Soil Biology and Biochemistry* 143 (avril): 107728. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107728>.
- Rao, A. Subba, K. Sammi Reddy, et P. N. Takkar. 1997. « Malachite green method compared to ascorbic acid for estimating small amounts of phosphorus in water, 0.01 M calcium chloride, and olsen soil extracts ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28 (6-8): 589-601. <https://doi.org/10.1080/00103629709369813>.
- Richardson, Alan E., Jonathan P. Lynch, Peter R. Ryan, Emmanuel Delhaize, F. Andrew Smith, Sally E. Smith, Paul R. Harvey, et al. 2011. « Plant and Microbial Strategies to Improve the Phosphorus Efficiency of Agriculture ». *Plant and Soil* 349 (1): 121-56. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0950-4>.
- Richardson, Alan E., et Richard J. Simpson. 2011. « Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus ». *Plant Physiology* 156 (3): 989-96. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>.
- Ryss, Alexander Y. 2017. « A Simple Express Technique to Process Nematodes for Collection Slide Mounts ». *Journal of Nematology* 49 (1): 27-32. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-043>.
- Shi, Shengjing, Alan E. Richardson, Maureen O'Callaghan, Kristen M. DeAngelis, Eirian E. Jones, Alison Stewart, Mary K. Firestone, et Leo M. Condon. 2011. « Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities ». *FEMS Microbiology Ecology* 77 (3): 600-610. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01150.x>.
- Siegenthaler, Maja Barbara, Federica Tamburini, Emmanuel Frossard, Oliver Chadwick, Peter Vitousek, Chiara Pistocchi, Éva Mészáros, et Julian Helfenstein. 2020. « A Dual Isotopic (32P and 18O) Incubation Study to Disentangle Mechanisms Controlling Phosphorus Cycling in Soils from a Climatic Gradient (Kohala, Hawaii) ». *Soil Biology and Biochemistry* 149 (octobre): 107920. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107920>.
- Smit, A. L., P. S. Bindraban, J. J. Schröder, J. G. Conijn, et H. G. van der Meer. 2009. « Phosphorus in Agriculture: Global Resources, Trends and Developments : Report to the Steering Committee Technology Assessment of the Ministry of Agriculture, Nature and Food



Quality, The Netherlands, and in Collaboration with the Nutrient Flow Task Group (NFTG), Supported by DPRN (Development Policy Review Network) ». 282. Wageningen: Plant Research International. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/383557>.

Sohlenius, Björn. 1969. « The Monoxenic Cultivation of Some Rhabditid Nematodes ». *Oikos* 20 (2): 287-93. <https://doi.org/10.2307/3543195>.

Tamburini, F., S. M. Bernasconi, A. Angert, T. Weiner, et E. Frossard. 2010. « A Method for the Analysis of the  $\Delta^{18}\text{O}$  of Inorganic Phosphate Extracted from Soils with HCl ». *European Journal of Soil Science* 61 (6): 1025-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01290.x>.

Trap, Jean, Michael Bonkowski, Claude Plassard, Cécile Villenave, et Eric Blanchart. 2016. « Ecological Importance of Soil Bacterivores for Ecosystem Functions ». *Plant and Soil* 398 (1): 1-24. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2671-6>.

Treonis, A. M., D. H. Wall, et R. A. Virginia. 2000. « The Use of Anhydrobiosis by Soil Nematodes in the Antarctic Dry Valleys ». *Functional Ecology* 14 (4): 460-67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00442.x>.

Turner, B. L., A.E. Richardson, et E. J. Mullaney. 2007. « Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment ». *CABI Books*, CAB International, , 186-206.

Turner, Benjamin L. 2010. « Variation in PH Optima of Hydrolytic Enzyme Activities in Tropical Rain Forest Soils ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (19): 6485-93. <https://doi.org/10.1128/AEM.00560-10>.

Venette, Robert, Fatma Mostafa, et Howard Ferris. 1997. « Trophic interactions between bacterial-feeding nematodes in plant rhizospheres and the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis* to suppress *Heterodera* ... ». *Plant and Soil* 191 (avril): 213-23. <https://doi.org/10.1023/A:1004214032368>.

Zelenev, V. V, R Berkelmans, A. H. C van Bruggen, T Bongers, et A. M Semenov. 2004. « Daily Changes in Bacterial-Feeding Nematode Populations Oscillate with Similar Periods as Bacterial Populations after a Nutrient Impulse in Soil ». *Applied Soil Ecology* 26 (2): 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.003>.

Zheng, Jie, Francisco Dini-Andreote, Lu Luan, Stefan Geisen, Jingrong Xue, Huixin Li, Bo Sun, et Yuji Jiang. 2022. « Nematode Predation and Competitive Interactions Affect Microbe-Mediated Phosphorus Dynamics ». *mBio* 13 (3): e03293-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03293-21>.



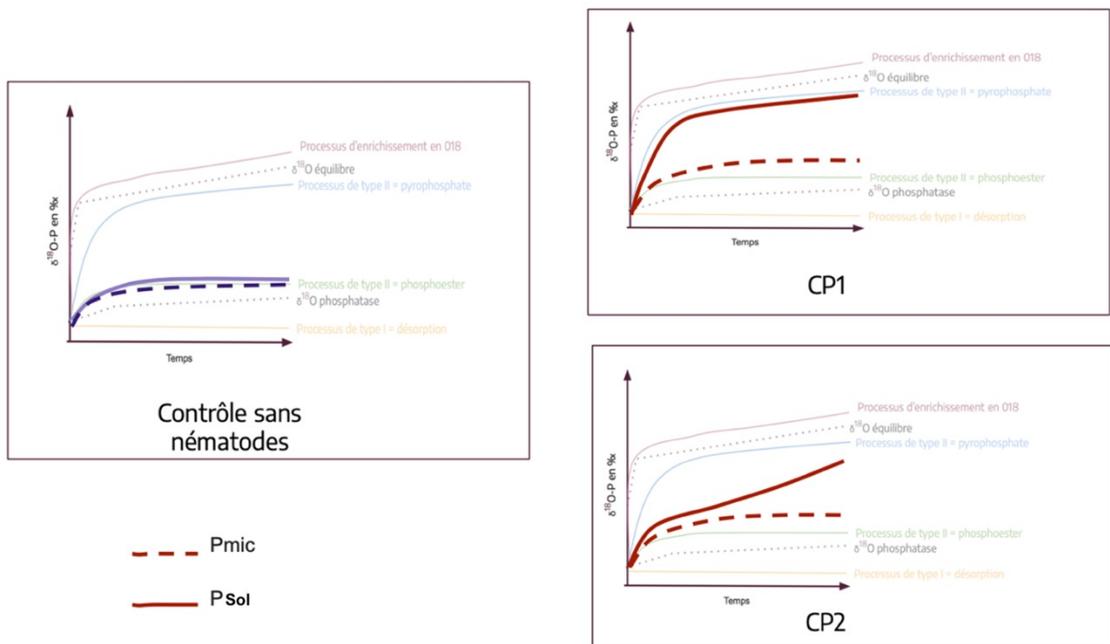
## Annexe 1 : Le projet O-NEMATO-P

Le projet O-NEMATO-P (Optimizing NEMATode-driven P availability) initié en 2022, et associé à la thèse de Margot Brondani, vise à améliorer la disponibilité du P pour les cultures en mobilisant les services écosystémiques rendus par les nématodes. En se basant sur le constat que les effets spécifiques des espèces de nématodes bactérivores sur les flux de P et leurs mécanismes associés restent mal identifiés, le projet se focalise sur les processus écologiques, les mécanismes et les facteurs de contrôle liés aux flux de P. Pour atteindre cet objectif, des techniques innovantes sont mobilisées, en particulier la technique de marquage  $^{18}\text{O}$  et la co-inoculation multi-espèces. Les connaissances fondamentales assimilées pendant ce projet contribueront à mieux comprendre le rôle des nématodes du sols sur la phyto-disponibilité du P, mais aussi à identifier les drivers biotiques et abiotiques qui contrôlent la disponibilité du P induite par les nématodes. À terme, et dans le cadre actuel de l'innovation agronomique nourrie par l'agroécologie et l'intensification des services écologiques, l'objectif est de proposer un indicateur innovant de la boucle microbienne du sol pour le P. Cela devrait pouvoir être utilisé pour identifier les pratiques agricoles encourageant l'exploitation de sources de P peu disponibles et en limitant ainsi l'utilisation d'engrais minéraux coûteux, non renouvelables et impactant largement l'environnement.

## Annexe 2 : Hypothèses de travail testées pour les analyses isotopiques

Les hypothèses présentées ici ont été élaborées sur la base des travaux effectuées par Siegenthaler et al., (2020). Cependant, les résultats attendus restent très hypothétiques étant donné qu'il n'existe pas de précédent sur le suivi de la composition isotopique des molécules de P dans des conditions impliquant différentes espèces de nématodes bactériovores.

Dans les conditions contrôle (figure ci-dessous), et étant donné la faible disponibilité en P du sol, nous nous attendons à ce que le  $\delta^{18}\text{O-P}$  microbien (P de la biomasse microbienne) et le  $\delta^{18}\text{O-P}$  sol (P de la solution du sol) suivent la même tendance, avec des processus proches de ceux médiés par les phosphatases (enzymes très actives dans le milieu extracellulaire quand le P est limitant (Park et al., 2022)). En ce qui concerne le P du sol dans les conditions avec nématodes, nous pensons que l'activité de la pyrophosphatase sera le processus majoritaire de la minéralisation, notamment à cause de la lyse des cellules bactériennes liée à la prédation par les nématodes. Des pyrophosphatases capables de cliver toutes les liaisons P-O devraient être libérées dans le milieu extra-cellulaire et conserver, au moins de manière temporaire, leur activité. La pyrophosphatase devrait avoir pour effet d'approcher le  $\delta^{18}\text{O-P}$  du sol de l'équilibre, pour les cp-1 cela devrait être visible dès les premiers jours de l'expérience en raison du cycle de vie court et de l'activité métabolique élevée de ces nématodes. Pour les nématodes de type cp-2, un délai avant le début de la minéralisation devrait être observé en raison du temps un peu plus long que nécessite leur installation dans le milieu. En ce qui concerne le P microbien, et en raison de la préférence des bactéries pour les ions orthophosphates les plus légers, nous nous attendons dans tous les cas à observer un  $\delta^{18}\text{O-P}$  inférieur à celui observé dans le P du sol, les enzymes expliquant le  $\delta^{18}\text{O-P}$  seraient alors les phosphatases ayant un fractionnement isotopique négatif.



Annexe 2 : Hypothèses sur les résultats de l'expérience. Le  $\delta^{18}\text{O}$  équilibre (correspond à l'équilibre entre  $^{18}\text{O}$  et  $^{16}\text{O}$  dans l'eau et les ions orthophosphates) et le  $\delta^{18}\text{O}$  phosphatase (correspond à l'équilibre entre  $^{18}\text{O}$  et  $^{16}\text{O}$  pouvant être atteint avec les phosphatases qui ont un fractionnement isotopique négatif) sont des valeurs calculées. Les processus de type I correspondent à de la désorption, aucun atome d'O n'est échangé.

Les processus de type II correspondent au fonctionnement d'enzymes i) la pyrophosphatase qui tend à approcher l'équilibre isotopique en échangeant tous les atomes d'O des ions orthophosphates dans le milieu extracellulaire ; ii) la phosphoesterase qui appartient au groupe des phosphatases.

### Annexe 3 : Détails du protocole pour les analyses génomiques (Brondani et al. 2022)

L'ADN génomique total est extrait de 0,250 g de mélange sol-billes à l'aide du kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. Les communautés bactériennes sont caractérisées à partir de la région variable, V3-V4, du gène de l'ARNr 16S en utilisant les amorces 341F CCTAYGGGRBGCASCAG et 806R GGACTACNNGGTATCTAAT. L'amplification de l'ADN est réalisée par PCR dans un volume total de 15 µl contenant 1X master mix, Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), 0,13 µM de chaque amorce et 2 µl d'ADN génomique dilué dix fois dans les conditions suivantes : 95 °C pendant 5 min, 35 cycles de 30 s à 95 °C, 55 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 30 s, suivis de 30 min à 60 °C. Les amplifications PCR sont vérifiées par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5 %. Les produits PCR sont purifiés à l'aide du kit Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Italie, Milano). Chaque produit PCR est marqué à l'aide du Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA) dans une deuxième réaction PCR. Les produits PCR marqués sont purifiés à l'aide du kit Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Italie, Milano) et quantifiés à l'aide du spectromètre Tecan Nanoquant. Des quantités égales d'ADN pour chaque échantillon sont regroupées et nettoyées à l'aide du kit Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Italie, Milano). La bibliothèque d'ADN est contrôlée sur l'analyseur de fragments d'Advanced Analytical et quantifiée à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase quantitative SYBR Green sur PCR en temps réel. La bibliothèque d'ADN est finalement séquencée sur un instrument Illumina Miseq avec la technologie 2 × 250 pb et la chimie V2 (Illumina Inc., San Diego, California, USA). Les données démultiplexées des amplicons sont traitées à l'aide du pipeline FROGS3.2 (Escudié et al., 2018) hébergé par la galaxie sur la plateforme Genotoul. Les séquences R1 et R2 sont fusionnées après un filtrage de qualité permettant un taux de mésappariement de 0,1 et une taille minimale de 420 pb. Pour l'analyse, les séquences sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) avec un nombre maximum de différences entre les séquences dans chaque étape d'agrégation de 1 en utilisant swarm (Mahé et al., 2014) implémenté dans FROGS3.2. Les séquences chimériques sont identifiées avec l'outil vsearch (Rognes et al., 2016) et supprimées du jeu de données. Les séquences de semences d'OTUs sont classées taxonomiquement et alignées sur la base de données 16S SILVA138.1 (Quast et al., 2012). Les alignements multiples des OTUs sont réalisés avec Mafft (Katoh et Standley, 2013) et un arbre phylogénétique enraciné est créé avec FastTree (Price et al., 2009) et Phangorn R-package (Schliep et al., 2021). Le fichier biom, l'arbre calculé et les métadonnées supplémentaires sont fusionnés dans un objet phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013) pour les analyses statistiques. Des contrôles des contaminants (extraction à blanc et PCR) sont utilisés pour éliminer les contaminants de l'ensemble des données. Nous additionnons ensuite la fréquence des taxons au niveau de la famille.

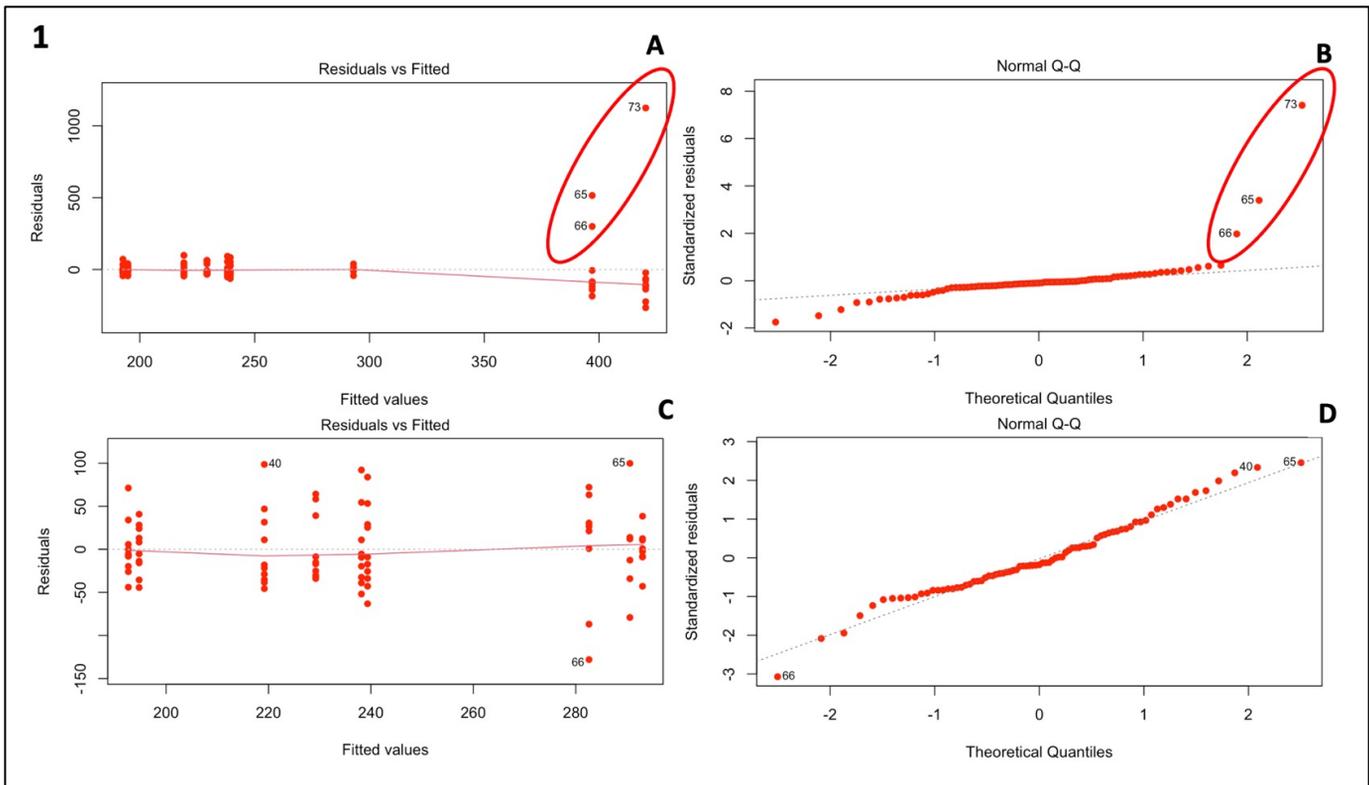
Annexe 4 : Exemple de figures réalisées pendant la phase exploratoire des données (cas du TOC)

Les figures ont été réalisées avec un modèle linéaire (mod1) tel que :

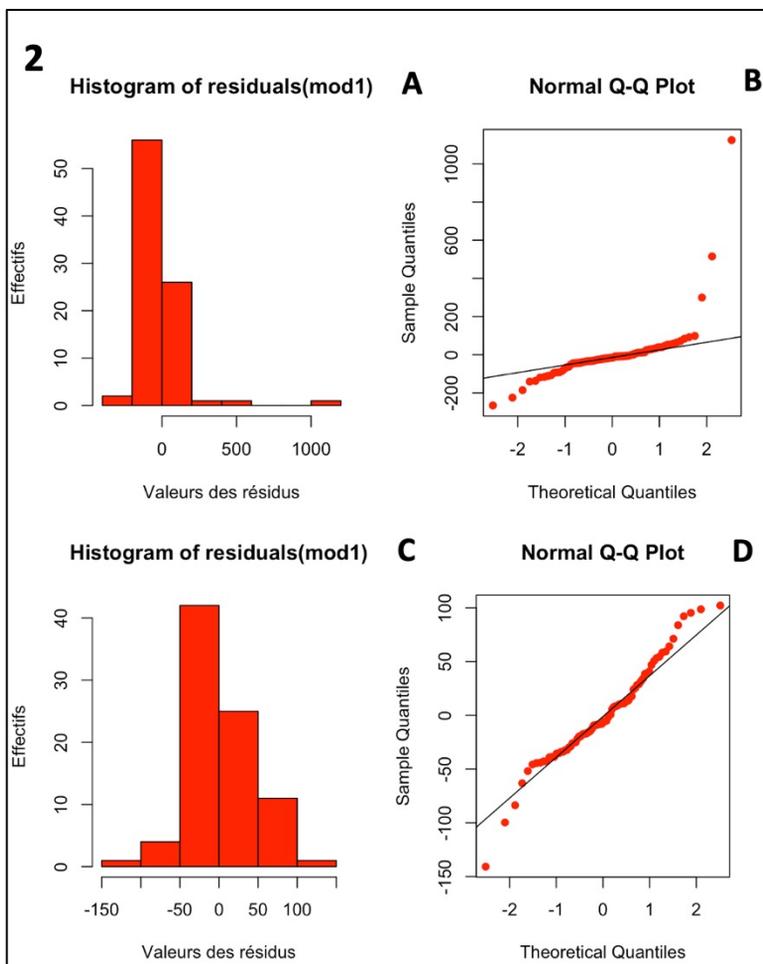
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \varepsilon$$

Avec :

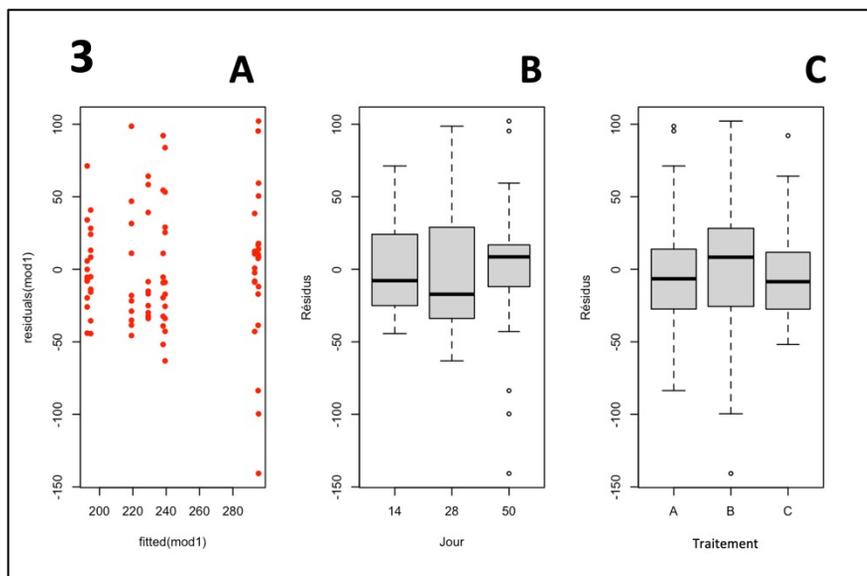
- Y représente la variable expliquée, ici le Total Organic Carbon (TOC)
- $X_1$  représente la variable explicative "Jour", qui est un facteur à plusieurs niveaux (14, 28 et 50)
- $X_2$  représente la variable explicative "Traitement", qui est également un facteur à plusieurs niveaux (A, B et C respectivement *Acrobelloides*, *Brevibucca* et Contrôle)
- $\beta_0$  est l'intercept
- $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , et  $\beta_3$  sont les coefficients de régression
- $X_1 X_2$  représente l'interaction entre les variables indépendantes "Jour" et "Traitement"
- $\varepsilon$  représente l'erreur aléatoire



Annexe 4.1 : Graphiques permettant l'identification des outliers, A et B ont été réalisées sur le jeu de données initiales tandis que C et D ont été créés à partir du jeu de données ne comportant plus les points identifiés en A et B (66 ; 65 et 73).



Annexe 4.2 : Représentation graphiques utilisées pour la vérification de la normalité en A et B les plots obtenus avant la suppression des outsiders tandis que C et D ont été créés à partir du jeu de données final, des tests de normalité (Shapiro-Wilk) ont également été appliqués (ici,  $W=0,976$  et  $p=0,14$ )



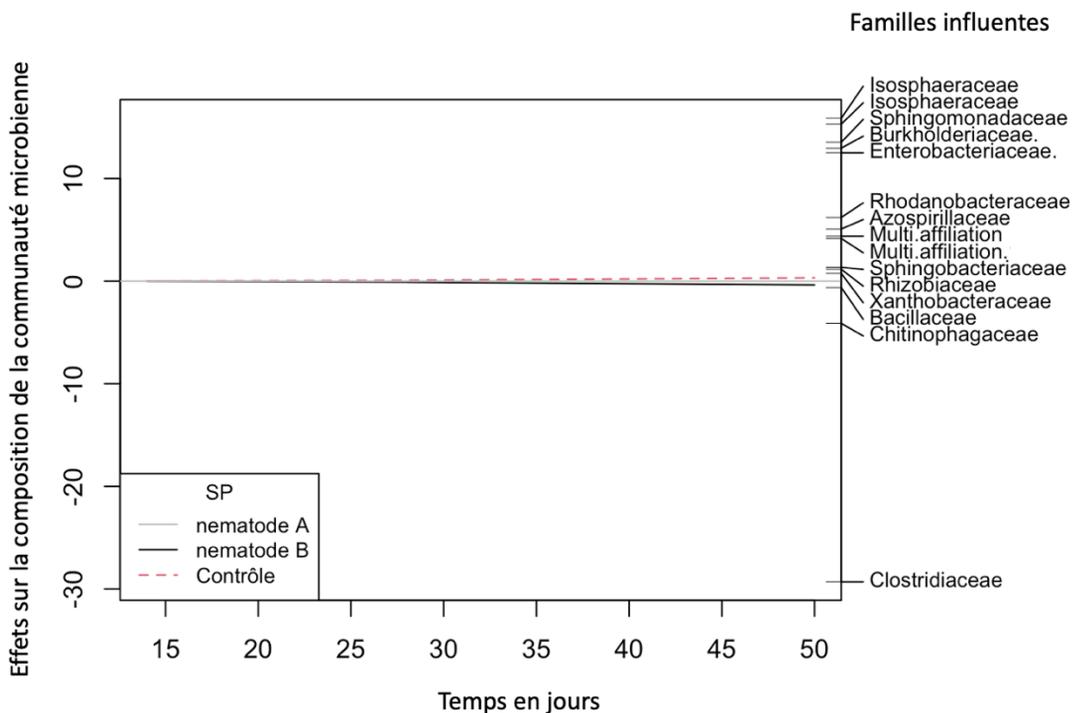
Annexe 4.3 : Représentation graphiques utilisées pour la vérification de l'homocédasticité, ici A, B et C ont été obtenues à partir du jeu de données ne comportant plus les outsiders

Annexe 5 : Tableau des résultats de l'analyse Tukey pour le pOlsen (14, 28 et 50 correspondent au jours de l'expérience, A, B et C au traitement appliqué, respectivement Accrobeloides, Brevibucca, Contrôle

Termes du modèle	Comparaison	estimate	Borne inférieure de l'IC	Borne supérieure de l'IC	P-value
Effet Jour	28-14	32,733	26,399	39,067	>0,001
Effet Jour	50-14	-18,266	-24,657	-11,874	>0,001
Effet Jour	50-28	-50,998	-57,443	-44,554	>0,001
Effet traitement	B-A	-4,686	-10,966	1,594	0,182
Effet traitement	C-A	-14,941	-21,393	-8,489	>0,001
Effet traitement	C-B	-10,255	-16,707	-3,803	>0,001
Effet d'interaction	28:A-14:A	34,379	19,853	48,905	>0,001
Effet d'interaction	50:A-14:A	-24,902	-39,427	-10,376	>0,001
Effet d'interaction	14:B-14:A	-7,350	-21,876	7,176	0,794
Effet d'interaction	28:B-14:A	28,485	13,960	43,011	>0,001
Effet d'interaction	50:B-14:A	-25,716	-40,242	-11,190	>0,001
Effet d'interaction	14:C-14:A	-16,398	-30,924	-1,872	0,015
Effet d'interaction	28:C-14:A	10,116	-4,808	25,040	>0,001
Effet d'interaction	50:C-14:A	-28,364	-43,771	-12,957	>0,001
Effet d'interaction	50:A-28:A	-59,281	-73,806	-44,755	>0,001
Effet d'interaction	14:B-28:A	-41,729	-56,254	-27,203	>0,001
Effet d'interaction	28:B-28:A	-5,894	-20,419	8,632	0,930
Effet d'interaction	50:B-28:A	-60,095	-74,621	-45,569	>0,001
Effet d'interaction	14:C-28:A	-50,777	-65,303	-36,251	>0,001
Effet d'interaction	28:C-28:A	-24,263	-39,186	-9,339	>0,001
Effet d'interaction	50:C-28:A	-62,743	-78,150	-47,336	>0,001
Effet d'interaction	14:B-50:A	17,552	3,026	32,078	0,007
Effet d'interaction	28:B-50:A	53,387	38,861	67,913	>0,001
Effet d'interaction	50:B-50:A	-0,814	-15,340	13,712	1,000
Effet d'interaction	14:C-50:A	8,503	-6,022	23,029	0,637
Effet d'interaction	28:C-50:A	35,018	20,094	49,942	>0,001
Effet d'interaction	50:C-50:A	-3,462	-18,869	11,945	0,998
Effet d'interaction	28:B-14:B	35,835	21,309	50,361	>0,001
Effet d'interaction	50:B-14:B	-18,366	-32,892	-3,840	0,004
Effet d'interaction	14:C-14:B	-9,048	-23,574	5,477	0,557
Effet d'interaction	28:C-14:B	17,466	2,542	32,390	>0,001
Effet d'interaction	50:C-14:B	-21,014	-36,421	-5,607	>0,001
Effet d'interaction	50:B-28:B	-54,201	-68,727	-39,675	>0,001
Effet d'interaction	14:C-28:B	-44,884	-59,409	-30,358	>0,001
Effet d'interaction	28:C-28:B	-18,369	-33,293	-3,445	0,005
Effet d'interaction	50:C-28:B	-56,849	-72,256	-41,442	>0,001
Effet d'interaction	14:C-50:B	9,318	-5,208	23,843	0,517
Effet d'interaction	28:C-50:B	35,832	20,908	50,756	>0,001
Effet d'interaction	50:C-50:B	-2,648	-18,055	12,759	1,000
Effet d'interaction	28:C-14:C	26,514	11,591	41,438	>0,001
Effet d'interaction	50:C-14:C	-11,966	-27,372	3,441	0,259
Effet d'interaction	50:C-28:C	-38,480	-54,263	-22,697	>0,001

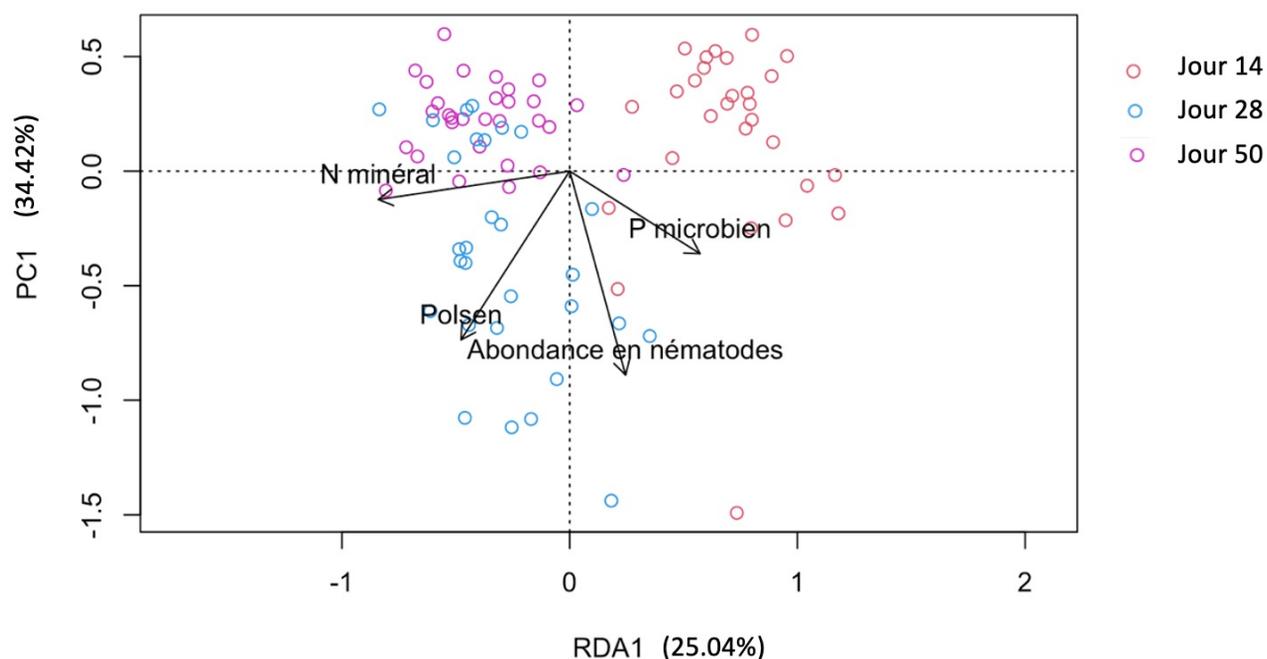
## Annexe 6 : Compléments sur les analyses de la composition bactériennes

L'analyse conjointe de la PRC ainsi que de la Figure 9, montre que l'effet des nématodes sur la composition de la communauté microbienne augmente avec le temps, en particulier pour les cp1 (*Brevibucca*).



Annexe 6 : Courbes de Réponse Principale pour les traitements nématodes avec des observations répétées (PRC) avec les cosmes contrôle (C), les nématodes *Acrobeloides* (A) et *Brevibucca* (B). Le biplot sur le côté gauche représente les trajectoires temporelles des différents traitements (A, B, C). Les familles indiquées sur le côté droit du graphique sont celles qui avaient un effet majoritaire sur la composition bactérienne.

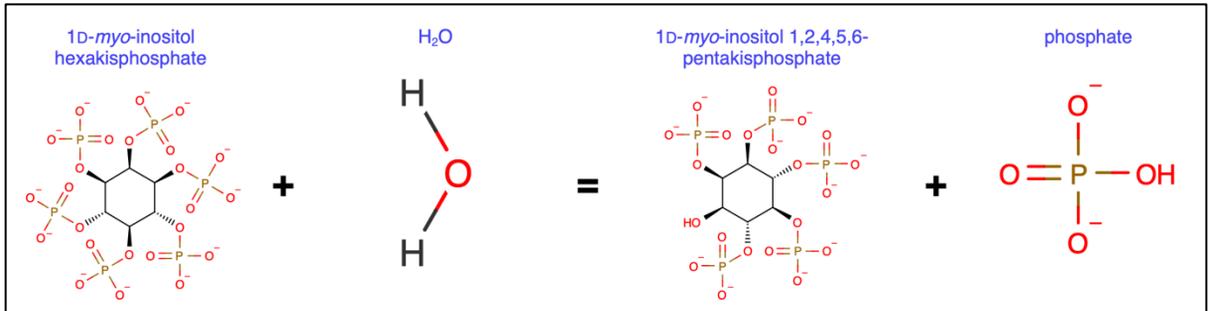
## Annexe 7 : Apport complémentaires pour les analyses multivariées



*Annexe 7 : Analyse en Composantes Principales avec un axe contraint RDA (Redundancy Analysis) prenant en compte la dépendance temporelle des analyses*

L'analyse en composante principale montre que l'axe contraint (RDA1) explique 25,04 % de la variance totale, tandis que l'axe non contraint (PC1) explique une plus grande part de la variance : 34,42 %. L'axe contraint indique comment les variables réponses (N minéral, P Olsen, P microbien et Abondance en nématodes) se comportent différemment différemment en fonction des dates d'échantillonnage de l'expérience (Jours 14, 28 et 50).

Annexe 8 : Détails sur l'action de la phytase



D'après « Rhea- Annotated reactions database » : <https://www.rhea-db.org/rhea/16989>

 	Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosociétés Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal Option : Fonctionnement et gestion des agrosystèmes Responsable d'option : Mathieu Carof
Auteur(s) : Maëlle Maestrali Date de naissance* : 15/02/2000	Organisme d'accueil : UMR Eco&Sols Adresse : 2 Place Viala 34060, Montpellier France
Nb pages : 20 Annexe(s) : 8	Maître de stage : Jean Trap, Margot Brondani, Chiara Pistocchi
Année de soutenance : 2023	
Titre français : Minéralisation du phosphore organique par le micro-réseau trophique du sol Titre anglais : Mineralization of organic phosphorus by the soil trophic micro-network	
<p>Résumé : La gestion actuelle des réserves en phosphore (P) minéral n'est pas durable et est source d'importantes tensions géopolitiques. Les services écosystémiques rendus par biodiversité du sol peuvent-être envisagés comme une solution pour apaiser les tensions pesant sur les ressources de P minéral en mobilisant les pools de P organiques. Les nématodes bactérivores sont des animaux abondants dans le sol qui régulent les communautés microbiennes et améliorent la disponibilité du P assimilable par les plantes dans le sol. Cependant, les mécanismes à l'origine des effets de ce micro-réseau trophique dans le sol ne sont pas encore clairement identifiées. Dans cette étude, les effets de deux classes de nématodes bactérivores (<i>cp1</i> et <i>cp2</i>) sur la composition bactérienne ont été déterminés ainsi que la disponibilité des nutriments dans le sol à 14, 28 et 50 jours. Après 14 et 28 jours d'incubation, l'inoculation de nématodes bactérivores a augmenté la quantité de P extractible Olsen de 64,0 et 44,0%, ces effets n'étaient plus visibles au bout de 50 jours et suivaient la décroissance des populations de nématodes. Des changements significatifs dans la composition de la communauté bactérienne avec l'apport de nématodes ont été observés suggérant que ceux-ci opèrent une sélection des bactéries dans le sol. Enfin, la pertinence d'utiliser un marquage isotopique (<sup>18</sup>O) est discutée pour mieux caractériser les modifications chimiques subies par les ions orthophosphates dans le sol. Ce travail ainsi que les analyses menées sur la composition isotopiques des ions orthophosphates devraient donner des indices précieux pour mieux appréhender les mécanismes liés à la minéralisation du P.</p>	
<p>Abstract : The current management of mineral phosphorus (P) reserves is not sustainable and contributes to significant geopolitical tensions. Ecosystem services provided by soil biodiversity can be considered as a solution to alleviate the pressures on mineral P resources by mobilizing organic P pools. Bacterivorous nematodes are abundant soil organisms that regulate microbial communities and enhance the availability of plant-assimilable P in the soil. However, the mechanisms underlying the effects of this micro-trophic network in the soil are not yet clearly understood. In this study, we investigated the effects of two classes of bacterivorous nematodes (<i>cp1</i> and <i>cp2</i>) on bacterial composition and nutrient availability in the soil at 14, 28, and 50 days. After 14 and 28 days of incubation, the inoculation of bacterivorous nematodes increased the amount of extractable Olsen P by 64.0% and 44.0%, respectively. However, these effects were no longer visible after 50 days and correlated with the decline in nematode populations. We also observed significant changes in the composition of the bacterial community with the addition of nematodes, suggesting their role in selecting soil bacteria. Finally, we discuss the relevance of using isotopic labeling (<sup>18</sup>O) to better characterize the chemical modifications undergone by orthophosphate ions in the soil. This work, along with isotopic analysis of orthophosphate ions, should provide valuable insights into understanding the mechanisms related to P mineralization.</p>	
Mots-clés : Nématodes bactérivores, Boucle microbienne, Communautés bactériennes, Phytate, Approche isotopique	
Key Words: Bacterial-feeding nematodes, Microbial loop, Bacterial composition, Phytate, Isotope-based approach	