



# UNIVERSITÉ de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de biologie fondamentale et appliquée

École Doctorale Normande Chimie-Biologie



## THÈSE

présentée par

Melle Tiphaine TALLEC

et soutenue

le 18 mars 2008

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de CAEN**

**Spécialité** : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions.

**Arrêté du 07 août 2006**

**Titre** : Effets d'un double gradient azote/soufre sur la structure des communautés végétales de prairies bas-normandes : dynamique de l'acquisition des ressources minérales et des interactions compétitives



### MEMBRES du JURY

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

**Rapporteur**

Mr Pablo CRUZ, Chargé de Recherche, INRA Toulouse

**Rapporteur**

Mme Sandra LAVOREL, Directrice de Recherche, CNRS Grenoble

Mme Estelle LANGLOIS, Maître de Conférences, Université de Rouen

Mr Sylvain DIQUÉLOU, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Alain OURRY, Professeur, Université de Caen

**Directeur de Thèse**



# UNIVERSITÉ de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de biologie fondamentale et appliquée

École Doctorale Normande Chimie-Biologie



## THÈSE

présentée par

Melle Tiphaine TALLEC

et soutenue

le 18 mars 2008

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT de L'UNIVERSITÉ de CAEN**

**Spécialité** : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions.

**Arrêté du 07 août 2006**

**Titre** : Effets d'un double gradient azote/soufre sur la structure des communautés végétales de prairies bas-normandes : dynamique de l'acquisition des ressources minérales et des interactions compétitives



### MEMBRES du JURY

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

**Rapporteur**

Mr Pablo CRUZ, Chargé de Recherche, INRA Toulouse

**Rapporteur**

Mme Sandra LAVOREL, Directrice de Recherche, CNRS Grenoble

Mme Estelle LANGLOIS, Maître de Conférences, Université de Rouen

Mr Sylvain DIQUÉLOU, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Alain OURRY, Professeur, Université de Caen

**Directeur de Thèse**

## Remerciements

*J'ai réalisé la présente étude à l'UMR INRA 950 EVA "Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N, C, S" à l'Université de Caen Basse-Normandie, au sein de l'équipe "Écologie des interactions plante-plante". J'ai effectué ce travail de thèse grâce à l'aide de nombreuses personnes auxquelles je tiens aujourd'hui adresser tous mes très sincères remerciements.*

*Je veux tout d'abord remercier, mon directeur de thèse, le Professeur Alain Ourry, Directeur de l'UMR EVA durant mon parcours recherche, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, tout d'abord en DEA, puis en thèse, puis pour m'avoir fournie les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse. Il a su se rendre disponible dès que nécessaire et, par sa capacité de synthèse, me conseiller quotidiennement, avec pertinence. Je le remercie également en tant que directeur de l'École Doctorale Normande Chimie-Biologie pour m'avoir fait bénéficier de nombreuses formations de qualité.*

*J'adresse un grand merci à mon co-directeur de thèse Sylvain Diquélou, Maître de Conférences à l'Université de Caen, qui m'a chaleureusement ouvert les portes de la recherche depuis plus de 4 années. Je le remercie pour m'avoir encadrée, conseillée et aidée pour la conduite de cette thèse, puis pour la grande disponibilité dont il a fait preuve dans la dernière ligne droite. Je le remercie également d'avoir suscité chez moi, un engouement certain pour la recherche en écophysiologie/écologie, et enfin, pour toute la confiance qu'il m'a constamment témoignée quant à la gestion de ce projet de thèse.*

*Mes remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté la lourde tâche d'éplucher ce manuscrit de thèse. Merci à Jean-françois Soussana, Directeur de Recherche INRA à Clermont-Ferrand, et Pablo Cruz, Chargé de Recherche INRA à Toulouse, qui me font l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance pour le temps qu'ils lui auront accordé.*

*Je veux également exprimer toute ma reconnaissance à Sandra Lavorel, Directrice de Recherche CNRS à Grenoble, et à Estelle Langlois, Maître de Conférences à l'Université de Rouen, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui sont intervenues de prêt ou de loin au cours de cette thèse, sur le terrain ou au laboratoire, et dont l'appui technique, très efficace, a largement contribué à l'aboutissement de ce projet de thèse. Sans eux, rien n'aurait été possible !*

*Merci, en premier lieu, au personnel du "Vieux Pin", Gabriel, Alain, Philippe, Patrick et Lulu sans l'aide de qui la conduite des expérimentations in situ se serait avérée bien difficile. Je les remercie pour nous*

*avoir fait bénéficier d'un matériel ingénieux et de qualité, de leurs compétences techniques, de leur aide si précieuse et de l'accueil chaleureux qu'ils nous ont chaque fois réservés.*

*Je veux remercier Raphaël Ségura et Anne-françoise Améline, les deux experts de la culture en serre, qui dès leur arrivée ont su me faciliter la tâche quant à la gestion de mes cultures en serre, notamment par la mise en place d'un arrosage automatique. Je me demande toujours comment je faisais avant sa mise en place ! Je les remercie également pour la grande disponibilité dont ils ont fait preuve en m'apportant leur aide, efficace et rigoureuse, pour toutes les récoltes effectuées en serre et in situ. J'ai toujours pu compter sur eux et eu confiance en eux, me permettant de reposer sur eux les yeux fermés. Merci à Anne-françoise pour toutes les discussions en route ou en triant l'herbe, toujours curieuse de tout apprendre et comprendre, de perfectionner les techniques, d'une énergie sans limite et d'une volonté sans faille.*

*Je veux aussi remercier l'ensemble des personnes qui ont bien voulu m'accorder de leur temps en participant aux récoltes de centaines de pots, s'étalant sur de longues journées jusqu'à plusieurs jours consécutifs, et grâce auxquelles la bonne ambiance a toujours régné. J'ai nommé Michelle, Josiane, Patrick, Josette, Emilienne, Marie-paule et j'en oublie car finalement tout le monde a su « mettre la main à la pâte », même le directeur du laboratoire de l'époque!*

*Merci à Alexandre Berthier et Charlotte Fauveau, deux très bons stagiaires de M1 dont l'aide m'a été très précieuse et a contribué à l'élaboration de ce manuscrit. Merci à tous les stagiaires qui sont passés par la salle de récolte, Elodie, Hubert, Anne-sophie...*

*Un grand merci à Dominique Ballois, un "MacGyver" à part entière sans qui l'expérimentation terrain n'aurait pas été aussi bien conduite et les parcelles entretenues. C'est à chaque fois dans des conditions optimales, que les récoltes ont pu être effectuées. J'ai également pu apprécier sa disponibilité, sa praticité et ses compétences épatantes à diverses reprises.*

*Merci à Servane Lemauiel – Lavenant pour m'avoir appris à maîtriser le logiciel de statistiques que je saurais maintenant initier à d'autres ! Pour avoir pris le temps de relire l'analyse bibliographique et pour le fond et la forme de ses critiques. Je suis également très reconnaissante à Emmanuelle Personeni pour sa grande disponibilité quant à relecture de différents papiers et les conseils qui accompagnent en retour.*

*Merci à Patrick Beauclair pour m'avoir aidée face aux difficultés, voire subtilités, du monde informatique ! Et pour m'avoir initiée à la mesure de la photosynthèse avec le Lycor.*

*Merci à Marie-Paule Bataillé, ainsi qu'à Raphaël Ségura dans la dernière ligne droite, pour les milliers d'analyses effectuées à l'IRMS, et avec patience je vous prie, car quand cette machine a décidé de cesser de fonctionner correctement, on ne sait combien de temps cela durera!*

*Je veux remercier tout spécialement Christine Gourbe pour sa grande disponibilité, ses compétences dans de très nombreux domaines, et sa patience face à une thésarde parfois étourdie ou maladroite !*

Également merci pour les repas partagés et très détendant du midi, et enfin pour son écoute, son amitié toujours réconfortante.

Merci à Josette pour le long temps passé pour mon compte aux micropesées. Sans son aide je m'y trouverais encore ! Merci aussi pour toutes nos discussions quotidiennes sur la pluie et le beau temps, qui m'ont chaque fois donné (ou redonné) le sourire et ont fait naître une belle complicité.

Je veux aussi remercier les membres du " sauc'bière ", j'ai nommé Philippe, JC, JB, Marie, Raphaël et Malo, Laurent, les anciens membres Bertrand, Jérémy et Julie, la petite Camille, et les nouveaux membres Antonin, José, François ....la liste est longue. Sans cette réunion de fin de semaine, mes fins de semaine durant cette dernière année de thèse auraient été moins folles ! Cela m'a chaque fois procuré une bonne dose de décompression. Je regrette d'ailleurs de ne pas y avoir adhérer plus tôt !

Merci à Marie et Marie-paule pour avoir partagé, dans la joie et la bonne humeur, des heures de relaxation au cours des séances d'étirement mais aussi des heures de défoulement intense sur des musiques endiablées lors des exercices cardiovasculaires.

Une belle pensée pour Virginie que je remercie pour les pauses café partagées, accompagnées de franche rigolade, et pour sa bonne humeur constante, enthousiasmante et hilarante !

Merci à Annette pour son attention, délicate, tout simplement... et nos échanges quotidiens, toujours encourageant, tant sur la thèse que sur le " tricot " ! Merci à Marie-Pascale pour sa constante gaieté et nos petites discussions, pour la plupart, très matinales !

Un spécial "Merci " à Fabien, mon cher voisin de bureau, pour la naissance d'une grande amitié, ses conseils quotidiens, tous aussi pertinents les uns que les autres ! Son aide à la prise de décision, son soutien, sa folie et pour m'avoir supporté durant plus de 4 années. Et j'oubliais ! Merci aussi pour son gâteau à la banane qui raffole de nombreuses papilles !

Puis je veux souhaiter " bon courage et bonne chance surtout! ", d'abord aux doctorants, déjà bien installés : Sébastien, Marie, Lucie, Virginie et Maha, et nouvellement arrivés : Alexandre et Romain G. puis aux stagiaires de DEA : Anne, Antonin, José et Romain P....Que la route soit longue !

Comme j'ai probablement oublié un certain nombre de personnes et que je ne veux pas faire de jaloux ! Je veux tout simplement remercier l'ensemble du personnel du laboratoire, pour son accueil et l'ambiance toujours au beau fixe, qui m'ont fait passé 3 très agréables années de thèse. Je me suis toujours rendue avec enthousiasme au laboratoire. S'il est indéniable que la thèse constitue une grande expérience professionnelle, elle représente aussi une grande expérience humaine, très enrichissante à tout point de vue, qui m'aura appris beaucoup et que je ne suis pas prête d'oublier. Mon labo de thèse me manquera....c'est sûr !

*Enfin je veux remercier l'ensemble de mes amis dont l'amitié et le soutien moral m'ont permis de garder le cap. La décompression a toujours été de rigueur grâce à eux!*

*Un immense merci à mes parents, mon frère, Jacques et Jean-sébastien pour leur affection inestimable et pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans la voie que j'avais choisie, puis pour avoir largement supporté mon "sale caractère" et mes sautes d'humeur dans la dernière ligne droite de cette thèse. Merci à mon cher papa pour avoir fait bénéficier le laboratoire, tout d'abord de ses talents de bricoleur pour les micro-tondeuses, et surtout de son "billic"! Cette traditionnelle crêpière bretonne, ayant servi à la réalisation de nombreuses "krampouezh", a souvent fait ravir les papilles d'un grand nombre de personnes du laboratoire. Merci à ma chère maman pour sa patience quotidienne, pour ses bons petits plats, pour avoir assuré l'intendance de tant de choses (linge...)! Merci à Punky, un cochon d'Inde tellement adorable, qu'à sa manière il a su se rendre réconfortant. Puis mes dernières pensées vont sans mesures à mon très cher "amoureux", Cédric, celui qui a suivi et subi au plus près cette expérience, qui a su écouté mes doutes récurrents, me réconforter quand je fléchissais et m'encourager constamment, même quand la distance nous a séparés.*

*Bonne lecture à tous,*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

---

<b>AFC</b> : Analyse factorielle des correspondances	<b>RubisCO</b> : Ribulose biphosphate carboxylase
<b>AFCVI (ou ACC)</b> : Analyse factorielle des correspondances sur variables instrumentales	oxygénase
<b>APS</b> : Ammonium persulfate	<b>s</b> : Seconde
<b>ASUE</b> : Apparent sulphur use efficiency	<b>S</b> : Soufre
<b>BSA</b> : Sérum albumine bovine	<b>S°</b> : Soufre element
<b>C</b> : Carbone	<b>SDF</b> : Sulphur derived from fertilizer
<b>cm</b> : Centimètre	<b>SDS</b> : Dodécyl sulfate de sodium
<b>EDTA</b> : Acide éthylène diamine tétraacétique	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> : Sulfate
<b>G</b> : Gramme	<b>TEMED</b> : N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine
<b>ha</b> : Hectare	<b>Tris</b> : Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
<b>IRMS</b> : Isotope ratio mass spectrometer	<b>VSP</b> : Vegetative storage proteins (protéines de réserve des organes végétatifs)
<b>K</b> : Potassium	<b>W</b> : Watt
<b>kg</b> : Kilogramme	
<b>kt</b> : Kilotonne	
<b>m<sup>2</sup></b> : Mètre carré	
<b>mg</b> : Milligramme	
<b>MS ou DM</b> : Matière sèche	
<b>N</b> : Azote	
<b>N<sub>2</sub></b> : Azote atmosphérique	
<b>NDF</b> : Nitrogen derived from fertilizer	
<b>OAS</b> : O-acétylsérine	
<b>P</b> : Phosphore	
<b>PAGE</b> : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	
<b>PAR</b> : Rayonnement photosynthétiquement actif	
<b>PVPP</b> : Polyvinyl-polyrrolidone	
<b>REP</b> : Relative ecological performance	
<b>RNUE</b> : Real nitrogen use efficiency	
<b>RSUE</b> : Real sulphur use efficiency	
<b>RPP</b> : Relative physiological performance	

## **PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

---

---

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

**Tallec T, Diquélou S, Lemauiel - Lavenant S, Cliquet JB, Lesuffleur F and Ourry A.** Nitrogen : Sulphur ratio alters competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne* under cutting: production and competitive abilities ; *acceptée en mars 2008 à European Journal of Agronomy (correspondant au chapitre I des résultats).*

**Tallec T, Diquélou S, Avice JC, Lesuffleur F, Lemauiel - Lavenant S, Cliquet JB and Ourry A.** N : S availabilities affect N and S use efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture ; *prochainement soumise à Annals of Botany (correspondant au chapitre II des résultats).*

**Tallec T, Diquélou S, Fauveau C, Bataillé MP and Ourry A.** Effects of nitrogen and sulphur gradients on plant performance, N & S use efficiencies and grassland community ; *soumise à Plant and Soil le 1<sup>er</sup> février 2008 (correspondant au chapitre III des résultats).*

**Tallec T, Diquélou S, Lemauiel - Lavenant S, Séguin V and Ourry A.** The effect of sulphur / nitrogen fertilization on grassland production and diversity ; *soumise à Agriculture, Ecosystems and Environment le 10 mars 2008 (correspondant au chapitre IV des résultats).*

Ce travail de recherche a également permis la réalisation de 3 communications lors de congrès nationaux :

### ***Communication orale***

**Tallec T, Diquélou S, Lemauiel S et Séguin V.** Effets d'un double gradient azote/soufre sur la dynamique des communautés végétales de prairies bas-normandes : production et composition floristique. *Colloque ECOVEG 3 2007, Interactions biotiques - I.N.R.A., Université de Bordeaux 1, 14-16 Mars 2007.*

***Communications affichées***

**Tallec T, Lemauviel S, Diquélou S et Ourry A.** Fertilisation N : S et modifications des interactions compétitives, exemple de *Trifolium repens* et *Lolium perenne*. *VIII<sup>èmes</sup> Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Ecophysiologie : réponses des organismes aux contraintes environnementales* - Nouan le Fuzelier, 7-9 Mars 2006.

**Tallec T, Lesuffleur F, Lemauviel S et Diquélou S.** Effets de la disponibilité en S et du ratio N : S disponible sur la performance d'espèces prairiales et sur la structuration de communautés végétales modèles. *VII<sup>èmes</sup> Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Ecophysiologie et réponses des organismes aux contraintes environnementales* - Super-Besse, 8-10 Mars 2005.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Remerciements</i> .....	<i>i</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>v</i>
<i>Publications &amp; communications scientifiques</i> .....	<i>vi</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>viii</i>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>I. Le soufre, élément biogène</b> .....	<b>- 6 -</b>
A. Rôle essentiel dans l'élaboration de la biomasse végétale .....	- 6 -
A.1 Cycle du soufre au sein de la plante.....	- 6 -
A.2 Le soufre, constituant de base de la biomasse végétale .....	- 8 -
A.2.1 Fonctionnement cellulaire, croissance et développement.....	- 8 -
A.2.2 Nutrition azotée.....	- 9 -
A.2.3 Photosynthèse.....	- 10 -
A.2.4 Résistance des végétaux aux contraintes et aux perturbations .....	- 11 -
B. Réserves et dynamique du soufre dans les écosystèmes .....	- 12 -
B.1 Le soufre dans l'atmosphère .....	- 13 -
B.2 Le soufre dans la pédosphère.....	- 14 -
B.2.1 Formes minérales.....	- 14 -
B.2.2 Formes organiques .....	- 15 -
B.3 Processus de transformation du soufre dans le sol.....	- 16 -
B.3.1 Processus d'immobilisation du soufre inorganique.....	- 16 -
B.3.2 Processus de minéralisation des pools de soufre organique .....	- 17 -
C. Apparition des carences en soufre.....	- 20 -
C.1 Diminution des entrées soufrées .....	- 20 -
C.1.1 Faibles retombées atmosphériques soufrées .....	- 20 -
C.1.2 Utilisation de fertilisants à faible contenu soufré .....	- 21 -
C.2 Augmentation des sorties soufrées.....	- 21 -
C.2.1 Lixiviation du soufre.....	- 21 -
C.2.2 Intensification des systèmes culturaux.....	- 22 -
C.3 Bilan du soufre en France.....	- 22 -
<b>II. Prévention et conséquences des carences en soufre</b> .....	<b>- 23 -</b>
A. Intérêt de la fertilisation soufrée.....	- 23 -
A.1 Principales formes de fertilisants soufrés .....	- 23 -
A.2 Intérêts d'une fertilisation combinée.....	- 24 -
B. Conséquences des carences en soufre à l'échelle de la plante et de la parcelle .....	- 26 -
B.1 Impact sur le rendement et la qualité : exemple de grandes cultures .....	- 26 -
B.2 Modification de la productivité et du fonctionnement des écosystèmes prairiaux .....	- 27 -

<i>B.2.1 Influence de la fertilisation soufrée sur la productivité des prairies</i>	- 27 -
<i>B.2.3 Influence de la fertilisation soufrée sur la qualité des espèces prairiales et des produits dérivés</i>	- 29 -
<i>B.2.3 Paramètres affectant les effets du soufre</i>	- 30 -
<i>B.2.4 Influence de la fertilisation soufrée sur la composition spécifique</i>	- 30 -
<b>III. Conclusion et objectifs du projet de thèse</b>	<b>- 31 -</b>
<b>MATÉRIELS &amp; MÉTHODES</b>	<b>- 34 -</b>
<b>I. Expérimentations in situ</b>	<b>- 34 -</b>
A. Dispositifs expérimentaux	- 34 -
<i>A.1 Caractérisation générale du site d'étude</i>	- 34 -
<i>A.2 Le climat</i>	- 35 -
<i>A.3 Les parcelles étudiées</i>	- 35 -
<i>A.4 Protocole de fertilisation</i>	- 36 -
B. Analyse de la dynamique des communautés	- 37 -
<i>B.1 Production de matière sèche</i>	- 37 -
<i>B.2 Composition floristique</i>	- 38 -
<b>II. Expérimentations en mésocosme</b>	<b>- 38 -</b>
A. Dispositifs expérimentaux	- 38 -
<i>A.1 Les espèces modèles</i>	- 38 -
<i>A.2 Modèles de cultures</i>	- 40 -
<i>A.3 Sélection et préparation du sol</i>	- 41 -
<i>A.4 Mise en place des cultures – Conditions de culture</i>	- 41 -
<i>A.4.1 Préparation des pots de culture</i>	- 41 -
<i>A.4.2 Implantation des cultures</i>	- 42 -
<i>A.4.3 Conditions de culture</i>	- 42 -
<i>A.5 Protocole de fertilisation</i>	- 43 -
B. Méthodes analytiques	- 43 -
<i>B.1 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits morphologiques des espèces</i>	- 43 -
<i>B.2 Incidence du ratio N : S du sol sur la compétitivité des espèces</i>	- 44 -
<i>B.2.1 Capacités compétitives de L. perenne et T. repens semés en association</i>	- 44 -
<i>B.2.2 Capacités compétitives au sein de la communauté 4 espèces</i>	- 45 -
<i>B.3 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits écophysologiques des espèces</i>	- 46 -
<i>B.3.1 Quantification de l'N total, du S total et mesure de l'N et du S dérivés de la fertilisation</i>	- 46 -
<i>B.3.2 Analyse des protéines solubles des stolons de Trifolium repens</i>	- 50 -
<b>III. Analyses statistiques des données</b>	<b>- 51 -</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>- 53 -</b>
<b>CHAPITRE I - Nitrogen : Sulphur ratio alters competition between Trifolium repens and Lolium perenne under cutting: production and competitive abilities (Article 1)</b>	<b>- 53 -</b>
<i>Préambule</i>	- 54 -
Abstract	- 56 -
<b>I. Introduction</b>	<b>- 57 -</b>
<b>II. Materials and methods</b>	<b>- 59 -</b>

A. Plant material and growth conditions.....	- 59 -
B. Plants harvests and morphological measurements .....	- 60 -
C. Statistical analysis .....	- 60 -
<b>III. Results.....</b>	<b>- 61 -</b>
A. Above-ground dry matter (DM).....	- 61 -
B. Leaf and tiller - stolon traits .....	- 62 -
C. Root dry matter (DM).....	- 62 -
D. Community structure and Competitive interactions.....	- 63 -
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>- 64 -</b>
A. N : S effects on individual plant performance.....	- 64 -
B. N : S effects on mixture composition and plant interactions.....	- 64 -
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>CHAPITRE II - N : S availabilities affect N and S use efficiencies differently by Trifolium repens and Lolium perenne when grown in monoculture or in mixture (Article 2) .....</b>	
	<b>- 68 -</b>
<i>Préambule</i> .....	- 69 -
<b>Abstract.....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>II. Materials and methods .....</b>	<b>- 73 -</b>
A. Greenhouse experiment.....	- 73 -
B. Treatments .....	- 73 -
C. Plant chemical analyses.....	- 74 -
D. Extraction and separation by SDS-PAGE of soluble proteins from stolons of <i>T. repens</i> .....	- 75 -
E. Data analysis.....	- 75 -
<b>III. Results.....</b>	<b>- 76 -</b>
A. N yield (Shoot N content, N% DW) and uptake (NDFE, RNUE) .....	- 76 -
B. S yield (Shoot S content, S% DW) and uptake (ASUE) .....	- 77 -
C. Dry matter and changes in soluble proteins in stolons of <i>T. repens</i> .....	- 78 -
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>- 79 -</b>
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>CHAPITRE III - Effects of nitrogen and sulphur gradients on plant performance, N &amp; S use efficiencies and grassland community (Article 3).....</b>	
	<b>- 83 -</b>
<i>Préambule</i> .....	- 84 -
<b>Abstract .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>- 86 -</b>
<b>II. Materials and methods .....</b>	<b>- 87 -</b>
A. Experimental set up.....	- 87 -
B. Measurement .....	- 88 -
C. Relative plant performances .....	- 89 -
D. Statistical analyses .....	- 90 -

<b>III. Results</b> .....	<b>- 90 -</b>
A. Above-ground DM production.....	- 90 -
C. S yield (Shoot S content, S% DM) and uptake (SDFF, RSUE) .....	- 93 -
D. N yield (Shoot N content, N% DM) and uptake (NDFF, RNUE).....	- 94 -
E. N : S ratio.....	- 96 -
<b>IV. Discussion</b> .....	<b>- 96 -</b>
A. Effect of N and S availabilities on species performance at establishment phase.....	- 96 -
B. Effect of N and S availabilities on species performance at regrowth phase.....	- 98 -
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>- 100 -</b>
<b>CHAPITRE IV - The effect of sulphur / nitrogen fertilization on grassland production and diversity (Article 4)</b> .....	<b>- 102 -</b>
<i>Préambule</i> .....	<i>- 103 -</i>
<b>Abstract</b> .....	<b>- 104 -</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>- 105 -</b>
<b>II. Methods</b> .....	<b>- 106 -</b>
A. Study site.....	- 106 -
B. Experimental design.....	- 107 -
C. Vegetation data.....	- 107 -
D. Data analysis .....	- 108 -
<b>III. Results</b> .....	<b>- 108 -</b>
A. Sown <i>Lolium – Trifolium</i> grassland .....	- 108 -
B. Natural grassland.....	- 109 -
<b>IV. Discussion</b> .....	<b>- 110 -</b>
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>- 112 -</b>
<b><i>DISCUSSION GÉNÉRALE</i></b> .....	<b><i>- 114 -</i></b>
<b>I. Les effets d’une déficience en soufre sur la dynamique des prairies</b> .....	<b>- 114 -</b>
<b>II. Les effets d’un apport en soufre sur la dynamique des prairies</b> .....	<b>- 116 -</b>
A. L’effet soufre est fonction de l’espèce et de la situation de voisinage.....	- 116 -
A.1 <i>Les Poacées</i> .....	- 116 -
A.2 <i>La Fabacée</i> .....	- 117 -
B. Les effets du soufre sur la structure des communautés .....	- 119 -
C. Pourquoi moins d’effets sur la productivité <i>in situ</i> .....	- 120 -
<b>III. Intérêts agronomiques et agro-écologiques</b> .....	<b>- 121 -</b>
<b>IV. Synthèse</b> .....	<b>- 124 -</b>
<b><i>CONCLUSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES DE RECHERCHE</i></b> ..	<b><i>- 127 -</i></b>

---

**VALORISATION DES COMPÉTENCES - “UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE”** ..... - 131 -

**Préambule**.....- 134 -

**I. Cadre général et enjeux de ma thèse**..... - 133 -

    A. Présentation de ma thèse ..... - 133 -

    B. Ma thèse dans son contexte ..... - 133 -

**II. Déroulement, gestion et coût de mon projet** ..... - 134 -

    A. Préparation et cadrage du projet..... - 134 -

    B. Réalisation technique ..... - 134 -

    C. Analyse et Valorisation des résultats..... - 135 -

    D. Conduite du projet..... - 135 -

    E. Coût de mon projet ..... - 135 -

**III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles** ..... - 137 -

    A. Compétences scientifiques ..... - 137 -

    B. Compétences méthodologiques ..... - 137 -

    C. Compétences techniques ..... - 138 -

    D. Compétences managériale et relationnelle ..... - 138 -

    E. Compétences rédactionnelle et communicationnelle..... - 138 -

    F. Capacité d’intégration dans un environnement professionnel ..... - 139 -

**IV. Résultats, impact de mon projet de thèse** ..... - 139 -

*Références bibliographiques* ..... - 141 -

*Table des illustrations* ..... - 159 -

*Annexes*..... - 166 -

***INTRODUCTION GÉNÉRALE***

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

---

Les prairies présentent un intérêt écologique indéniable qui peut être apprécié de plusieurs points de vue : biodiversité, stockage du carbone, protection des sols, épuration des eaux, etc. Parallèlement, elles représentent un intérêt économique majeur sur le plan fourrager. Elles constituent 40 % de la Surface Agricole Utile en France. Selon leur durée d'établissement et la composition de leur flore, on en distingue 3 types : *les prairies permanentes*<sup>1</sup>, c'est-à-dire des prairies naturelles non semées ou des prairies semées depuis plus de 10 ans ; *les prairies artificielles*<sup>1</sup>, qui sont des prairies âgées de 0 à 5 ans ensemencées principalement en Fabacées fourragères (trèfles, luzerne...), en culture pure ou en mélange ; et *les prairies temporaires*<sup>1</sup>, qui sont des prairies âgées de 0 à 5 ans ensemencées en Poacées fourragères (ray-grass, fétuque...), en culture pure, en mélange de Poacées ou en mélange avec des Fabacées.

Les prairies sont des formations végétales herbacées métastables dont la stabilité repose sur le maintien d'un équilibre dynamique entre les espèces coexistantes. Des mécanismes complexes régissent cet équilibre et conditionnent la possibilité d'occurrence des espèces. Celles-ci peuvent différer dans leurs exigences nutritionnelles, leur vitesse de croissance, leur réponse aux contraintes environnementales ou perturbations et la manière dont elles modifient l'environnement. La présence d'une espèce dépend à la fois de l'adéquation des conditions environnementales avec sa niche écologique, de son aptitude à entrer en compétition pour les ressources au sein de cette niche (Grime 1979 ; Tilman 1987 ; Weigelt *et al.* 2007 ; Suter *et al.* 2007) et de l'existence de niche de régénération (Grubb 1977). Toute modification de l'environnement peut potentiellement déplacer l'équilibre préexistant entre les espèces par la création, l'altération ou la disparition de niches, ce qui modifie le résultat des interactions compétitives (Braakhekke & Hooftman 1999). Les principaux facteurs d'ajustement auxquels sont soumises les prairies sont l'intensité et le rythme de défoliation et la manipulation de leur niveau trophique par fertilisation.

Une forte pression de gestion (fauche, pâturage...) permet le maintien de la dominance des herbacées tolérantes à la défoliation et module leurs capacités compétitives pour l'acquisition des ressources trophiques (Clement *et al.* 1978). L'occurrence des espèces au

---

<sup>1</sup> Larousse agricole 2002 Eds. Larousse, 513 p

sein du couvert végétal est conditionnée par deux principales composantes de l'adaptation à la défoliation : la fréquence et l'intensité (Cruz *et al.* 2002). Les espèces des prairies fréquemment et intensément défoliées (*Lolium perenne*, *Trifolium repens*, etc.) sont adaptées à cette défoliation : leur méristème positionné à proximité du sol leur permet d'émettre des feuilles même après défoliation rase. Cette adaptation résulterait aussi d'une durée de vie courte de leurs feuilles assurant un turn-over rapide des organes. A l'opposé, les espèces des prairies faiblement défoliées (*Festuca arundinacea*, *Brachypodium pinnatum*, etc.) ont un méristème positionné plus haut et présenteraient une durée de vie des organes plus longue (Cruz *et al.* 2002). Une pression de gestion suffisamment forte permet le maintien de la diversité (Willem *et al.* 1993) et plus spécifiquement celui des dicotylédones au sein des prairies. Elle assure la formation d'éclaircies permettant le développement de certaines dicotylédones qui présentent une moins bonne compétitivité, due à une vitesse de croissance plus lente que celle de Poacées très compétitives comme *Lolium perenne*.

Soumises à des cycles de défoliations répétées, les prairies, notamment de plaine, sont sujettes à une fertilisation azotée parfois importante. Ce moyen de gestion est reconnu pour stimuler la production de matière sèche (Reid 1966 ; Willems *et al.* 1993 ; Laws *et al.* 2000 ; Olde Venterink *et al.* 2001 ; Fridley 2002 ; Trott *et al.* 2004 ; Aydin & Uzun 2005). Il peut aussi affecter le fonctionnement et la structuration des communautés végétales. L'impact du niveau de fertilité du sol, initiale ou conférée par la fertilisation ou les dépôts atmosphériques (Bobbink 1998), sur la dynamique des espèces a très souvent été envisagé dans les écosystèmes prairiaux (par exemple de Vries & Kruijne 1960 ; Campbell & Grime 1983 ; Austin *et al.* 1985 ; Aerts & Van der Peijl 1993 ; Willems *et al.* 1993 ; Aerts 1999 ; Gough *et al.* 2000 ; Güsewell & Bollens 2003 ; Bonanomi *et al.* 2006 ; Gross *et al.* 2007). De nombreuses études ont montré qu'un changement dans l'équilibre des ressources trophiques, comme une modification de la disponibilité en azote (N ; Wedin *et al.* 1993 ; Piper 1995 ; Mountford *et al.* 1993 ; Groves *et al.* 2003 ; Jacquemyn *et al.* 2003), ou en phosphore (P ; Stocklin *et al.* 1998), modifie le résultat des interactions spécifiques entre les espèces. Ceci se caractérise notamment par des changements dans leur présence, abondance et biomasse relatives. **Une faible disponibilité en N** du sol limite la croissance et les capacités compétitives des espèces exploitatrices à stratégie de capture des ressources adaptées aux milieux riches (Bobbink *et al.* 1998) : des espèces comme *Lolium perenne*, disparaissent au profit d'espèces conservatrices adaptées aux milieux moins fertiles, comme *Poa* spp., *Agrostis* spp., *Holcus lanatus* et *Festuca rubra* (Frame *et al.* 1991). **L'élévation de la disponibilité en N**, même légère, comme celle induite par les dépôts atmosphériques d'N *via* les pollutions

(gaz et aérosols ; Bobbink 1998 ; Lee & Caporn 1998 ; Stevens *et al.* 2004) favorise la dominance des espèces compétitrices pour les ressources du sol, dont les capacités d'absorption des nutriments sont stimulées par l'augmentation de leur disponibilité, ceci au détriment des dicotylédones prairiales (Huston & DeAngelis 1994 ; BassiriRad 2000). Ce phénomène peut à terme, dans les prairies riches en N, conduire à la disparition d'espèces par exclusion compétitive. En effet, la vitesse de croissance supérieure et le port dressé des espèces exploitatrices empêchent la pénétration de la lumière dans le couvert, et leur permet de supplanter les autres espèces (Grime 1988 ; Bobbink 1998 ; Lee & Caporn 1998).

L'effet de la disponibilité en N est complexe, car il interagit avec celle d'autres nutriments qui modifient ses effets sur la végétation. Les espèces sont différemment affectées par les changements dans l'équilibre des ressources : la modification de leur croissance, voire leur place dans les communautés ne sont pas la résultante des variations d'un même type de ressource (Roem *et al.* 2002). Ce sont les effets relatifs de l'N et du P qui le plus souvent ont été étudiés. Willems *et al.* (1993) ont comparé les effets d'un apport d'N seul à ceux d'un apport croisé N/P sur une prairie calcaire. Ils observent que le traitement N+P entraîne non seulement une meilleure production que le traitement azoté seul mais permet aussi de maintenir la richesse spécifique qui s'effondre lorsque l'N est apporté seul. La production croissante de biomasse n'est donc pas synonyme d'une diminution de la richesse spécifique d'une communauté, si les différentes espèces voient leurs exigences trophiques satisfaites, ce qui est le cas quand le P est fourni. L'association Poacées/Fabacées, modèle couramment étudié, a fait l'objet d'observations similaires : l'apport d'engrais N stimule la croissance des Poacées au détriment des Fabacées dont la proportion se trouve restreinte (Navas *et al.* 1999 ; Lee & Lee 2000 ; Aydin & Uzun 2005). Ce fait résulte de trois phénomènes principaux : d'abord, la vitesse de croissance entre ces deux familles est différente, ceci en faveur des Poacées ; ensuite la présence d'un niveau élevé d'N dans le milieu, réduit la fixation de l'N atmosphérique (N<sub>2</sub> ; McAuliffe *et al.* 1958 ; Soussana & Arregui 1995), principale source d'N pour les Fabacées ; enfin, les Fabacées sont de faibles compétitrices pour la capture de l'N du sol (Walker *et al.* 1956). Au contraire, l'apport combiné d'engrais phosphaté favorise le développement voire la dominance des Fabacées au sein du couvert végétal et compense ainsi l'effet négatif de l'N en déréprimant ou en favorisant la fixation de l'N<sub>2</sub> (Baylor 1974 ; Aydin & Uzun 2005). Par ailleurs, Güsewell & Bollens (2003), travaillant sur des espèces de prairies hygrophiles, montrent que la diversité ne dépend pas seulement de la disponibilité relative de chacun des nutriments (N et P) mais aussi du niveau de fertilité global du sol.

Le soufre (S), lui aussi élément biogène essentiel, encore souvent négligé dans les programmes de fertilisation, peut jouer un rôle analogue dans la structuration des communautés végétales. Il est appelé “le partenaire silencieux” car en production végétale, l’agronome ou l’agriculteur s’est longtemps focalisé sur l’N, le P, et le K au moment de l’élaboration d’un programme de fertilisation et absolument pas sur le S. Avant les années 80, il était jugé non limitant dans les sols et d’importance plus secondaire pour le développement de la plante. Pourtant, le S est un constituant de base des protéines et est intégré dans de nombreux composés dits secondaires. D’autre part, le S est de plus en plus souvent limitant dans les écosystèmes agricoles (Schnug 1991). Des exportations croissantes de biomasse, aggravées par la diminution des pollutions soufrées (Murphy & Boggan 1988) ont conduit à des déficiences depuis quelques décennies. Donald *et al.* (1999) montrent alors que 2/3 des prairies échantillonnées en Ecosse sont carencées en S. De plus, le “Sulphur Institut” (Ceccotti & Messick 1997) prévoit, à travers le monde, un déficit annuel de 11 millions de tonnes de S à l’horizon 2010, correspondant aux exportations non compensées. Ainsi les écosystèmes prairiaux doivent ou devront dans un proche avenir faire face à un déficit important en S (Lamond *et al.* 1995).

Une déficience en S, provoque une diminution du rendement (Brown *et al.* 2000) et de la valeur fourragère des récoltes des prairies (Murphy & Quirke 1997) et peut également réduire l’abondance relative de certaines espèces naturelles ou cultivées, comme les Fabacées (Walker *et al.* 1956 ; Gilbert & Robson 1984a, b ; Sinclair *et al.* 1996a ; Morton *et al.* 1998). Habtemichial *et al.* (2007), ainsi que DeBoer & Duke (1982) expliquent cette régression des Fabacées (*Vicia faba* et *Medicago sativa*) en condition de carence en S par une altération de processus physiologiques impliqués dans la fixation biologique de l’N<sub>2</sub>. Si cette déficience n’est pas compensée, il est probable, qu’elle affectera à plus ou moins long terme la composition et la biodiversité des communautés végétales prairiales. Aujourd’hui, même si des carences en S sont diagnostiquées en prairies (Lamond *et al.* 1995 ; Donald *et al.* 1999), peu d’études ont envisagé la modification de la structure de communautés végétales pérennes fauchées, ainsi que les mécanismes impliqués dans la compétitivité des espèces en réponse à un double gradient de S et d’N disponibles dans le sol.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour objectif principal d’analyser l’évolution de la production et de la structuration de communautés végétales des prairies bas-normandes en fonction des ressources en S et N disponibles dans les sols, ceci à court terme. Mes travaux de recherche pourraient ainsi permettre de déterminer la dynamique potentielle

des prairies de fauche sur le long terme, selon des scénarii d'appauvrissement ou d'enrichissement des sols en S. Autrement dit, mon travail permettrait d'évaluer l'impact du statut soufré du sol sur la production globale, la diversité végétale et la diversité fonctionnelle (fixation de l' $N_2$ , efficacité d'utilisation de l' $N$ , etc.) des prairies, résultant des interactions spécifiques développées entre espèces.

Dans l'analyse bibliographique proposée en première partie, l'intérêt du S dans les prairies sera développé, en présentant son caractère indispensable au bon fonctionnement de la plante. Ensuite, l'analyse fera le point sur la nature des réserves bio-disponibles et le cycle global du S. Le S étant aujourd'hui de plus en plus limitant dans les écosystèmes terrestres, nous verrons ensuite comment ces carences sont apparues. Avant de présenter les conséquences de ces carences, les différentes fertilisations de compensation seront abordées. Enfin les données bibliographiques concernant la situation des écosystèmes prairiaux face à ce déficit en S seront développées et permettront de justifier et, en conclusion, de définir clairement les objectifs fixés de ce projet de thèse ainsi que le groupe d'hypothèses testées.

Cette analyse est suivie d'un "matériels & méthodes" faisant le point sur les dispositifs et modèles expérimentaux mis en place pour tester les hypothèses, puis de la présentation et de la discussion générale des résultats. Les résultats sont présentés sous la forme de publications scientifiques rédigées en anglais, et reportés en 4 chapitres. Des perspectives concernant ce projet sont ensuite proposées en fin de document.

***ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE***

# Plan de l'analyse bibliographique

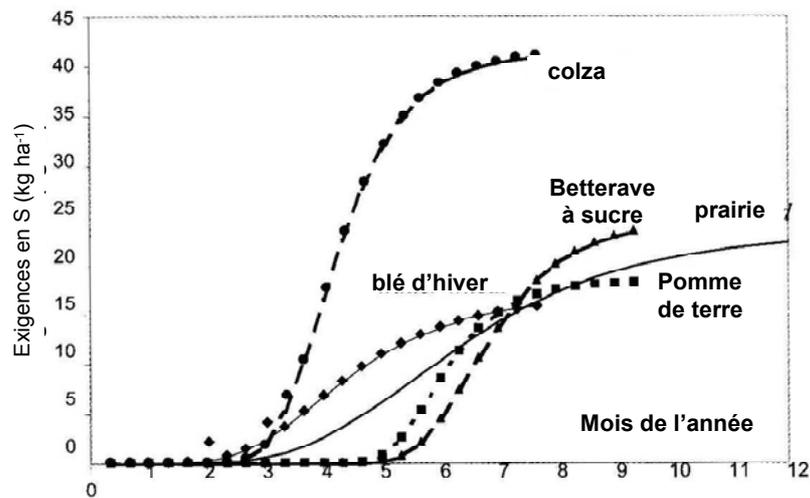
## **I. Le soufre, élément biogène**

- A. Rôle essentiel dans l'élaboration de la biomasse végétale
  - A.1 Cycle du soufre au sein de la plante*
  - A.2 Le soufre, constituant de base de la biomasse végétale*
    - A.2.1 Fonctionnement cellulaire, croissance et développement*
    - A.2.2 Nutrition azotée*
    - A.2.3 Photosynthèse*
    - A.2.4 Résistance des végétaux aux contraintes et aux perturbations*
- B. Réserves et dynamique du soufre dans les écosystèmes
  - B.1 Le soufre dans l'atmosphère*
  - B.2 Le soufre dans la pédosphère*
    - B.2.1 Formes minérales*
    - B.2.2 Formes organiques*
  - B.3 Processus de transformation du soufre dans le sol*
    - B.3.1 Processus d'immobilisation du soufre inorganique*
    - B.3.2 Processus de minéralisation des pools de soufre organique*
- C. Apparition des carences en soufre
  - C.1 Diminution des entrées soufrées*
    - C.1.1 Faibles retombées atmosphériques soufrées*
    - C.1.2 Utilisation de fertilisants à faible contenu soufré*
  - C.2 Augmentation des sorties soufrées*
    - C.2.1 Lixiviation du soufre*
    - C.2.2 Intensification des systèmes cultureux*
  - C.3 Bilan du soufre en France*

## **II. Prévention et conséquences des carences en soufre**

- A. Intérêt de la fertilisation soufrée
  - A.1 Principales formes de fertilisants soufrés*
  - A.2 Intérêts d'une fertilisation combinée*
- B. Conséquences des carences en soufre à l'échelle de la plante et de la parcelle
  - B.1 Impact sur le rendement et la qualité : exemple de grandes cultures*
  - B.2 Modification de la productivité et du fonctionnement des écosystèmes prairiaux*
    - B.2.1 Influence de la fertilisation soufrée sur la productivité des prairies*
    - B.2.3 Influence de la fertilisation soufrée sur la qualité des espèces prairiales et des produits dérivés*
    - B.2.3 Paramètres affectant les effets du soufre*
    - B.2.4 Influence de la fertilisation soufrée sur la composition spécifique*

## **III. Conclusion et objectifs du projet de thèse**



**Figure 1 :** Exigence en soufre de 5 grandes cultures des Pays Bas durant une année. La demande en soufre est différente selon l'espèce et la saison (d'après Postma *et al.* 1999).

**Tableau 1 :** Les 5 groupes de transporteurs de sulfate mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.* 2004 ; Abrol & Ahmad 2003).

	Localisation	Affinité pour le sulfate	Rôle
<b>Groupe 1</b>	Racinaire et foliaire (minoritaire)	haute ( $k_m = 1,5-10 \mu M$ )	Absorption racinaire du sulfate. Redistribution du sulfate des organes sources vers les organes puits. <i>AtSultr 1;1</i> est induit par la carence en S.
<b>Groupe 2</b>	racinaire et foliaire	moins haute que pour le groupe 1 sauf pour <i>AtSultr2;2</i> ( $k_m = 5 \mu M$ )	Chargement/déchargement du xylème dans les racines et les feuilles ( <i>AtSultr2;1</i> ) et chargement puis transport par le phloème dans les racines et feuilles ( <i>AtSultr2;2</i> ).
<b>Groupe 3</b>	foliaire	inconnue	inconnu
<b>Groupe 4</b>	racinaire et foliaire	inconnue	Rôle inconnu au niveau du chloroplaste. Efflux (et influx ?) du sulfate stocké dans la vacuole. <i>AtSultr 4;1</i> induit par la carence en S.
<b>Groupe 5</b>	inconnu	inconnue	inconnu

---

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### **I. Le soufre, élément biogène**

#### A. Rôle essentiel dans l'élaboration de la biomasse végétale

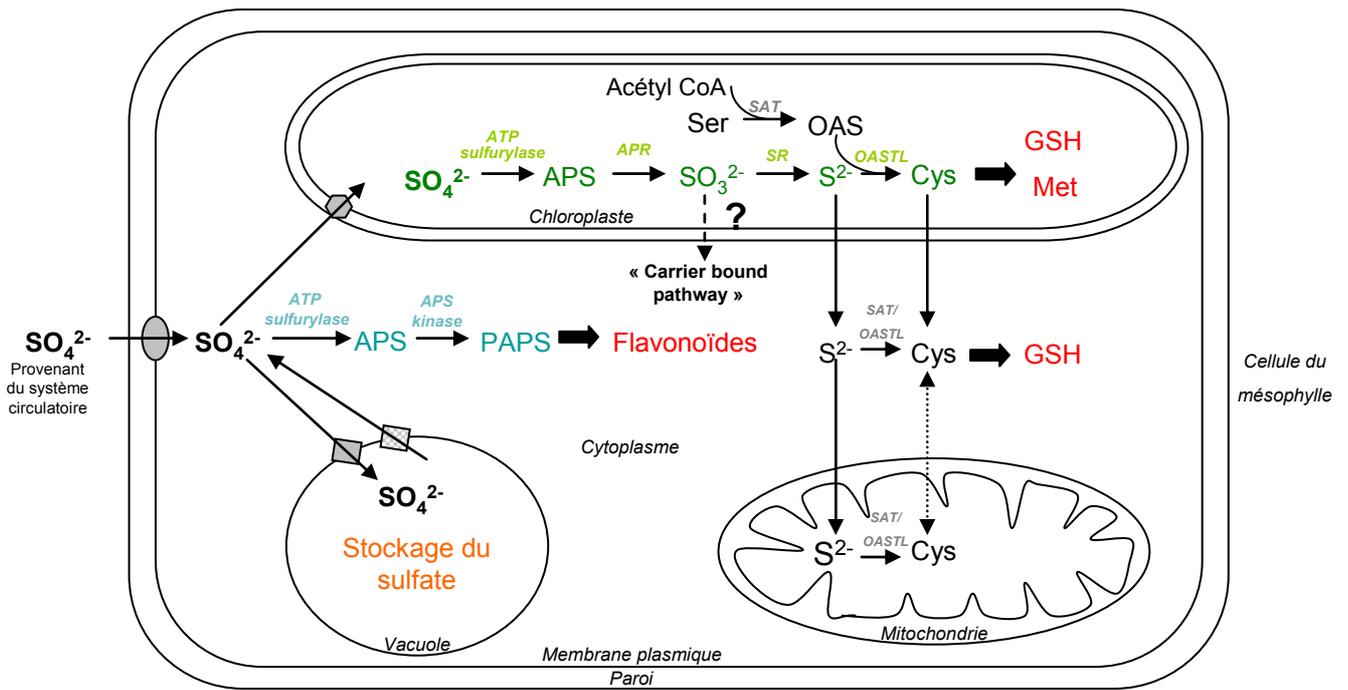
Les exigences en S dépendent principalement de l'espèce et de son stade de développement. Les exigences des prairies (environ 15 kg ha<sup>-1</sup> en juillet) sont inférieures à celles des cultures de colza (environ 40 kg ha<sup>-1</sup> en juillet ; **Figure 1**) mais sont aussi importantes que celles de blé, de betterave ou de pomme de terre (environ 15 kg ha<sup>-1</sup> pour les trois en juillet). En général, les demandes en S des Brassicacées et des Liliacées, mais aussi dans une moindre mesure celle des Fabacées et de certaines Poacées, sont considérées comme les plus élevées. Quelle que soit l'importance de ces besoins, le S est un élément indispensable car il est un constituant de base de la biomasse. Avant de discuter le rôle du S chez la plante, il est important d'aborder les mécanismes de son absorption et de son assimilation car, nous le verrons, ils sont en lien étroit avec ceux de l'N.

##### *A.1 Cycle du soufre au sein de la plante*

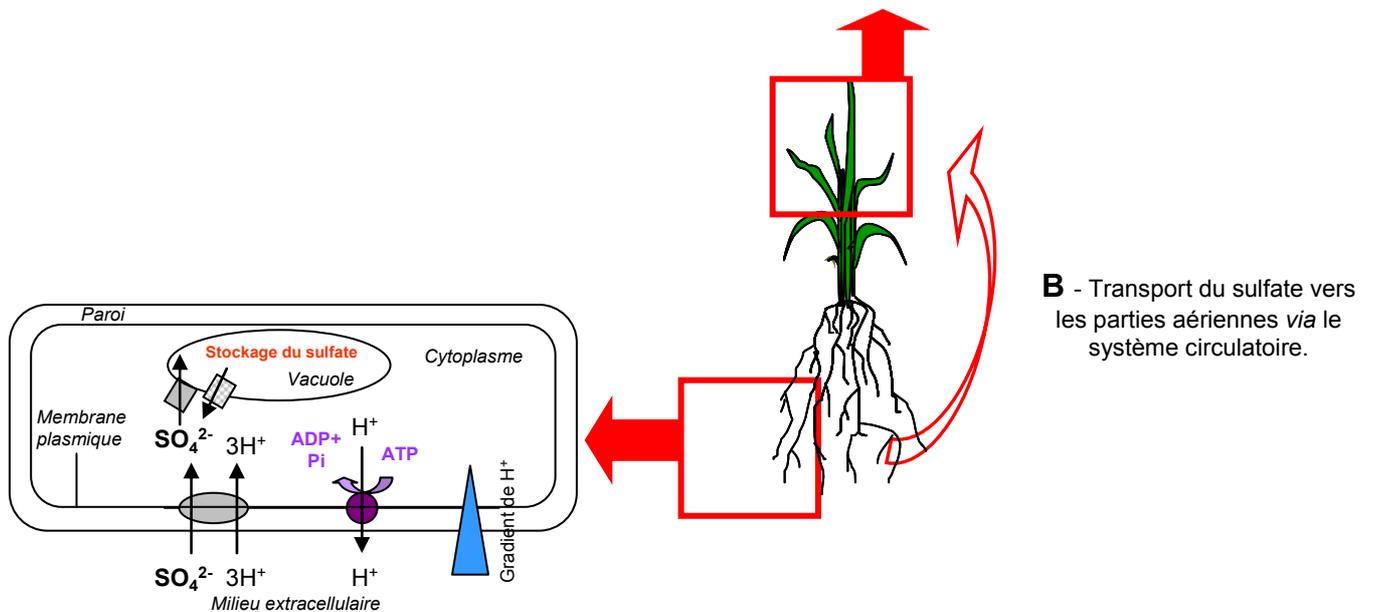
##### *A.1.2. Absorption du soufre*

Il existe plusieurs formes de S, que nous préciserons plus loin dans l'analyse. Dans le sol, la plante l'absorbe sous forme de sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Cette absorption racinaire constitue la voie majeure d'absorption. Les plantes sont également capables d'absorber passivement le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) et le diméthylsulfure (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>) atmosphériques par voie foliaire, mais cette fraction ne contribue que très peu à la nutrition soufrée, même si elle n'est quantitativement pas négligeable dans les régions industrielles fortement polluées (Leustek & Saito 1999).

Dans les racines, l'absorption du sulfate nécessite un transport actif (Leustek & Saito 1999) faisant intervenir un symport (3 H<sup>+</sup> pour 1 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Il dépend donc d'une pompe à protons afin de maintenir le gradient de protons. Les systèmes de transport mis en jeu sont codés par une même famille de gènes répartis en 5 groupes (**Tableau 1**). Des représentants de



C - Voies d'assimilation réductrice et non réductrice dans les feuilles.



B - Transport du sulfate vers les parties aériennes via le système circulatoire.

A - Absorption racinaire du soufre sous forme de sulfate

**Figure 2** : Absorption (A), transport (B) et voies d'assimilation réductrice/non réductrice (C) du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dans la cellule végétale. Les voies d'assimilation réductrice et non réductrice sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les enzymes sont indiquées en italique dans la couleur correspondante. Les molécules produites sont présentées en rouge. Par ordre alphabétique, les molécules impliquées dans l'assimilation du  $\text{SO}_4^{2-}$  sont : **Acétyl CoA** : Acétyl Co-enzyme A, **APR** : Adénosine 5'-phosphosulfate réductase, **APS** : Adénosine 5'-phosphosulfate, **Cys** : cystéine, **GSH** : glutathion sous forme réduite, **Met** : méthionine, **OAS** : O-acétylsérine, **OASTL** : O-acétylsérine thiol-lyase, **PAPS** : 3'-phospho-5'-adénylylsulfate, **S<sup>2-</sup>** : sulfide, **SAT** : S-acétyl-transférase, **SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>** : sulfite, **SR** : sulfite réductase (d'après Leustek & Saito 1999 ; De Kok *et al.* 2005).

chacun de ces groupes ont été caractérisés dans différents organes chez *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.* 2004 ; **Tableau 1**). Le sulfate est, soit stocké dans les vacuoles au niveau des racines, soit transporté *via* le xylème vers les feuilles où il est alors assimilé ou bien également stocké dans les vacuoles (**Figure 2**).

### ***A.1.2 Assimilation du soufre***

L'assimilation du sulfate peut se faire selon deux voies (**Figure 2**) : la voie d'assimilation non réductrice cytosolique ou la voie d'assimilation réductrice plastidiale. Après des années de controverse, plusieurs auteurs montrent que la voie majeure d'intégration du S est l'assimilation réductrice conduite dans les chloroplastes et/ou en partie dans les mitochondries (Suter *et al.* 2000 ; Weber *et al.* 2000 ; Kopriva & Koprivova 2004). La première voie conduit à la synthèse de 3'-phospho-5'-adénylsulfate (PAPS), précurseur de la synthèse des flavonoïdes (De Kok *et al.* 2005). Dans la seconde voie, le sulfate, composé inerte, nécessite une activation avant d'être métabolisé. Cette activation se fait par la formation d'adénosine-5'-phosphosulfate (APS), composé dans lequel, le sulfate est relié au phosphate par un pont anhydride. Cette réaction est catalysée par l'ATP sulfurylase et représente le point d'entrée pour le métabolisme du sulfate. La cystéine constitue le produit final de la voie d'assimilation réductrice du sulfate. Cet acide aminé agit comme un précurseur pour la synthèse de tous les composés issus des métabolismes primaire et secondaire.

### ***A.1.3 Régulation de l'acquisition du soufre par le glutathion***

Le glutathion, tripeptide composé de glycine, glutamate et cystéine et forme réduite du S, constitue une des formes de transport du S ainsi qu'un signal phloémique impliqué dans la régulation de l'activité ATP sulfurylase et de l'influx de sulfate dans les racines (Lappartient *et al.* 1999). Lappartient & Touraine (1996) ont montré que l'effet inhibiteur du glutathion sur ces activités, quand la demande en S est satisfaite, s'accompagne d'une diminution de la quantité de protéine ATP sulfurylase et des quantités d'ARNm de l'ATP sulfurylase et du transporteur de sulfate dans les racines.



## *A.2 Le soufre, constituant de base de la biomasse végétale*

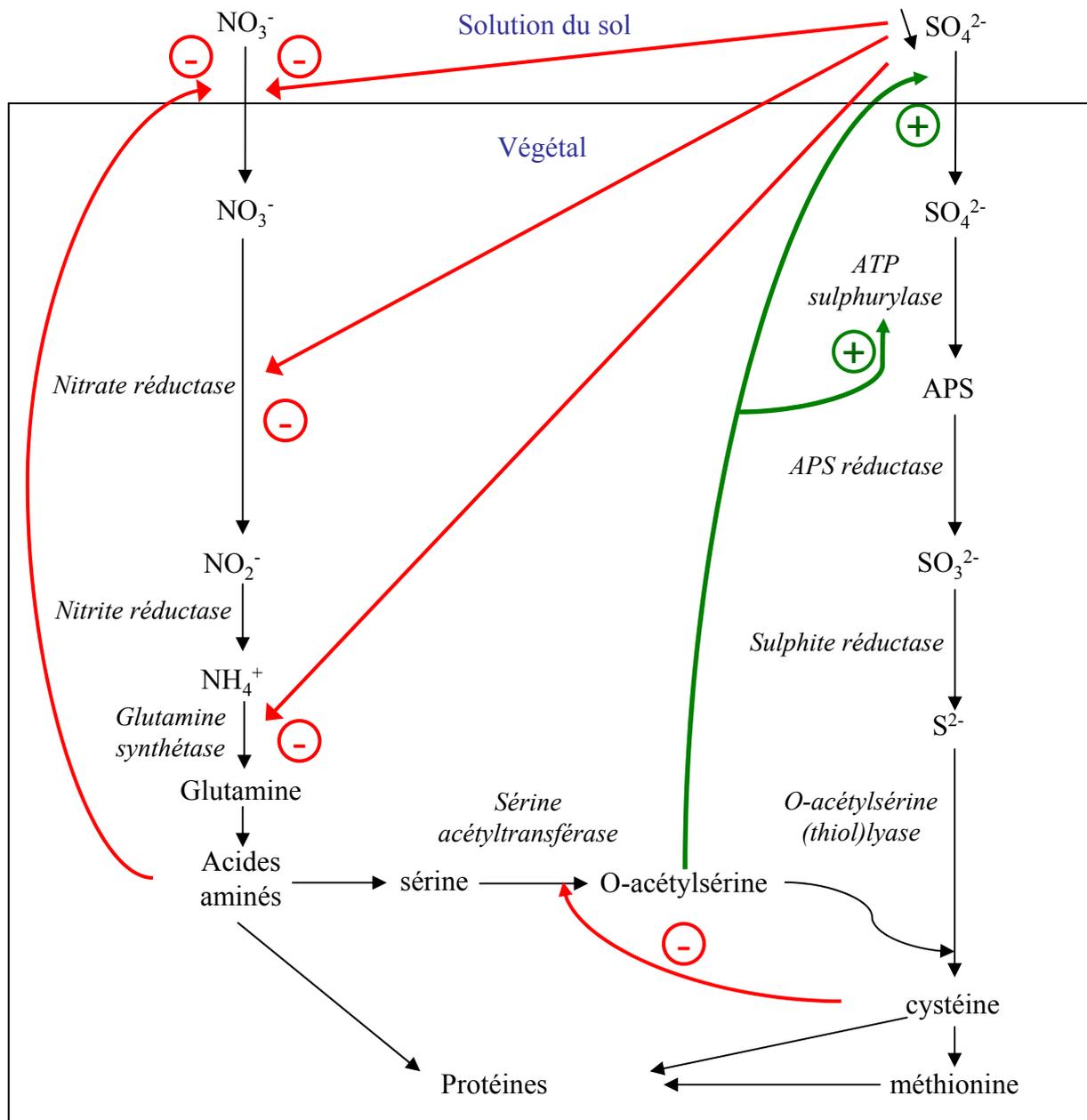
Quelle que soit la voie d'assimilation, le S est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales. Les différents produits du métabolisme soufré (cystéine, méthionine, glutathion, glucosinolates...) permettent à la plante d'assurer ces fonctions (**Figure 3**).

### *A.2.1 Fonctionnement cellulaire, croissance et développement*

Le sulfate lui-même joue un rôle d'osmoticum au sein de la cellule en assurant le maintien du pH cytoplasmique. D'autre part, la liaison de deux molécules de cystéine par un pont disulfure forme la cystine. Cette réaction libère des protons qui sont impliqués dans le contrôle du potentiel d'oxydoréduction de la cellule. De multiples composés soufrés possédant un groupement thiol sont également impliqués dans ce contrôle : la thiorédoxine, la glutarédoxine, la disulfure isomérase, ou bien le glutathion, molécule anti-oxydante aux multiples fonctions.

L'assimilation du sulfate conduit à la formation d'acides aminés essentiels (cystéine, méthionine, homocystéine) nécessaires à la synthèse des protéines. En moyenne, les protéines sont ainsi constituées d'un atome de S pour 36 atomes d'N. La structure tertiaire de celles-ci est elle-même modelée par l'établissement de liaisons disulfures grâce à la présence de ces acides aminés, par oxydation des groupements thiols. Le S, au travers de ce rôle dans leur conformation, est à l'origine de l'activité catalytique des enzymes (Giles *et al.* 2003 in Droux 2004). Pour ces raisons, lors de l'établissement de nouveaux tissus ou de la croissance, la mise à disposition de S est indispensable. En phase végétative, l'origine de ce S est essentiellement exogène et provient pour l'essentiel du sol. En phase de reproduction, il peut être issu chez certaines espèces, d'une réallocation interne (Anderson & Fitzgerald 2003), dans la mesure où suffisamment de S est remobilisable.

La cystéine et la méthionine sont également des précurseurs de nombreuses autres molécules indispensables au fonctionnement de la cellule végétale et à la croissance de la plante : vitamines (vitamine A, vitamine B1 ou thiamine impliquée dans le métabolisme des lipides, vitamine B8 ou biotine, ...), cofacteurs (groupement FE-S, hème, ...), acétyl coenzyme A, S-adenosylméthionine (SAM). L'acétyl co-enzyme A régit l'orientation des substrats assimilés soit vers la lipidogénèse, soit vers la protéogénèse (Merrien *et al.* 1989). Le SAM est un donneur de méthyl, indispensable aux modifications de l'ARN et de l'ADN et



**Figure 4 :** Représentation schématique des interactions et régulations entre l'assimilation de l'azote et celle du soufre chez les plantes supérieures **en conditions de carence en soufre** ( $\downarrow\text{SO}_4^{2-}$ ) ; les flèches rouges indiquent la répression des étapes métaboliques et les flèches vertes marquent l'induction des processus (d'après Smith *et al.* 1997 ; Kopriva & Rennenberg 2004).

à la synthèse de composant structuraux de la cellule végétale et de la plante tels que les précurseurs de la lignine et de la chitine (Noji & Saito 2003).

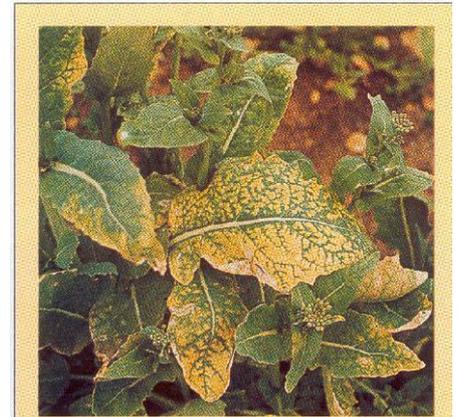
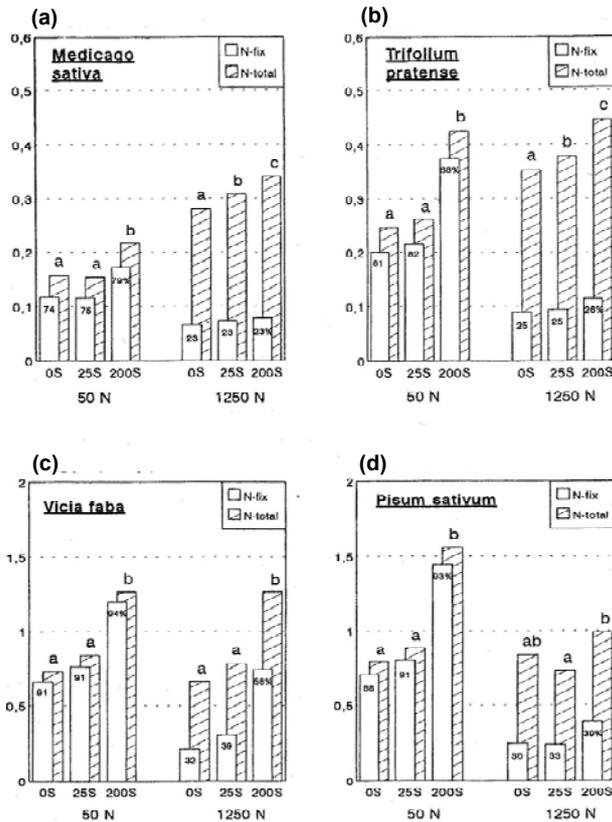
D'autre part, les effets bénéfiques du S sur la production de biomasse ont été montrés chez de nombreuses espèces (Scherer 2001). Le S joue également un rôle sur le développement de la plante. Par exemple, McGrath & Zhao (1996) ont montré qu'une nutrition soufrée suffisante assure la mise en place des siliques chez le colza. Si elle ne l'est pas, les fleurs tendent à avorter.

### ***A.2.2 Nutrition azotée***

En plus de son rôle constitutif, la disponibilité du S module celle d'autres éléments et notamment celle de l'N. Les métabolismes azoté et soufré sont fortement interdépendants. Les plantes maintiendraient un ratio N : S organiques relativement constant. Dans la plupart des espèces végétales et dans leurs différents tissus, ce ratio est habituellement de 15 : 1 (Pasricha & Fox 1993), reflétant la proportion de ces éléments dans les protéines.

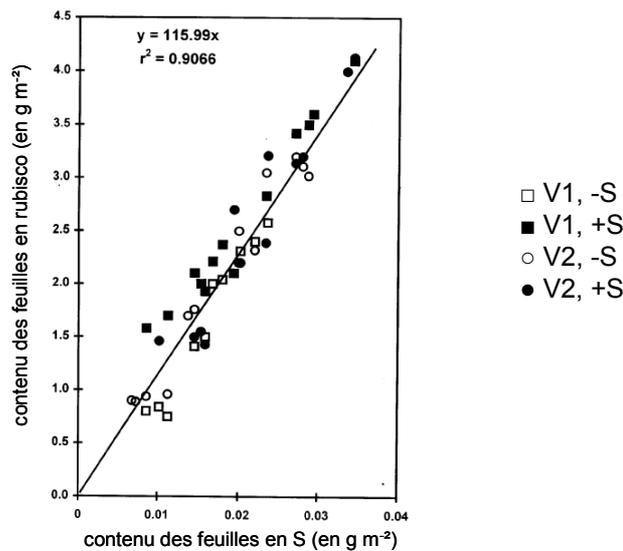
#### ***(a) Absorption et assimilation du nitrate par les racines***

Plusieurs études ont montré l'existence d'interactions entre l'assimilation réductrice du sulfate et celle du nitrate (Koprivova *et al.* 2000 ; Prosser *et al.* 2001). Ces deux voies d'assimilation s'organisent de façon similaire et sont coordonnées (**Figure 4**). Une déficience en un élément réprime la voie d'assimilation de l'autre qui s'accumule alors (Barney & Bush 1985). Une déficience en S engendre une inhibition de l'absorption du nitrate et une répression de l'activité de certaines enzymes clés de l'assimilation du nitrate, notamment la nitrate réductase (Kopriva & Rennenberg 2004). Elle induit également une accumulation d'acides aminés pouvant être à l'origine de la rétro-inhibition de l'absorption du nitrate, due à une diminution de la disponibilité en acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) nécessaires à la synthèse des protéines (Neueschwander *et al.* 1991). La cystéine, produit final de l'assimilation du sulfate apparaît comme le point de rencontre entre les métabolismes N et S. Une diminution de la teneur en cette molécule, due à une déficience en S, a des répercussions sur les deux voies métaboliques. De plus, l'O-acétylsérine (OAS), produit de la voie d'assimilation du nitrate et précurseur nécessaire à la synthèse de la cystéine (**Figure 4**), exercerait un contrôle positif sur l'absorption et l'assimilation du sulfate en cas de déficiences en S (Clarkson *et al.* 1989 ; Smith *et al.* 1997).

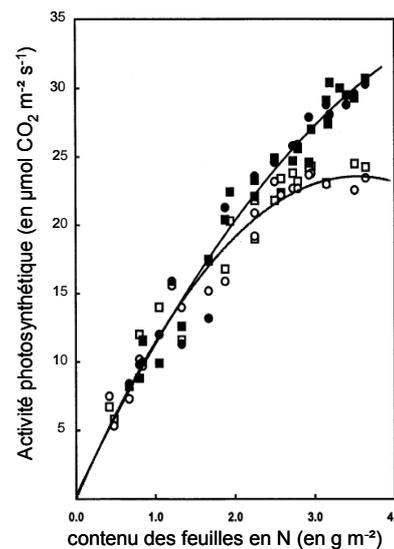


**Figure 5 :** Effet de différents niveaux de fertilisation azotée et soufrée (en mg pot<sup>-1</sup>), sur l'accumulation d'N ( N total en g pot<sup>-1</sup>) et la proportion de N<sub>2</sub> fixé (en %) à la 1<sup>ère</sup> fauche (57 jours) de 4 espèces en monoculture : (a), *Medicago sativa* ; (b), *Trifolium pratense* ; (c), *Vicia faba* ; (d), *Pisum sativum* (des moyennes présentant des lettres similaires ne sont significativement pas différentes ; d'après Scherer & Lange 1996).

**Figure 6 :** Décoloration caractéristique des feuilles de colza soumis à une carence en soufre (d'après Merrien *et al.* 1989).



**Figure 7 :** Contenu en rubisco en fonction du contenu en S dans les feuilles de *Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan (V1) et *Brassica juncea* cv. Pusa Gold (V2) fertilisées au S (symboles noirs) et non fertilisées au S (symboles blancs ; d'après Ahmad & Abdin 2000a).



**Figure 8 :** Activité photosynthétique en fonction du contenu en N des feuilles de *Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan (V1) et *Brassica juncea* cv. Pusa Gold (V2) fertilisées au S (symboles noirs) et non fertilisées au S (symboles blancs ; d'après Ahmad & Abdin 2000a).

*(b) Fixation de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>)*

Diverses études suggèrent un lien entre la nutrition soufrée des Fabacées et la fixation de l'N<sub>2</sub> (Scherer 2001). Tout d'abord Aulakh *et al.* (1976) ont observé chez *Medicago sativa* L. qu'une déficience en S induit une accumulation d'acides aminés et d'autres formes azotées, résultant d'une synthèse protéique plus faible, et peut avoir un effet répressif sur la fixation de l'N<sub>2</sub>. Scherer & Lange (1996), ayant étudié plusieurs modèles biologiques (*Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Pisum sativum* et *Vicia faba minor*) confirment que la nutrition soufrée module la fixation de l'N<sub>2</sub> par les microorganismes *Rhizobium* : elle augmente non seulement la proportion d'N issu de la fixation de l'N<sub>2</sub> mais aussi la quantité totale d'N présent dans les parties aériennes (**Figure 5**). Par exemple, pour un niveau moyen d'N (50 mg d'N par pot ; **Figure 5**), un apport élevé de S (200 mg de S par pot) augmente la quantité totale d'N d'environ 50%, *Medicago sativa* présentant la plus faible amplitude de réponse. Ils expliquent cet effet positif du S par une stimulation de la nodulation (nombre et masse des nodules) et de l'activité spécifique de la Nitrogénase. Habtemichael *et al.* (2007) ont fait le même constat dans une étude au champ sur la Fabacée *Viscia faba* L..

**A.2.3 Photosynthèse**

La méthionine est l'acide aminé soufré précurseur de la molécule S-adénylméthionine (SAM) intervenant dans la voie de synthèse des chlorophylles, sans laquelle un jaunissement des feuilles apparaîtrait, ceci conduisant à une diminution de l'activité photosynthétique (**Figure 6**). La nutrition soufrée, améliorant l'absorption du nitrate, joue aussi un rôle primordial dans son utilisation pour le processus de photosynthèse. Le S agit directement sur ce processus en stimulant l'utilisation du nitrate absorbé vers la synthèse d'une protéine majeure, la RubisCO (Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase). Cette protéine est une enzyme contenue dans les chloroplastes des cellules végétales. Elle intervient majoritairement dans la fixation du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), jouant ainsi un rôle crucial dans l'activité photosynthétique. Le S faisant partie intégrante de la structure de la grande sous-unité de cette enzyme, Ahmad & Abdin (2000a) ont montré une corrélation positive entre la teneur en S des feuilles et celle de la RubisCO (**Figure 7**). Ils ont également montré que la relation entre le contenu azoté des feuilles et le taux de photosynthèse est quasiment linéaire en condition non limitante de S, et qu'elle ne l'est pas en condition

**Tableau 2** : Effet de la fertilisation soufrée sur la teneur en sélénium des végétaux des prairies pâturées. \*, \*\*, \*\*\* correspondent respectivement aux seuils de signification de 5%, 1%, 1‰ (d'après Murphy & Quirke 1997).

Année	Traitement	Sélénium en mg kg <sup>-1</sup> de matière sèche
1982	Sans S	0,22
	Avec S	0,12
	<i>Signification</i>	**
1983	Sans S	0,17
	Avec S	0,04
	<i>Signification</i>	**
1984	Sans S	0,20
	Avec S	0,14
	<i>Signification</i>	*
moyenne	Sans S	0,20
	Avec S	0,10
	<i>Signification</i>	**

limitante (**Figure 8**). Par conséquent, un apport adéquat de S favorise la synthèse de la RubisCO, entraînant ainsi une activité photosynthétique plus élevée.

#### ***A.2.4 Résistance des végétaux aux contraintes et aux perturbations***

##### *(a) Rôle indirect des composés soufrés dans la détoxification*

Les micro-minéraux (oligoéléments ou métaux lourds), s'ils sont présents à fortes concentrations, sont considérés phytotoxiques (Chiy *et al.* 1999). Le S a un impact positif sur le contenu des végétaux en micro-minéraux en réduisant le prélèvement de ces éléments par les espèces prairiales (Chiy *et al.* 1999). Par exemple, les teneurs en molybdène, bore, chrome, et nickel sont réduites par une disponibilité en S élevée (*ie* fertilisation). Dans le sol, le S est capable de former avec le nickel un complexe facilement lessivable. En présence de S, le prélèvement des composés soufrés sodiques est quant à lui favorisé au détriment des composés sodium - bore. Enfin les prélèvements du molybdène et du chrome sont réduits par la compétition avec le sulfate au niveau de l'absorption racinaire (Chiy *et al.* 1999).

Murphy & Quirke (1997) ont également observé que l'apport de S dans le sol réduit le prélèvement du sélénium (Se) en faveur de celui du S. Bien que le Se soit nécessaire en tant qu'antioxydant des plantes supérieures (Cartes *et al.* 2006), en trop grande concentration, il peut être toxique (Anderson 1993). Le Se, facilement métabolisé et non spécifiquement, peut accéder aux différentes voies d'assimilation du sulfate, causant par conséquent la perte de l'activité biologique des molécules produites (Anderson 1993). Ainsi plus la disponibilité en S du sol est forte, moins la production d'isologues séléniés est importante (**Tableau 2**; Murphy & Quirke 1997).

##### *(b) Rôle direct des composés soufrés dans la détoxification et la fonction anti-phytophages*

Le S permet également la synthèse de Sulfur-containing Defence Compounds (SDC ; Rausch & Wachter 2005) comme le glutathion ou les glucosinolates. Ce sont des composés soufrés possédant un groupement thiol, qui interviennent dans la protection des plantes contre les stress oxydatifs et environnementaux.

Le **glutathion**, notamment, intervient dans la détoxification enzymatique (*via* la glutathion peroxidase) des formes actives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species). Il agit également comme protecteur contre les stress oxydatifs (températures excessives,

**Tableau 3** : Principaux réservoirs du soufre  
(d'après Schlesinger 1997).

<b>Réservoir</b>	<b>Stock de S, 10<sup>15</sup> g S</b>
Roches océaniques	2400.10 <sup>3</sup>
Roches sédimentaires	
Evaporites	5100.10 <sup>3</sup>
autres	2700.10 <sup>3</sup>
Océans/mers	1280.10 <sup>3</sup>
Atmosphère	4.10 <sup>3</sup>
Eau douce/glace	9
Matière organique morte du sol	5
Plantes	0,6

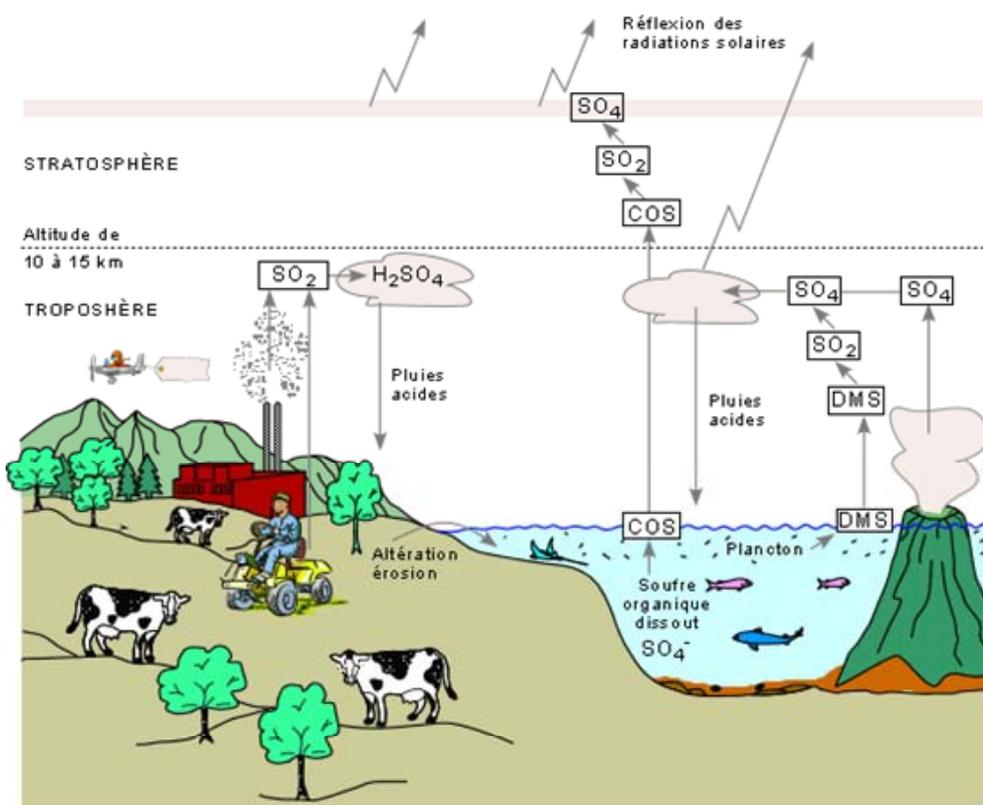
déficience minérale, sécheresse, polluants, etc. ; Leustek & Saito 1999), comme précurseur des phytochélatines, impliquées dans la détoxification des métaux lourds (Leustek & Saito 1999), ou encore dans la détoxification et le métabolisme de xénobiotiques (Rauch & Wachter 2005).

Les **glucosinolates** sont des composés secondaires soufrés que l'on retrouve principalement dans la famille des Brassicacées. Ces composés sont également impliqués dans la résistance des végétaux aux stress et aux perturbations : maladies, parasites et insectes (Schnug 1993, Saik 1995). En effet, quand la paroi végétale est rompue, l'hydrolyse des glucosinolates par la myrosinase, libère alors des molécules aux propriétés antibactériennes et antifongiques (isothiocyanates), qui peuvent aussi repousser les insectes (Giamoustaris & Mithen 1995). Leur teneur est en lien étroit avec la nutrition soufrée, chaque molécule de glucosinolate contenant deux ou trois atomes de S (Scherer 2001).

Il existe un autre groupe de composés soufrés impliqué dans la protection des plantes contre les herbivores. Ce sont les sulfates d'allyle caractéristiques des plantes à bulbe de la famille des Liliacées, comme l'oignon. La production de ces huiles végétales volatiles dégage des vapeurs à l'odeur très forte. Les propriétés répulsives et antiseptiques de ces vapeurs sont une bonne protection naturelle pour la plante (Hell & Kruse 2007).

## B. Réserves et dynamique du soufre dans les écosystèmes

À l'origine de la Terre, le S était contenu dans les roches ignées, principalement dans la pyrite ( $\text{FeS}_2$ ). Le dégazage de la croûte terrestre et son altération en conditions aérobies ont transféré aux océans une grande quantité de S sous la forme de sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Différents autres composés soufrés dérivent du sulfate. Ce sont des composés minéraux issus de réactions chimiques et organiques issus de l'activité biologique au sein des sols et/ou de l'assimilation du sulfate (principale forme assimilée) par les organismes. Les composés soufrés intervenant dans les cycles bio-géo-chimiques sont multiples et retrouvés aussi bien sous forme gazeuse, solide, que liquide. Les principaux réservoirs du S sont qualifiés et quantifiés dans le **Tableau 3**.



**Figure 9 :** Cycle global du soufre à l'échelle de la biosphère (d'après Bourque 2004).

### B.1 Le soufre dans l'atmosphère

Dans l'atmosphère, le S est trouvé sous 5 formes principales (**Figure 9**) :

- le diméthylsulfure (DMS ;  $\text{CH}_3\text{SCH}_3$ ) et le carbonyl de soufre (COS), principales formes de S réduit,
- le dioxyde de S ( $\text{SO}_2$ ), forme oxydée gazeuse,
- les sulfates en aérosols ( $\text{SO}_4$ ), forme oxydée solubilisée,
- le sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ), forme réduite gazeuse.

Le DMS est un produit naturel issu de la décomposition des cellules du phytoplancton dans la couche supérieure de l'océan. Il s'échappe dans l'atmosphère pour former moins de 1% de la totalité des gaz atmosphériques (Zemmelink 2003). En quelques jours, il est oxydé en  $\text{SO}_2$ , puis en  $\text{SO}_4^{2-}$  qui condense en minuscules particules. Celles-ci agissent comme noyaux pour la formation de gouttes de pluie et de nuages. Ces nuages peuvent contribuer à des précipitations acides causées par la réaction des aérosols avec la vapeur d'eau et les radiations solaires. Le COS est produit à partir des sulfures organiques (en partie issus de l'érosion continentale) dissous dans l'eau de mer. Le COS s'échappe de la surface des océans vers l'atmosphère et s'oxyde en  $\text{SO}_4^{2-}$  dans la stratosphère.

Les gaz biogéniques des sols anaérobies et des marécages contiennent aussi du  $\text{H}_2\text{S}$ , ainsi que du DMS et du COS en faible quantité ; ils sont libérés dans l'atmosphère. Du  $\text{H}_2\text{S}$  et du COS, principalement, peuvent être rejetés dans l'atmosphère par les végétaux, au niveau des feuilles. Ce rejet est dû à une réponse de l'organisme face à la pollution (Schröder 1993).

Les sources naturelles de  $\text{SO}_2$  incluent les émanations des volcans (éruptions), des océans, des décompositions biologiques et des feux de forêt. Sous l'effet des radiations solaires, ce  $\text{SO}_2$  se combine avec la vapeur d'eau et les radicaux libres OH pour former de minuscules gouttes d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Ce processus est en partie responsable des pluies acides. Mais la plus grande contribution de ces composés vient de la combustion des pétroles et des charbons qui contiennent pratiquement toujours du S.

A l'échelle de la biosphère, la contribution des écosystèmes marins et terrestres, au S atmosphérique est du même ordre que celle due à l'homme. Cependant de profondes disparités régionales existent en fonction des distances à la mer (Ledgard & Upsdell 1991), des distances aux sites industriels, de l'exposition aux courants aériens (Liu & Brakenhielm 1996) et des saisons (Mac Cardle *et al.* 1995).

## *B.2 Le soufre dans la pédosphère*

Au sein des écosystèmes terrestres, la teneur en S total du sol se situe généralement entre 0.02 et 0.2% jusqu'à 1 % pour certains sols tourbeux (Friend 1973).

### **B.2.1 Formes minérales**

Les composés minéraux soufrés représentent une part minime du S présent dans le sol, généralement moins de 5 % dans la plupart des terres agricoles (Bohn *et al.* 1986). Ils existent sous plusieurs formes dont la plus commune est le sulfate. Selon son état de valence, il peut être classé en 3 groupes :

- sulfate solide,
- sulfate adsorbé,
- sulfate soluble.

Le **sulfate solide** est essentiellement présent dans les sédiments et les roches sédimentaires, sous forme d'évaporites (gypse ( $\text{CaSO}_4$ ) et anhydrite ( $\text{CaSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ ). Le transfert de ces composés, de la roche au sol, résulte de leur altération sous l'influence de divers processus physiques, chimiques et biologiques.

Le **sulfate adsorbé** est retenu par des minéraux insolubles à forte charge positive : ce sont notamment des hydroxydes d'aluminium et de fer (Duchaufour 1997). L'adsorption du sulfate est un phénomène dépendant du pH de la solution du sol : elle est très forte à faible pH et peu importante à pH élevé (Curtin & Syers 1990 ; Hu *et al.* 2005). Le sulfate adsorbé n'est pas une fraction du sol aisément disponible pour la plante. Différents traitements peuvent cependant diminuer cette rétention et donc augmenter la disponibilité du sulfate. Ce sont notamment l'addition d'hydroxyde de calcium ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), qui a pour effet d'augmenter le pH (Mehlich 1964), l'addition de phosphate (Tisdale *et al.* 1985), qui prend la place du sulfate au niveau des hydroxydes, et l'addition de matière organique qui bloque les sites d'adsorption du sulfate (Scherer 2001).

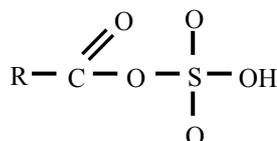
**En solution**, le sulfate peut être associé au calcium, au magnésium, au potassium, au sodium, à l'ammonium, à l'hydrogène ou à l'aluminium, cela en fonction de leur disponibilité et du pH du système.

### B.2.2 Formes organiques

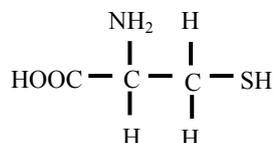
La majorité du S est présente sous forme de composés organiques soufrés (Freney & Stevenson 1966), associés à la matière organique et/ou à la biomasse microbienne du sol. La teneur en S organique suit généralement celle de la matière organique et diminue donc en profondeur dans le sol.

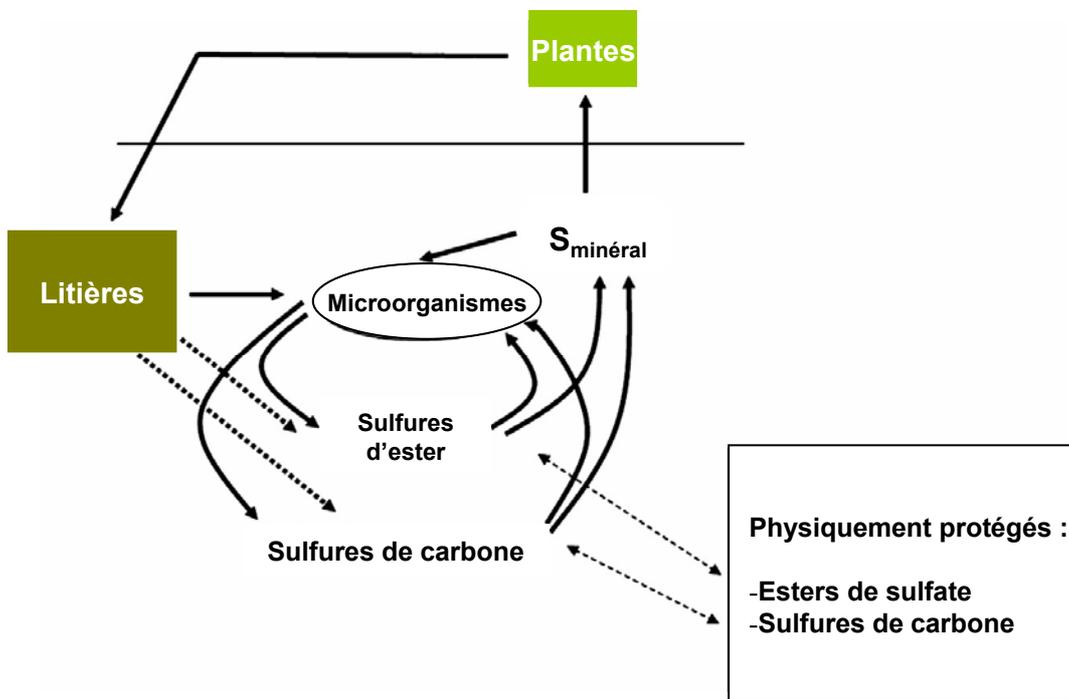
Le S organique du sol est divisé en deux groupes principaux, différenciés par leurs propriétés chimiques (Fitzgerald 1976).

- Dans le premier groupe, l'atome de S est à l'état oxydé et n'est pas directement lié au carbone. Ces composés sont nommés "**HI réductible S**" (Landers *et al.* 1983) : ils présentent la particularité d'être réduits en H<sub>2</sub>S par l'acide hydriodique. Ils forment 30 à 70 % du S organique (Tabatabai & Bremmer 1972). Ce groupe est constitué principalement d'ester de sulfates (C-O-SO<sub>3</sub>) dont la teneur relative augmente avec la profondeur du sol. Après le sulfate soluble et le sulfate adsorbé, les esters de sulfate représentent une large fraction du S disponible dans le sol.



- Dans le deuxième groupe, l'atome de S est à l'état réduit et directement conjugué au carbone sous forme d'acides aminés libres ou combinés à la biomasse microbienne. Ce sont les **sulfures de carbone** (C-S). La quantité de sulfures de carbone est corrélée à la biomasse microbienne présente. Ils sont considérés comme une forme constituante de cette biomasse ou comme un produit de son activité.





**Figure 10 :** Cycle du Soufre dans le système plante-sol-microorganisme (d'après Kertesz & Mirleau 2004).

### B.3 Processus de transformation du soufre dans le sol

Les différents pools de S dans le sol sont soumis à une dynamique très importante (**Figure 10**). Minéralisation et immobilisation des formes organiques et inorganiques du S coexistent de manière concurrentielle et selon un cycle (Ghani *et al.* 1993a ; Eriksen 1997a ; Kertesz & Mirleau 2004). L'incorporation ou la libération du S dans le sol est donc le résultat net de plusieurs processus.

#### B.3.1 Processus d'immobilisation du soufre inorganique

L'utilisation d'engrais minéraux soufré marqué au  $^{35}\text{S}$  a permis l'étude plus approfondie des processus d'immobilisation du S en mesurant son taux d'incorporation dans les différents pools du sol. Freney *et al.* (1975) mesurent dans une expérimentation en mésocosme, pour une culture de 8 semaines de *Sorghum vulgare*, une incorporation de 35 à 44% du  $^{35}\text{S}$  minéral, apporté sous forme de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), dans le pool organique. Cette expérimentation et d'autres montrent que le  $^{35}\text{S}$  est rapidement incorporé dans le groupe des esters de sulfate (HI-réductible sulphur) et plus lentement dans le groupe des sulfures de carbone (Ghani *et al.* 1993b).

L'immobilisation du  $^{35}\text{S}$  minéral appliqué dans la matière organique, et notamment dans les sulfures de carbone, dépend largement des caractéristiques du sol au moment de son application. Elles comprennent principalement les statuts azotés et carbonés du sol et son humidité qui conditionnent l'activité microbienne. Un sol humide favorise l'immobilisation du S minéral en sulfures de carbone, ceci en raison d'une stimulation de la croissance de la biomasse microbienne (Ghani *et al.* 1993b). Un sol sec mène alors son incorporation plutôt vers les esters de sulfate. L'addition de glucose ou bien d'acides organiques (malate, succinate) engendre, en 20 jours, jusqu'à 70% d'incorporation du  $^{35}\text{S}$  minéral appliqué vers les sulfures de carbone (Ghani *et al.* 1993b ; Vong *et al.* 2003). De même, Eriksen (1997b) a mis en évidence que la présence de cellulose dans le sol entraîne une immobilisation du S jusqu'à 40-50% contre seulement 10-20 % en son absence. Curtin *et al.* (2007) ont aussi conclu à une influence du statut azoté du sol en montrant que l'application de nitrate d'ammonium, associé au glucose favorise l'immobilisation du  $^{35}\text{S}$  minéral appliqué vers les sulfures de carbone.

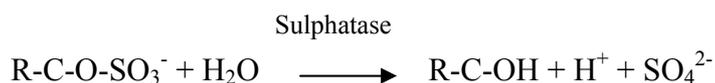
La stimulation de la croissance microbienne observée dans ces systèmes expérimentaux est comparable à celle observée au niveau de la rhizosphère *in situ* du fait de la

libération d'acides organiques ou sucres dans les exsudats racinaires (Bertin *et al.* 2003). La matière sèche microbienne contient environ 40 % de carbone total pour 1% de S total. Ainsi l'approvisionnement en carbone stimule la croissance microbienne mais élève également son exigence en S. Dans ces conditions d'enrichissement en carbone, la biomasse microbienne entre donc activement en compétition avec les plantes pour le S minéral disponible. Eriksen (1997a) a montré que sur un sol enrichi en cellulose, le rendement d'une plante et son contenu en S sont réduits, expliquant que la biomasse microbienne capture le S minéral disponible privant ainsi la plante de S.

### ***B.3.2 Processus de minéralisation des pools de soufre organique***

Les composés organiques soufrés ne sont majoritairement pas directement disponibles pour la plante et doivent être transformés par voie biochimique ou biologique en sulfate (Castellano & Dick 1991).

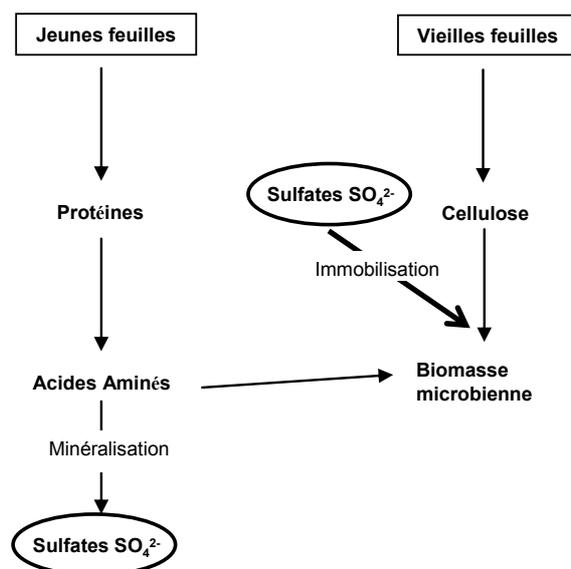
- La **voie dite "biochimique"** de cette minéralisation concerne les esters de sulfate. Ces composés libèrent du  $\text{SO}_4^{2-}$  suite à une hydrolyse enzymatique assurée par les sulfatases. Il existe plusieurs types de sulfatases parmi lesquelles l'arylsulfatase a été bien caractérisée (Fitzgerald 1976). Majoritairement d'origine bactérienne et fongique, elles sont sécrétées et catalysent l'hydrolyse des esters de sulfate en sulfate inorganique par clivage de la liaison O-S :



- La **voie biologique** concerne les sulfures de carbone. L'intensité de la libération du  $\text{SO}_4^{2-}$  dépend directement de l'activité microbienne du sol (Eriksen *et al.* 1995). Leur hydrolyse permet de satisfaire la demande énergétique (fourniture en carbone organique) de ces organismes (Ghani *et al.* 1993a).

#### ***(a) Le taux de minéralisation dépend des propriétés du sol***

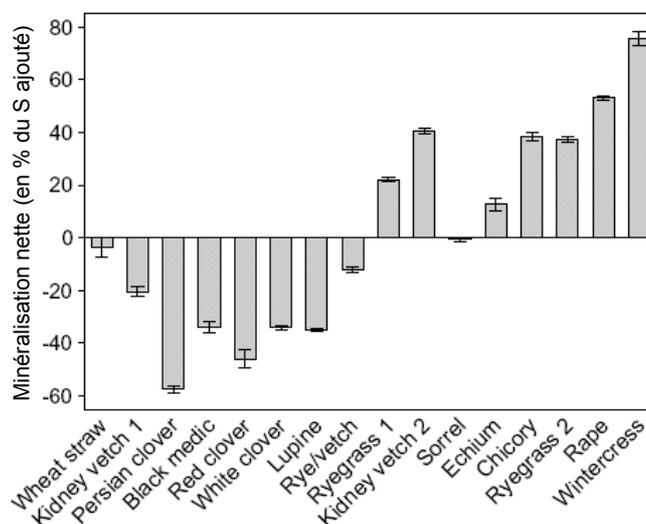
Le taux de minéralisation est affecté par l'accessibilité des composés organiques soufrés. Les composés de la solution du sol sont plus accessibles que ceux qui sont associés aux argiles ou aux acides humiques (Eriksen *et al.* 1998 in Scherer 2001). Riffaldi *et al.* (2006) ont évalué les relations entre la minéralisation du S organique et les propriétés de



**Figure 11** : Minéralisation et immobilisation après incorporation de différents types de matière organique dans le sol (d’après Scherer 2001).

**Tableau 4** : Composition biochimique de la litière des espèces étudiées (d’après Eriksen 2005).

Common name	Scientific name	S (%)	C:N:S	Lignin (%)
Wheat straw <sup>a</sup>	<i>Triticum aestivum</i> L. ssp. vulgare	0.08	604:75:1	8.7
Kidney vetch 1	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	0.13	329:17:1	5.3
Persian clover	<i>Trifolium resupinatum</i>	0.13	324:17:1	5.0
Black medic	<i>Medicago lupulina</i> L.	0.16	278:14:1	4.5
Red clover	<i>Trifolium pratense</i> L.	0.16	276:15:1	9.3
White clover	<i>Trifolium repens</i> L.	0.17	250:14:1	6.8
Perennial lupine	<i>Lupinus polyphyllus</i>	0.17	246:15:1	4.5
Rye/vetch	<i>Secale cereale</i> L./ <i>Vicia sativa</i> L.	0.17	222:11:1	4.4
Perennial ryegrass 1	<i>Lolium perenne</i> L.	0.19	226:24:1	6.4
Kidney vetch 2	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	0.20	221:13:1	3.7
Sorrel	<i>Rumex Acetosa</i> L.	0.23	188:16:1	10.8
Echium	<i>Echium vulgare</i>	0.26	146:14:1	5.6
Chicory	<i>Cichorium intybus</i> L.	0.28	146:22:1	6.2
Perennial ryegrass 2 <sup>a</sup>	<i>Lolium perenne</i> L.	0.38	116:11:1	1.5
Oilseed rape <sup>c</sup>	<i>Brassica napus</i> L.	0.70	59:8:1	0.9
Early wintercress	<i>Barbarea verna</i>	0.81	50:11:1	1.4



**Figure 12** : Minéralisation nette du S, 5 jours après l’incorporation dans le sol de litières issues des différentes espèces citées ci-dessus (d’après Eriksen 2005).

différents sols (pH, texture, contenus en N, C et S total, activités enzymatiques). Ils n'enregistrent pas d'effet du pH ou de la texture, mais à l'inverse de Pirela & Tabataï (1988), ils trouvent une corrélation positive entre la quantité de S minéralisé et/ou potentiellement minéralisable et les contenus organiques carbonés, azotés et soufrés du sol. Cette corrélation souligne l'importance du statut nutritionnel des sols dans les processus de minéralisation du S. Par ailleurs, en accord avec Eriksen *et al.* (1995), ils mesurent une corrélation positive entre la minéralisation du S et les activités enzymatiques, arylsulfatase et deshydrogénase (endogène aux micro-organismes) du sol.

*(b) Le taux de minéralisation dépend de la composition floristique*

*i) Le taux de minéralisation dépend de la qualité de la litière*

Une part importante de S prélevé par les plantes est restituée au sol sous forme de litière. Un des facteurs clés influençant et expliquant les processus de transformation des composés soufrés organiques dans le sol serait la composition biochimique des tissus végétaux et donc des espèces composant la litière (Zy *et al.* 2003 ; Dedourge *et al.* 2003). La libération de S par la décomposition de la litière dépend essentiellement du contenu soufré de cette dernière. Une matière organique riche en S (ratio C : S faible), comme par exemple une jeune feuille, est facilement minéralisée (**Figure 11**). Au contraire, le S d'une matière organique pauvre en cet élément (ratio C : S élevé), comme de la paille, est immobilisé (Eriksen 1997a). Eriksen (2005) a montré dans une expérience d'incubation que le devenir du S de la litière, c'est-à-dire minéralisation ou immobilisation, dépend non seulement du ratio C : S des résidus végétaux, mais aussi de leur pourcentage de lignine. Ces deux variables sont fonction de l'âge des organes et de l'espèce (Eriksen 2005 : **Tableau 4** ; **Figure 12**). Cinq jours après leur incorporation dans le sol, la minéralisation varie entre -58 % (donc immobilisation) pour une litière de trèfle perse (*Trifolium resupinatum* ; ratio C : S = 324 ; % lignine = 5.0) et 76% pour une litière de barbarée commune (*Barbarea verna* ; ratio C : S = 50 ; % lignine = 1.4 ; **Figure 12**).

*ii) Le taux de minéralisation dépend de la communauté rhizosphérique*

Le volume de la rhizosphère est variable selon l'architecture et le développement racinaire. Elle représente près de 100% des premiers centimètres des sols prairiaux (Bazot 2005). L'activité microbienne dans cette zone est particulièrement intense, en comparaison au

sol non rhizosphérique (Lynch & Whipps 1990). De nombreux auteurs ont montré que la composition de la communauté microbienne dans la rhizosphère dépend de la composition floristique (Marschner *et al.* 2001 ; van den Koornhuysen *et al.* 2003) du fait d'une différence dans la quantité et la composition des exsudats racinaires (Bertin *et al.* 2003). Les différences observées dans les transformations du S dans le sol sous des couverts végétaux différents, peuvent être expliquées par des communautés microbiennes rhizosphériques différentes.

(c) Controverse sur la réserve en soufre la plus disponible : esters de sulfate ou sulfures de carbone ?

Plusieurs études se sont focalisées sur l'évaluation du taux de minéralisation et/ou de remobilisation du S organique. Ce sujet fait débat. D'après plusieurs études, le pool de S organique le plus rapidement minéralisé est celui récemment immobilisé. Eriksen *et al.* (1995) ont proposé de classer la disponibilité du S du sol selon sa facilité d'extraction. Dans une étude *in situ*, Eriksen (1997b) a montré que le S minéral récemment immobilisé est physiquement plus accessible que le S organique plus âgé, ces derniers étant libérés plus lentement. Dans une étude en laboratoire, Ghani *et al.* (1993a) ont fait le même constat : quand le S est récemment immobilisé, les esters de sulfates ainsi que les sulfures de carbone sont plus rapidement minéralisés. Selon McLaren *et al.* (1985) les esters de sulfate seraient la source principale et la plus immédiate de S organique disponible pour la plante. Cette source est plus transitoire que les sulfures de carbone et sert de stockage temporaire du sulfate dans le sol (McLaren *et al.* 1985). Castellano & Dick (1991) sont allés dans le même sens que McLaren *et al.* en apportant quelques précisions. Ils ont suggéré que le S inorganique est d'abord immobilisé en esters de sulfate puis progressivement converti par l'action microbienne en sulfures de carbone. Dès lors que les esters de sulfate sont plus facilement hydrolysable que les sulfures de carbone, ces derniers sont plus facilement minéralisés et disponibles pour la plante. En contradiction avec les conclusions de Mac Laren *et al.* (1985), Ghani *et al.* (1992) ont émis l'idée que la minéralisation des sulfures de carbone serait la principale source de sulfate biodisponible. Cette hypothèse suit l'analyse de Stevenson (1986) qui fait de la biomasse microbienne, principal acteur de la minéralisation, un facteur clé du cycle du S. En effet, bien que le S microbien ne représente qu'une petite partie du S organique total (1.5 à 5 % ; Wu *et al.* 1994), il est important de le considérer au même titre que les esters de sulfate dans le cycle biogéochimique, comme une forme labile, du fait du turn-over important de la biomasse microbienne du sol (Kertesz & Mirleau 2004).

Zhou *et al.* (1999) montrent que les deux hypothèses, quant à la source prépondérante de S organique biodisponible, ne sont pas contradictoires et s'appliquent à des conditions expérimentales ou des situations différentes. En sol nu, la minéralisation des sulfures de carbone dominerait alors qu'en présence de végétation, donc d'une force puits de sulfates, la minéralisation des esters de sulfate serait supérieure. Zy *et al.* (2003) ont expliqué cette situation en montrant que l'activité de l'arylsulfatase est supérieure dans la rhizosphère.

## C. Apparition des carences en soufre

Jusqu'au début des années 80, le S n'avait pas fait l'objet de préoccupations importantes dans la production végétale. Les dépôts de S *via* les émissions atmosphériques étant suffisant pour satisfaire les besoins et compenser les exportations de la plupart des cultures, il n'était pas nécessaire d'intégrer cet élément dans les programmes de fertilisation. Seules les Brassicacées, grandes consommatrices de S (demande évaluée en France entre 60 et 75 kg ha<sup>-1</sup> de S pour le colza : Merrien *et al.* 1989), faisaient l'objet d'un apport de fertilisant soufré.

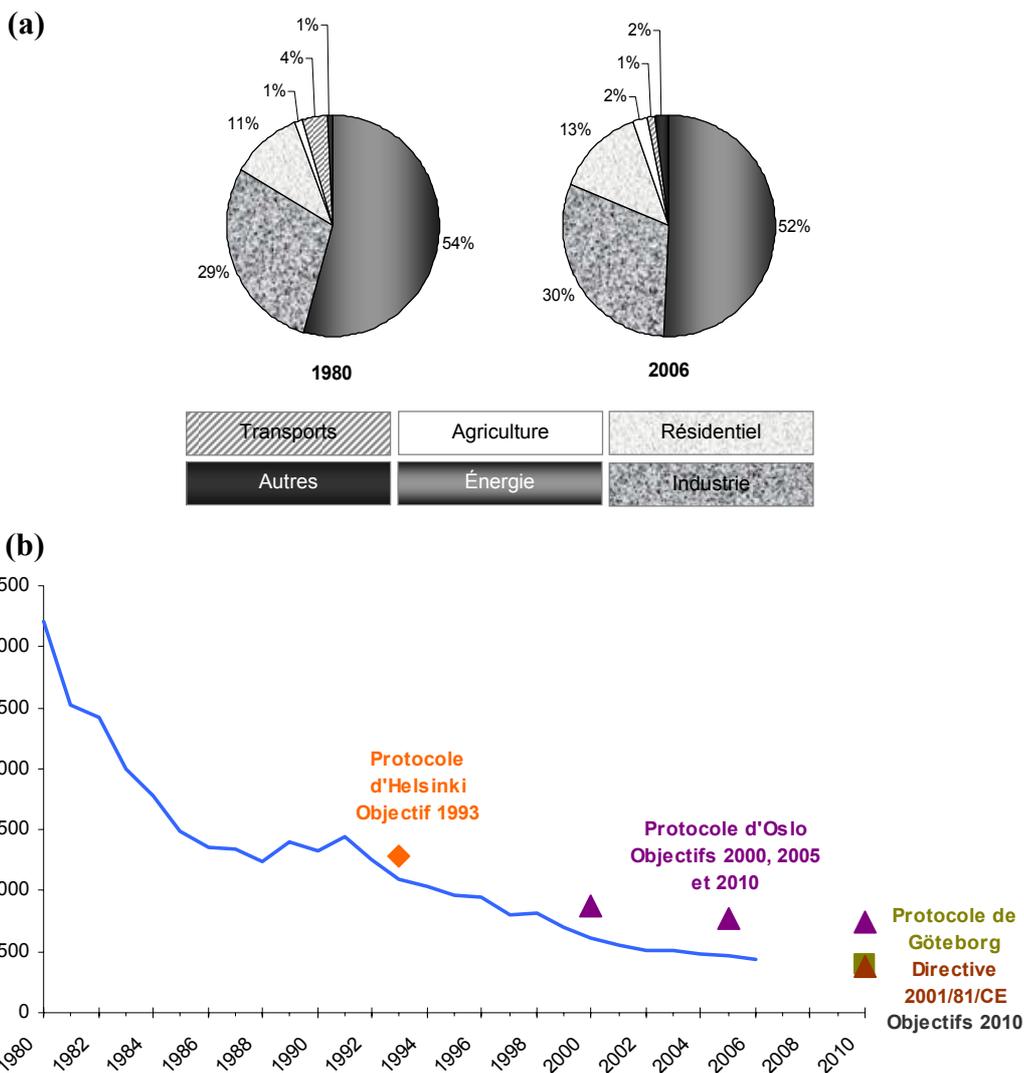
Des carences sont ensuite apparues dans plusieurs régions du monde et dans de nombreux écosystèmes, grandes cultures et prairies, en absence de fertilisation soufrée. L'apparition de ces carences est la conséquence de quatre phénomènes principaux :

- diminution des retombées atmosphériques soufrées,
- appauvrissement des engrais en S,
- lixiviation du S des sols,
- exportation croissante de biomasse soufrée non compensée.

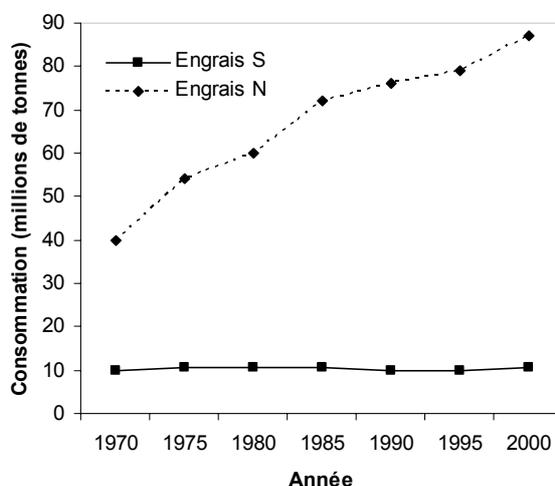
### C.1 Diminution des entrées soufrées

#### **C.1.1 Faibles retombées atmosphériques soufrées**

Les retombées atmosphériques soufrées s'effectuent sous la forme de SO<sub>2</sub>. Il provient principalement de la combustion des combustibles fossiles (charbons, fiouls, etc.), au cours de laquelle les impuretés soufrées contenues dans les combustibles sont oxydées par l'oxygène de l'air en SO<sub>2</sub>. Ce polluant gazeux est rejeté par de multiples pollutions individuelles (installations de chauffage domestique, véhicules à moteur diesel, etc.) et par des pollutions collectives plus importantes (centrales de production électrique ou de vapeur, chaufferies



**Figure 13 :** (a) Répartition des émissions de dioxyde de soufre par secteur en 1980 et 2006 ; (b) évolution des émissions de dioxyde de soufre dans l’atmosphère en France métropolitaine entre 1980 et 2007 (d’après le ministère de l’Industrie, Source : Citepa, Coralie, inventaire au format CEE-NU, février 2007).



**Figure 14 :** Tendence mondiale des quantités d’N et de S consommées dans les fertilisants (d’après Pasricha & Abrol 2001).

urbaines, etc. ; **Figure 13a**). Suite aux différents protocoles anti-pollution mis en place par les pays industrialisés depuis une trentaine d'années, les émissions européennes de SO<sub>2</sub> sont en baisse. Ainsi, en France métropolitaine, les émissions de SO<sub>2</sub> ont chuté de 85 % entre 1980 (3200 kt soit 1600 kt de S) et 2006 (438 kt soit 219 kt de S ; **Figure 13b**). Cette tendance à la baisse devrait se poursuivre au cours des prochaines années : - 19% supplémentaire à l'horizon 2010. Or, le SO<sub>2</sub> se redéposant au sol est une source importante qui, après oxydation au sein du sol, est directement disponible pour la plante au niveau des racines.

### ***C.1.2 Utilisation de fertilisants à faible contenu soufré***

Le S, autrefois présent sous forme d'impureté dans les engrais, a progressivement disparu de leur contenu. D'une part les types d'engrais employés ont évolué. Par exemple le superphosphate, engrais contenant du S, du fait de son procédé de fabrication, est de plus en plus remplacé par un engrais dépourvu de S, le triple superphosphate. D'autre part l'intensification croissante des systèmes cultureux, liée à une nécessité d'augmentation des rendements, a dans de nombreuses régions, conduit à l'utilisation d'engrais riche en N et pauvre voire dépourvu en S (Murphy & Boggan 1988). Entre 1985 et 2000, la consommation mondiale d'N seul est montée de 73 à 87 millions de tonnes, soit 20% supplémentaire alors que celle du S est restée quasiment constante, aux environs de 10 millions de tonnes par an principalement réservée aux grandes cultures (Pasricha & Abrol 2001 ; **Figure 14**). Ceci a donc progressivement conduit, depuis les années 80, à une modification du ratio N : S des fertilisants en faveur de l'N, modifiant le ratio N : S disponible du sol.

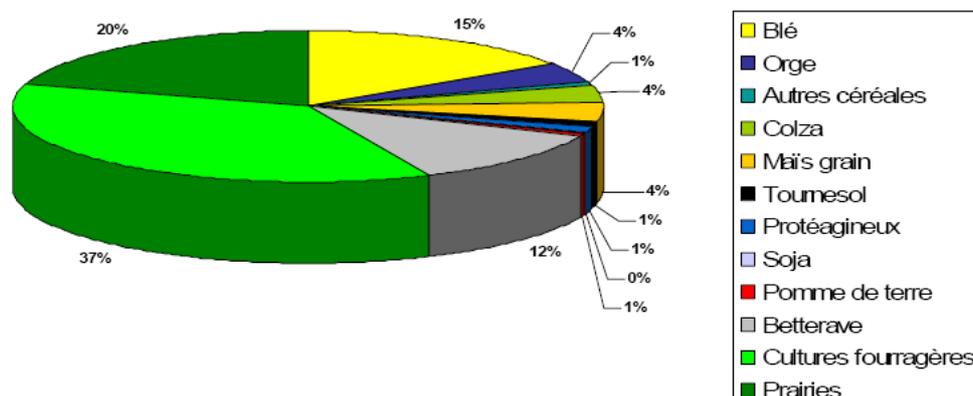
## ***C.2 Augmentation des sorties soufrées***

### ***C.2.1 Lixiviation du soufre***

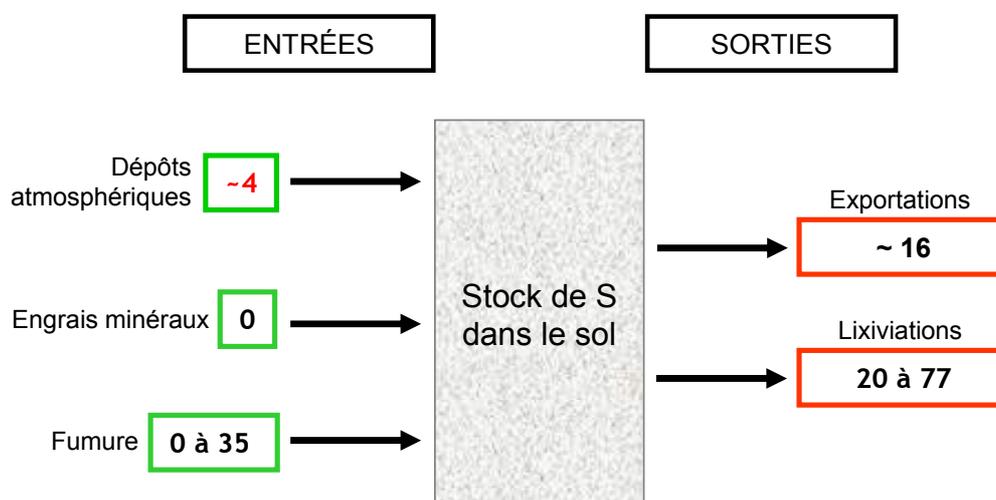
Malgré les préconisations, des sols agricoles sont encore très souvent laissés à nu notamment durant l'hiver, et sont lixiviés. De telles pratiques ont accentué la lixiviation du S dans les zones à pluviosité élevée (Murphy & Boggan 1988). La perturbation des écosystèmes naturels et leur exploitation par l'homme sont à l'origine du même phénomène. En Nouvelle-Zélande, en Australie, ainsi que dans le sud-est et le sud-ouest des Etats-Unis, la mise en place de vastes pâturages permanents en lieu et place des écosystèmes originels a accentué très fortement dans ces zones soumises à des épisodes de forte pluviosité la lixiviation du S. Ce

**Tableau 5 :** Lixiviation du soufre en fonction du type de sol, des précipitations annuelles et du niveau d'engrais soufré apporté ( d'après Muller & Ballif 1991 ; données : Arvalis).

Lieu et Période	Type de sol	Précipitations annuelles mm	Apports par les engrais kg S ha <sup>-1</sup> an <sup>-1</sup>	Pertes par lixiviation kg S ha <sup>-1</sup> an <sup>-1</sup>
Quimper 1954-65	Granitique	1090	-	20
Versailles 1973-88	Limoneux	660	16	30
Clermont-Ferrand 1959-66	Argilo-calcaire	570	76	77,2
Châlons-sur-Marne 1977-82	Rendzine	630	135,2	20
Le Magneraud 1986-2004	Terre de groies	650	12	20



**Figure 15 :** Contribution des productions végétales (en %) aux exportations annuelles de S (source : données SCEES, INRA, LDAR Laon, estimations).



**Figure 16 :** Bilan apparent du S en prairie en France (en kg de S).

sont les premiers écosystèmes prairiaux où des déficiences en cet élément ont été identifiées (Walker *et al.* 1956, Martin 1958, Williams *et al.* 1954, Kalmbascher *et al.* 2005). Outre les pratiques agricoles et le climat, l'importance des pertes de S par lixiviation est également fonction du type de sol. Ainsi, un sol argilo-calcaire sera davantage sujet aux pertes de sulfates par lixiviation qu'un sol limoneux (**Tableau 5**).

### ***C.2.2 Intensification des systèmes culturaux***

Dans les régions développées, la nécessité de répondre aux besoins d'une population toujours croissante, a conduit à l'intensification des systèmes culturaux grâce à l'utilisation d'engrais riches en N et de variétés à haut rendement. Ceci a augmenté le prélèvement du S dans les sols et les exportations soufrées non compensées par l'apport de fertilisants lors des récoltes (Ceccoti & Messick 1997). Par exemple, le rendement annuel de 10 tonnes ha<sup>-1</sup> de matière sèche d'une prairie irlandaise de ray-grass, stimulé par la fertilisation azotée, conduit à l'exportation de 30 kg de S ha<sup>-1</sup> (Murphy & Boggan 1988). En France, ces exportations sont aujourd'hui estimées à environ 300 kt de S an<sup>-1</sup> sur l'ensemble des surfaces agricoles, soit en moyenne 11.2 kg de S ha<sup>-1</sup>, et sont donc nettement supérieures aux apports atmosphériques soufrés. Les prairies et cultures fourragères réunies, représentent le poste d'exportations soufrées nettes le plus important, estimé à 57 %, soit 15.6 kg S ha<sup>-1</sup> (Vis & Goujard 2005 ; **Figure 15**).

### ***C.3 Bilan du soufre en France***

Les retombées atmosphériques et la fumure représentent la source principale de S dans la production végétale, soit 4 à 39 kg S ha<sup>-1</sup>. L'exportation des tissus végétaux *via* les récoltes associée à la lixiviation constitue la sortie principale de S, soit 36 à 93 kg S ha<sup>-1</sup> (**Figure 16**). Ce bilan national ne peut pas être décliné directement à l'échelle régionale, du fait de fortes disparités notamment pour la lixiviation et les retombées atmosphériques. Néanmoins, il permet de souligner le risque important d'apparition de carences en S dans certaines régions, notamment dans celles soumises à une agriculture relativement intensive et à de faibles dépôts atmosphériques, ce qui est le cas de la Basse-Normandie.

Sur de nombreuses parcelles, la combinaison de ces facteurs a conduit à une diminution des réserves nettes (S) et relatives (S / N P K) en S du sol et donc à une diminution

des quantités disponibles pour la plante. Cette oligotrophisation ou dystrophie a des conséquences variables selon les espèces, celles-ci n'ayant pas les mêmes exigences nutritionnelles.

## **II. Prévention et conséquences des carences en soufre**

Nous allons tout d'abord envisager les moyens de compenser les déficiences en S avant l'apparition d'une carence avérée.

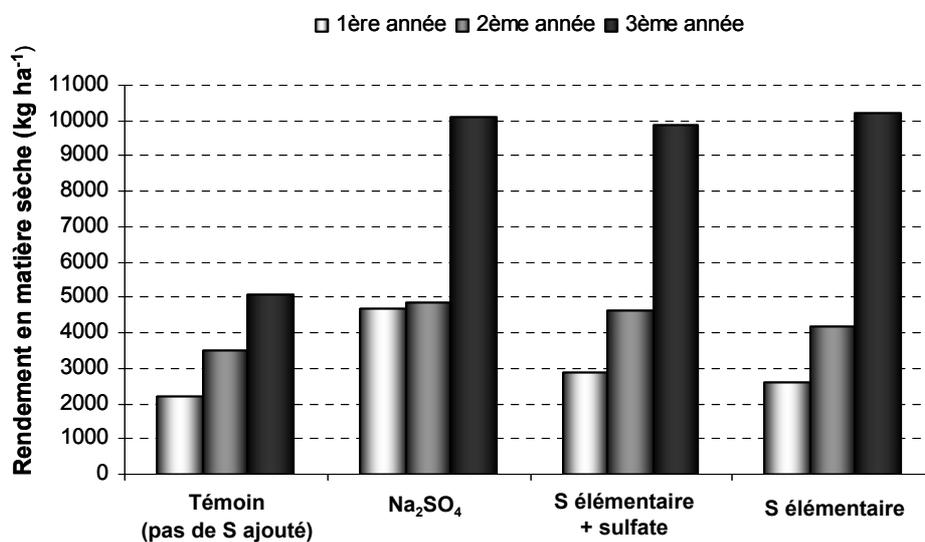
### **A. Intérêt de la fertilisation soufrée**

Essentiellement due à une réduction continue des dépôts atmosphériques et une augmentation des prélèvements de biomasse, la carence en S est un problème qui est voué à s'amplifier et à affecter les systèmes naturels et agricoles à l'échelle mondiale (Ceccoti & Messick 1997). Il apparaît donc indispensable de compenser ce déficit par une utilisation appropriée d'engrais soufrés pour prévenir des pertes de rendements, de qualités des cultures et probablement de diversité des prairies. Il existe différents moyens de diagnostiquer les déficiences en S avant l'apparition d'une carence avérée. Différents outils ont été développés pour le permettre : modèles informatiques, analyses de sol, analyses de tissus végétaux (ratio N : S, ratio malate : sulfate, etc.). Ils sont présentés en **Annexe 1**. Ceux-ci sont applicables sur la plupart des cultures, mais le sont plus difficilement sur les systèmes pluri-espèces, comme les prairies permanentes. En effet la présence de plusieurs espèces au sein de la parcelle rend complexe la procédure, d'un point de vue technique et d'un point de vue analytique car les espèces ne partagent pas les mêmes exigences en S.

#### *A.1 Principales formes de fertilisants soufrés*

Les fertilisants soufrés les plus communément utilisés sont les suivants (Lamond 1997 ; Scherer 2001 ; Wen *et al.* 2003) :

- Le Sulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  est un fertilisant azoté utilisé de manière importante à travers le monde. Il contient 24% de S et 21% d'N et a été prouvé efficace dans les cultures carencées en S. Cependant, les sulfates contenus dans le sulfate d'ammonium



**Figure 17 :** Rendement en matières sèches totales des graminées traitées chaque année, au début du printemps, avec un engrais à base de sulfates ou de soufre élémentaire, à raison de 15 kg ha<sup>-1</sup> de S (d'après Malhi 2000).

sont mobiles et sujets à des pertes par lixiviation. Dans le sol le sulfate d'ammonium a un effet acidifiant du fait de la nitrification de  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{HNO}_3$ . Il est donc déconseillé de l'utiliser sur des sols acides.

- Le Gypse ( $\text{CaSO}_4$ ) est du sulfate de calcium qui contient 18 à 20 % de S. Il est disponible sous sa forme hydratée. Son intérêt est d'être relativement rapidement mis à disposition des végétaux et de compléter également les sols en calcium.
- Le Sulfate de potassium et de magnésium contient 22% de S, 22% de  $\text{K}_2\text{O}$  et 11 % de Mg. Il est utilisé dans des mélanges de fertilisants, ou peut être appliqué seul dans le cas du sulfate de magnésium pour fertiliser des sols pauvres en ces deux éléments.
- Le Soufre élément ( $\text{S}^0$ ) : ce fertilisant peut contenir 90% et plus, de S. Le  $\text{S}^0$  doit être oxydé par les microorganismes du sol, pour former du sulfate et être ainsi disponible. Ce processus peut être long. Plusieurs facteurs affectent le taux d'oxydation : la taille des particules et leur dispersion, le rythme, les méthodes et le moment d'application ; la température du sol et l'humidité. Ainsi selon l'année, les effets peuvent être très variables. Une autre limite de ce fertilisant est l'acidification des sols qui peut être observée en cas d'utilisation répétée.

Malhi *et al.* (2000) ont comparé les effets de différents types d'engrais sur la production de matière sèche de prairies. Une étude réalisée à Leslieville (Alberta) de 1993 à 1995 pour comparer l'efficacité de deux types d'engrais sur des sols de prairie permanentes carencés en S a montré que les parcelles traitées aux sulfates donnent des rendements nettement supérieurs à ceux des parcelles non traitées ou traitées au S élément au cours de la première année (**Figure 17**). La différence est moins prononcée la deuxième année. À la troisième année, les parcelles des deux groupes donnent des rendements comparables (**Figure 17**). Malhi a conclu que certains engrais à base de S élément peuvent se montrer aussi efficace que les sulfates pour accroître le rendement fourrager des prairies sur le long terme. Pour éviter le risque d'une baisse de rendement attribuable à une carence en S à court terme, il paraît préférable d'utiliser des engrais sulfatés sur les sols carencés en cet élément.

## *A.2 Intérêts d'une fertilisation combinée*

Aujourd'hui la fertilisation combinée est une pratique courante pour l'N (fertilisation N P K). Cette combinaison s'avère plus efficace que l'application d'N seul, tant au niveau du

rendement que de la qualité des récoltes. Il est donc pertinent de penser qu'il puisse en être de même pour le S. Voici quelques avantages d'une fertilisation combinée intégrant le S :

(a) Combinaison azote – soufre

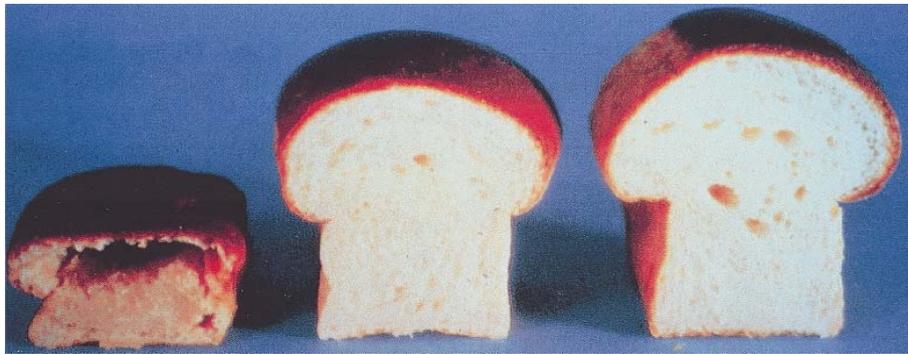
Le maintien de l'équilibre N : S au travers d'une fertilisation combinée permet de limiter le stress soufré d'une plante. Une plante, se développant en condition de faibles disponibilités en N et S, présente moins de symptômes de déficit en S qu'en condition de disponibilité azotée élevée (Blake-Kalff *et al.* 1998). À basses concentrations de S et d'N, la balance interne du ratio N : S est mieux respectée. La combinaison des deux éléments dans les fertilisations a également comme intérêt de moins altérer le ratio N : S des sols et ainsi de maintenir les équilibres compétitifs pour les différents nutriments au sein des communautés végétales. Enfin, l'apport de S combiné à l'N a un rôle dans le fonctionnement global des écosystèmes et module l'impact environnemental des agrosystèmes : la stimulation de l'absorption du nitrate par des teneurs élevées en S est source de réductions importantes de la lixiviation du nitrate dans les prairies temporaires par exemple (Schnug 1993 ; Brown *et al.* 2000).

(b) Combinaison phosphore – soufre

Sinclair *et al.* (1996a, 1997) ont montré qu'il existe une interaction significative entre le P et le S. Un niveau élevé d'un des éléments accroît l'effet de l'autre élément sur la concentration en N du trèfle blanc. En effet, l'application combinée de ces deux éléments stimule davantage la fixation de l'N<sub>2</sub> qu'une application indépendante. Ceci permet en prairie d'envisager une diminution de la fertilisation azotée, l'N<sub>2</sub> fixé par les Fabacées étant rétrocedé aux autres espèces (Paynel *et al.* 2001). Cette fertilisation combinée permet de multiplier par deux la production de matière sèche (Sinclair *et al.* 1996a).

(c) Combinaison sodium – soufre

Pour les sols déficients en sodium, une application combinée de fertilisants sodique et soufré peut être recommandée. Travaillant sur un modèle de prairie de ray-grass anglais, Chiy & Phillips (1998) ont montré que l'apport de S facilite l'absorption du sodium et inversement, Ceci suggère que la combinaison des deux fertilisants est plus efficace pour surmonter un déficit de l'un des éléments. De plus, lorsqu'un sol est saturé en cations monobasiques, dont



Apport faible  
en S

Apport médian  
en S

Apport élevé  
en S

**Figure 18 :** Effet de la fertilisation soufrée sur la qualité de la farine de blé (d'après Zhao *et al.* 1999b).

le sodium, le S apporté sous forme de S élément est rendu plus facilement disponible, du fait d'une oxydation plus rapide de celui-ci (Chiy *et al.* 1999).

## B. Conséquences des carences en soufre à l'échelle de la plante et de la parcelle

Les conséquences des carences en S seront d'abord présentées chez quelques grandes cultures. Ces cultures plus exigeantes en S que les prairies, et constituant un enjeu financier plus important, ont été les premières étudiées, afin de déterminer l'impact d'une fertilisation *versus* une carence en S sur leur production, leur qualité et les mécanismes (biologiques, physiologiques, biochimiques) impliqués dans les modifications du fonctionnement de la plante. Les écosystèmes prairiaux seront abordés dans un second temps.

### *B.1 Impact sur le rendement et la qualité : exemple de grandes cultures*

Durant ces 20 dernières années, plusieurs grandes cultures comme celles du colza et des céréales, ont développé des symptômes d'une carence en S avec pour conséquence une réduction de leur rendement (McGrath & Zhao 1996 ; Mc Grath *et al.* 1996) mais aussi une baisse de leurs qualités.

En cas de carence soufrée, le rendement en graines du **colza**, la qualité de leur huile ainsi que la concentration en glucosinolate sont réduits (Fismes *et al.* 2000 ; De Pascale *et al.* 2007). La formation d'acides gras indésirables dans les huiles, tels que l'acide palmitique qui est hyper cholesteromique et l'acide érucique qui n'a aucune valeur nutritive, est favorisée (Ahmad & Abdin 2000b).

Bien que les exigences en S des **cultures céréalières** soient moins importantes que celles du colza, une importante baisse de qualité de la récolte, accompagnant celle du rendement, est également constatée en conditions de carence en S (Zhao *et al.* 1999a). La qualité nutritionnelle du blé et la qualité boulangère des farines diminuent, par diminution du nombre de ponts disulfures essentiels dans le maintien de la fonctionnalité du gluten (Tabe *et al.* 2002). La proportion des protéines polymériques riches en S et le gel protéique étant réduits, le gonflement, l'extensibilité et l'élasticité de la pâte sont affectés (Zhao *et al.* 1999b ; Wieser *et al.* 2004 ; Granvogl *et al.* 2007 ; **Figure 18**).

Qualitativement, les répercussions de la nutrition soufrée sur la **betterave à sucre** sont plus indirectes que chez les autres. En effet, le produit de récolte de la betterave à sucre, le

**Tableau 6 :** Effet de la fertilisation soufrée sur le rendement de différent types de culture (d'après Aulakh 2003).

Cultures	Nombre d'études	Rendement supplémentaire (%)	
		Intervalle de réponse	Moyenne
<b>Céréales</b>			
Blé	32	5-100	25
Riz	27	1-40	17
Maïs	3	17-60	41
Sorgho	3	19-42	25
Millet	1	-	15
<b>Légumineuses</b>			
Pois chiche	4	16-30	18
Lentille	4	7-70	28
Haricot Mungo à graines vertes	7	13-73	20
Haricot Mungo à graines noires	7	17-26	20
Pois d'Angole	8	12-40	22
Petits pois	3	8-80	32
Dolique à œil noir	1	-	33
<b>Graines oléagineuses</b>			
Colza-moutarde	28	4-127	33
Arachide	23	8-107	32
Soja	8	14-36	25
Tournesol	6	6-30	20
Sésame	3	10-33	22
Safran carthame	1	-	23
Lin oléagineux	5	3-31	16
Taramira	1	-	88
<b>cultures fourragères</b>			
Luzerne	3	17-60	41
Sorgho	1	-	35
Trèfle d'Alexandrie	3	20-50	32
Maïs	8	6-22	14
<b>Légumes</b>			
Pomme de terre	5	7-64	25
Oignon	6	2-41	25
Ail	3	27-59	40
Radis	1	-	27
Chou-fleur	1	-	45
Piment	2	13-20	17
Gingembre	3	23-32	26
Haricot vert	2	28-48	38
<b>Autres cultures</b>			
Coton	3	18-49	33
Sucre de canne	10	11-32	22
Manioc	2	18-37	27
Jute	1	-	21
Café	1	-	63
Thé	2	4-144	74
Opium	1	-	19

**Tableau 7 :** Effet de l'application de sulfate de calcium sur la production de matière sèche totale et celles du trèfle et des Poacées individuellement (en tonne par hectare ; d'après Walker *et al.* 1956).

Culture	Fertilisation CaSO <sub>4</sub> (kg ha <sup>-1</sup> )					Erreur standard par placette
	0	100	200	400	800	
<b>Poacées</b>	3,3	3,7	4,9	5,6	6,4	0,08
<b>Trèfle</b>	0,2	0,7	2,4	2,7	2,8	0,09
<b>Total</b>	3,5	4,4	7,3	8,3	9,2	0,08

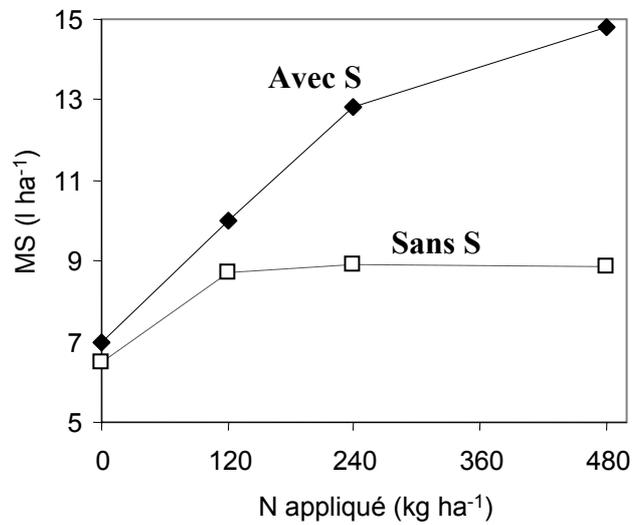
saccharose, ne contient pas de composés soufrés. Cependant une carence en S peut affecter le taux de substrats assimilés et par conséquent le stockage de sucre dans les racines. De plus, une carence en S peut altérer le ratio  $N_{\text{total}} : S_{\text{total}}$  (Hoffmann *et al.* 2003) et provoquer le stockage d'acides aminés libres au niveau des racines. La qualité de la betterave à sucre décroît alors, ces composants azotés étant d'importantes impuretés affectant le rendement en sucre blanc extractible.

Il est nécessaire de prendre en compte le cas des grandes cultures car ayant fait l'objet de plusieurs études concernant leurs métabolismes azoté et soufré, seuls ou en interaction, elles constituent des modèles de références permettant d'analyser et d'interpréter les réponses des espèces prairiales. Plusieurs autres types de cultures ont également fait l'objet de telles études. Dans tous les cas, l'application de S augmente leur rendement, et ce dans des proportions variables allant de 4 à 144 % (**Tableau 6**).

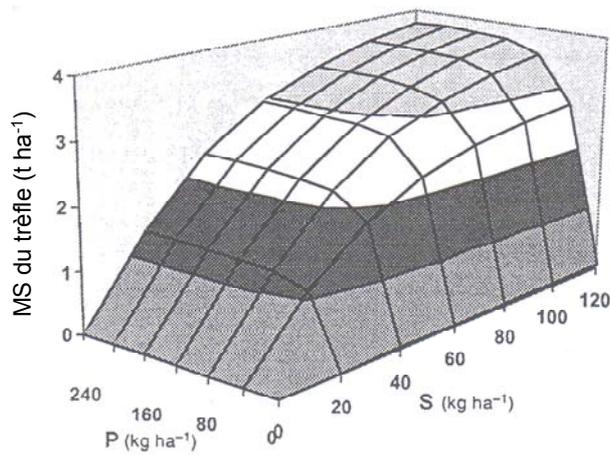
## *B.2 Modification de la productivité et du fonctionnement des écosystèmes prairiaux*

### ***B.2.1 Influence de la fertilisation soufrée sur la productivité des prairies***

Plusieurs études réalisées sur des communautés végétales dans des contextes pédoclimatiques différents, montrent une augmentation du rendement lorsqu'une fertilisation soufrée est pratiquée. Ceccotti & Messick (1997), se référant à une expérience multi sites, ont envisagé une augmentation de la production de l'ordre de 0,24 à 0,71 tonne de matière sèche  $\text{ha}^{-1} \text{an}^{-1}$ , consécutivement à une fertilisation soufrée de 15  $\text{kg ha}^{-1}$  de S après chaque coupe. Walker *et al.* (1956) ont été parmi les premiers à étudier le rôle du S dans les prairies, notamment en Australie et en Nouvelle Zélande où la déficience en S est sévère due à une lixiviation élevée du S minéral. Ils montrent que l'application croissante de S sous forme de gypse (0 à 200  $\text{kg ha}^{-1} \text{CaSO}_4$ ) sur une prairie permanente à sol limoneux-sableux stimule sa production de printemps (**Tableau 7**), entraînant d'abord le développement des Fabacées puis celui des Poacées compagnes. Ils ont suggéré que l'augmentation de la production des Poacées ne résulte pas d'une réponse directe au S de ces espèces mais plutôt d'un phénomène de transfert souterrain des composés azotés (issus de la fixation de  $\text{N}_2$ ) du trèfle vers les espèces compagnes. En Nouvelle Zélande, plusieurs études (Sinclair *et al.* 1996a, b, 1997 ; Morton *et al.* 1998, 1999) ont également envisagé les effets de la fertilisation soufrée sur des prairies majoritairement composées de Poacées (principalement *Lolium perenne*) et de Fabacées (*Trifolium repens*, *Medicago sativa*, *Trifolium ambiguum* et *Trifolium pratense*).



**Figure 19 :** Effet de la fertilisation soufrée sur la production annuelle de matière sèche d'une prairie de ray-grass en fonction de la fertilisation azotée (d'après Murphy & Quirke 1997).



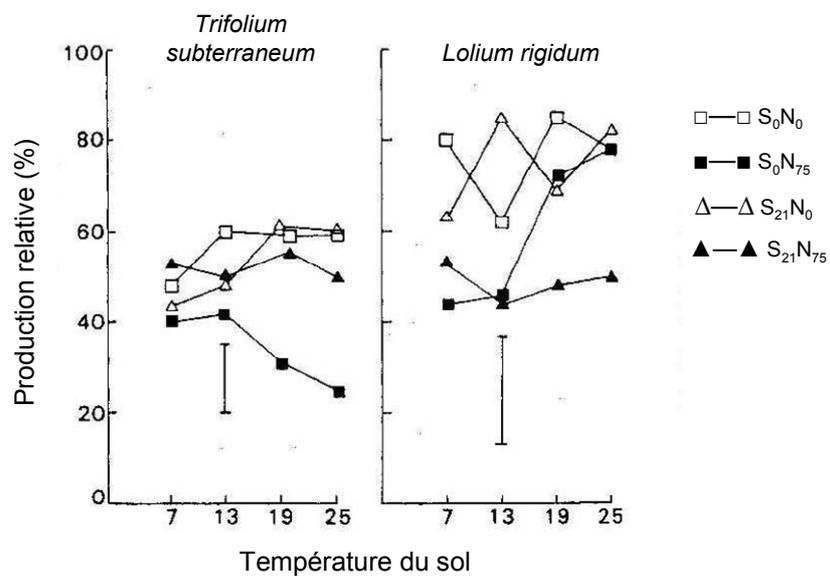
**Figure 20 :** Effet des applications de différents niveaux de fertilisants soufrés et phosphorés sur la production totale de matière sèche du trèfle en culture mixte, après 2 années de culture *in situ* (d'après Morton *et al.* 1998).

Quel que soit le type de culture associée, tous enregistrent également une réponse positive à l'application de S, la production des Fabacées étant nettement stimulée alors que celle du ray-grass l'est plus faiblement. Auparavant, Gilbert & Robson (1984a, b) avait aussi démontré les effets positifs de la nutrition soufrée sur des cultures en mésocosme en apportant une précision : cet effet dépend de la disponibilité des autres nutriments. Chez certaines espèces, les effets du S dépendent de la disponibilité en N du sol. Ils ont enregistré une réponse positive à la fertilisation soufrée, *via* la nette augmentation de la production de matière sèche aérienne et souterraine de deux espèces annuelles en association, *Trifolium subterraneum* et *Lolium rigidum*, mais cela uniquement en présence d'N (plus de 50 kg ha<sup>-1</sup>) pour le ray-grass. Au contraire, Murphy & Quirke (1997) et Murphy *et al.* (2002) enregistrent dans des prairies de ray-grass fauchées, un accroissement de leur production annuelle, quel que soit le niveau d'N apporté, avec néanmoins une production maximale (+ 66%) quand 480 kg ha<sup>-1</sup> d'N sont appliqués (**Figure 19**). Lamond *et al.* (1995), travaillant sur des prairies à brome au Kansas, montrent que ces effets peuvent être retrouvés chez d'autres espèces en mesurant une augmentation moyenne inter-annuelle de 0,7 tonnes de fourrage par hectare, ce dès un apport de 17 kg ha<sup>-1</sup> de S (associé à 134 kg N ha<sup>-1</sup>).

Outre l'interaction entre l'N et le S, une interaction entre le S et le P apporté par les fertilisants a été démontrée par Cullen (1971). Travaillant sur une prairie fauchée multi espèces (composée de *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Cynosurus cristatus*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens* et *Trifolium subterraneum*), semée sur un sol brun limoneux, il enregistre une réponse positive de la production de matière sèche à partir de 100 kg ha<sup>-1</sup> de S apporté (gypse), et cela seulement en présence d'un apport élevé de P (à partir d'environ 120 kg ha<sup>-1</sup> sous forme de phosphate monocalcique). Morton *et al.* (1998) comparant et mesurant la réponse du trèfle associé au ray-grass, à différents niveaux de fertilisation S et P sur deux années consécutives, montrent l'existence d'une synergie entre ces deux éléments. Ils observent que l'apport de 80 kg ha<sup>-1</sup> de S double sa production de matière sèche et que l'apport de 160 kg ha<sup>-1</sup> de P, pour ce même niveau de S, la quadruple (**Figure 20**).

### ***B.2.2 La fertilisation soufrée module les interactions spécifiques***

Gilbert & Robson (1984c, d) se sont de plus, intéressés à la compétition pour le S du sol entre *Trifolium subterraneum* et *Lolium rigidum* en fonction de différents paramètres. Ils ont mené plusieurs expérimentations en cultivant ces dernières en association et en population



**Figure 21 :** Effet de la température du sol et des apports azoté (0 (N<sub>0</sub>) et 75 (N<sub>75</sub>) mg pot<sup>-1</sup>) et soufré (0 (S<sub>0</sub>) et 21 (S<sub>21</sub>) mg pot<sup>-1</sup>) sur la production relative de *Trifolium subterraneum* et *Lolium rigidum* cultivés en association (exprimé en % de leur production en monoculture ; d'après Gilbert & Robson 1984c).

sous conditions contrôlées. Ils ont examiné sur une période de 62 jours les effets de la température du sol tout en modulant les statuts azotés et soufrés. Ils montrent alors que sur un sol riche en N et pauvre en S, la température du sol influence la compétition développée entre les 2 espèces pour le S. Quand elle augmente (entre 19 et 25 °C) et devient plus favorable à la croissance des deux espèces, le développement du ray-grass est favorisé, ceci au détriment de celui du trèfle qui voit alors sa production diminuer comparativement à celle obtenue en population (**Figure 21** ; Gilbert & Robson 1984c). Par contre, quand l’N et le S sont tous deux limitants ou disponibles en grande quantité, les deux espèces coexistent en proportion égale au sein du couvert végétal. À 7°C, aucun phénomène de compétition n’est relevé quels que soient les statuts N et S du sol. À des températures compatibles avec une bonne croissance des végétaux, la co-disponibilité N : S peut donc régir les équilibres compétitifs.

### ***B.2.3 Influence de la fertilisation soufrée sur la qualité des espèces prairiales et des produits dérivés***

Au-delà de la hausse du rendement induite par une meilleure disponibilité en S du sol, certains auteurs décrivent une hausse de la qualité du fourrage récolté, telle que l’augmentation des teneurs en N et/ou protéines dans les tissus consommés par le cheptel (Joyce & Rattray 1970 ; Sinclair *et al.* 1996b). D’autres démontrent un effet indirect de la qualité de ces fourrages sur la qualité des produits dérivés, tels que la viande ou encore la laine de mouton (Murphy & Quirke 1997 ; Chiy *et al.* 1999 ; Murphy *et al.* 2002). Par exemple, Jones *et al.* (1973), dans une expérimentation sur l’effet du S sur l’absorption et la distribution du plomb au sein de l’espèce fourragère *Lolium perenne*, ont constaté que le contenu en plomb de ses parties aériennes diminue avec la fertilisation soufrée. Ceci serait dû à une rétention du plomb au niveau des parties souterraines quand le milieu n’est pas limitant en S. Inversement, un milieu déficient en S conduit à une augmentation de la concentration en plomb dans les parties aériennes, ceci se répercutant ensuite sur les consommateurs directs (cheptel) et indirects (homme). Cependant les effets bénéfiques du S sur certains paramètres ne sont pas nécessairement efficient sur le long terme : Lamond *et al.* (1995) ont enregistré une augmentation des teneurs en protéines d’une prairie temporaire à brome en début de saison, qui s’est atténuée au cours de l’année.

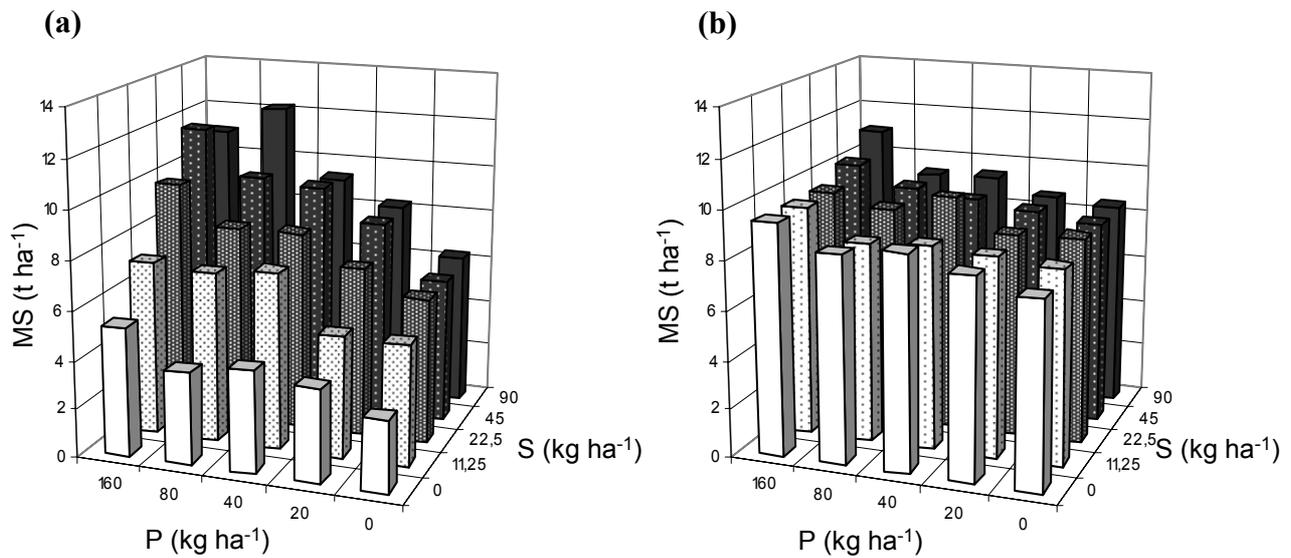
### ***B.2.3 Paramètres affectant les effets du soufre***

Les effets de la fertilisation soufrée ne sont pas systématiques et dépendent en partie des propriétés du sol (texture, pH, statut nutritionnel, humidité, etc.). Morton *et al.* (1999) ont comparé la réponse de prairies, à différents niveaux de fertilisation en S, P et K, de 4 sites caractérisés par des niveaux trophiques initiaux variables, cela durant 8 années consécutives. Il est ressorti de cette expérimentation que selon le type de sol, pour un même niveau d'apport soufré, les prairies répondent différemment : une prairie initialement pauvre en S minéral a une intensité de réponse à la fertilisation soufrée plus élevée que celle d'une prairie plus riche en S minéral. Ils ont également noté une importante variabilité inter-annuelle. D'après Morton *et al.* (1999), ce phénomène serait la conséquence d'une fluctuation des réserves de S minéral dans le sol, due à la lixiviation et aux processus de minéralisation/immobilisation qui dépendent, comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, des conditions d'humidité et de température du sol et donc du climat régional au moment des mesures. Brown *et al.* (2000), comparant deux prairies implantées sur des sols très différents (argileux et limono-sablonneux), ont confirmé les résultats de Morton *et al.* (1999) en mesurant également une grande variabilité inter-annuelle dans la réponse. Ils n'enregistrent par ailleurs pas de réponse au S sur un sol argileux.

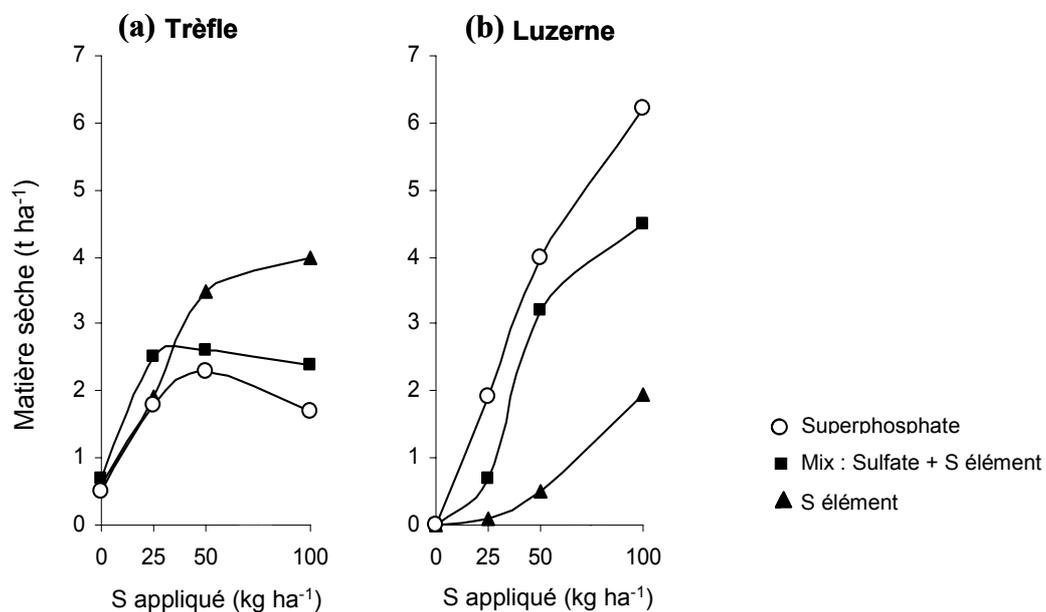
Chiy *et al.* (1999) ont apporté un complément : ayant suivi une prairie semée raygrass/trèfle sur plusieurs années, ils ont remarqué que les effets positifs de la fertilisation soufrée sur sa production de matière sèche ne sont pas permanents. Elle serait efficace durant les premières années d'implantation et ses effets s'atténueraient ensuite pour finalement disparaître.

### ***B.2.4 Influence de la fertilisation soufrée sur la composition spécifique***

Peu d'études ont envisagé les effets du S sur la composition floristique des communautés prairiales et les phénomènes de compétition impliqués. La majorité des travaux s'est focalisée sur des communautés modèles simples considérant deux espèces ou deux groupes d'espèces (Poacée/Fabacée). Walker *et al.* (1956) ont travaillé sur l'abondance relative des groupes de Poacées et de Fabacées d'une prairie permanente non fauchée (principalement composée des espèces suivantes : *Anthoxanthum odoratum*, *Agrostis tenuis*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens*, *Hypochaeris radicata*, *Poa caespitosa* et réensemencée avec *Trifolium subterraneum*, *Trifolium pratense* et *Trifolium hybridum*). Ils ont observé au



**Figure 22 :** Effet de l'application de différents niveaux de fertilisants soufrés et phosphorés sur la production totale de matière sèche (a) de *Trifolium repens* et (b) de *Lolium perenne*, sur 2 ans (d'après Sinclair *et al.* 1996a).



**Figure 23 :** Effet des formes et des niveaux de fertilisants soufrés sur l'accumulation de matière sèche (a) du trèfle et (b) de la luzerne (d'après Boswell & Swanney 1991).

printemps de l'année suivant la fertilisation, que pour un même niveau d'N, le développement des Poacées est favorisé en présence d'un faible apport de S au détriment du trèfle alors qu'un apport en S plus élevé favorise le développement de celui-ci, augmentant ainsi son abondance au sein du couvert végétal. Cependant ils ne se sont pas intéressés à la réponse individuelle de chacune des espèces perdant ainsi la dynamique de la structuration du couvert végétal. Les travaux de Sinclair *et al.* (1996a) sont allés dans le même sens. Dans une expérimentation sur prairie semée sur sol limono-sablonneux, soumise à 5 fauches annuelles, l'application de S stimule le développement de *Trifolium repens*, alors que *Lolium perenne* ne montre qu'une faible réponse (production de matière sèche variant peu ; **Figure 22**). Par exemple pour un même niveau de P (80 kg ha<sup>-1</sup>) apporté, sans fertilisation soufrée le trèfle ne représente que 25% du couvert végétal alors que l'application de 90 kg ha<sup>-1</sup> de S pousse sa contribution à plus de 50%.

Si le S a généralement un impact positif sur la croissance des plantes, l'amplitude de réponse des espèces dépend non seulement de la quantité, mais aussi du type d'engrais soufré appliqué. Pour un même apport de S, l'engrais appliqué peut, selon sa nature, favoriser ou limiter la croissance d'une même espèce. La proportion relative de chaque espèce dans une communauté est ainsi différemment modifiée selon l'engrais utilisé. Boswell & Swanney (1991) ont étudié l'influence de différents types de fertilisants soufrés sur la proportion des espèces de prairies pluri-Fabacées : la luzerne est favorisée par le superphosphate au détriment des trèfles alors que le S élément favorise ceux-ci au détriment de la luzerne (**Figure 23**), les proportions de P et S étant réajustées dans les deux cas, afin que ces deux éléments ne soient pas limitant ou en excès, pour ne pas risquer de confondre les effets observés.

### **III. Conclusion et objectifs du projet de thèse**

Cette analyse bibliographique souligne l'importance du S, en tant que constituant de base de la plante. Elle montre également la dynamique d'appauvrissement global en S des sols et les conséquences que celui-ci entraîne si une fertilisation de compensation n'est pas pratiquée. Elle met aussi en évidence que le rôle du statut soufré du sol sur la composition spécifique des communautés végétales prairiales et le type d'interactions qui s'y développe ne sont connus que de manière très fragmentaire.

Si quelques études ont déjà traité de l'impact du S sur la végétation des prairies, notamment sur sa production, la plupart d'entre elles a concerné des systèmes simplifiés, ou n'ont pas détaillé l'ensemble du cortège floristique. De plus, nombre d'entre-elles ont considéré des niveaux de fertilisation N et S élevés, employant par exemple jusqu'à 480 kg ha<sup>-1</sup> d'N en Irlande (Murphy & Quirke 1997) et 120 kg ha<sup>-1</sup> de S en Nouvelle Zélande (Morton *et al.* 1998). Cependant ces doses sont très éloignées de celles pratiquées en prairies tempérées de l'Europe de l'Ouest. De plus, pour les quelques études qui ont considéré un double gradient de fertilisation N/S, ce qui nous apparaît fondamental à la vue du lien étroit entre métabolisme azoté et métabolisme soufré, peu ont envisagé les mécanismes à l'origine des dynamiques observées.

Partant de ces constats, l'objectif général de mon projet de thèse est de **déterminer l'impact, à court terme, d'un double gradient N : S sur la structure et le fonctionnement de communautés végétales modèles de prairies bas-normandes**. Le projet de cette thèse s'est organisé autour d'un ensemble d'hypothèses, issues de l'analyse bibliographique, à tester pour les modèles considérés :

- (1) le S augmente la production de matière sèche,
- (2) l'effet du S dépend de l'espèce considérée,
- (3) l'effet du S varie en fonction du niveau de fertilité azotée du sol,
- (4) les effets du S varient en fonction de la situation de voisinage,
- (5) le S module les mécanismes écophysologiques impliqués (efficacité d'absorption et d'utilisation des nutriments, mise en réserve) dans les interactions spécifiques des espèces, ceci en relation avec l'N,
- (6) l'abondance relative des espèces et donc la structure d'une communauté dépend en partie du ratio N : S du sol,
- (7) le S, dans un milieu riche en N, joue un rôle majeur dans l'occurrence des Fabacées au sein de la communauté,
- (8) le S, en milieu eutrophique, maintient voire augmente la diversité (végétale et fonctionnelle).

Afin de tester ce groupe d'hypothèses, nous avons choisi **3 échelles d'études** : l'échelle de la **population** *via* la culture en mésocosme de 4 espèces clés des prairies tempérées de l'Europe de l'Ouest soit 3 Poacées et une Fabacée, l'échelle de la **communauté** *via* l'étude de communautés modèles cultivée **en mésocosme**, et l'échelle de l'**écosystème**

abordée *via* l'étude de prairies bas-normandes *in situ*. Les prairies permanentes représentent 48,7 % de la Surface Agricole Utile en Basse-Normandie, et les prairies semées 8,7 % dont 35% correspondent à l'association ray-grass anglais/trèfle blanc. Du fait de l'importance de ces deux types de prairies en Basse-Normandie, elles seront considérées à la fois *in situ* et en mésocosmes.

**L'approche expérimentale en mésocosme** donne accès à une plus grande maîtrise des facteurs abiotiques, notamment un sol pauvre en matière organique, et permet de simplifier les systèmes de cultures et donc les interactions biotiques par la réalisation de communautés modèles. L'analyse plus fine de différents traits morphologiques et écophysiologiques, dans ces conditions contrôlées, doit permettre de mieux cerner les réponses individuelles des espèces à la nutrition N/S et leurs implications sur les interactions interspécifiques. Cette échelle d'étude permet l'utilisation d'isotopes stables, difficile *in situ*. Le marquage des cultures au  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  permet de tracer le devenir des engrais appliqués en début d'expérimentation au sein d'une communauté modèle et ainsi d'évaluer le potentiel d'acquisition des ressources minérales de chacune des espèces, expliquant partiellement le résultat des interactions spécifiques.

**L'expérimentation réalisée *in situ***, a pour objectif de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en mésocosme sur des communautés végétales plus complexes et en conditions naturelles.

## ***MATÉRIELS ET MÉTHODES***

# Plan du matériels & méthodes

## **I. Expérimentation *in situ***

### A. Dispositif expérimental

*A.1 Caractérisation générale du site d'étude*

*A.2 Le climat*

*A.3 Les parcelles étudiées*

*A.4 Protocole de fertilisation*

### B. Analyse de la dynamique des communautés

*B.1 Production de matière sèche*

*B.2 Composition floristique*

## **II. Expérimentation en mésocosme**

### A. Dispositif expérimental

*A.1 Les espèces modèles*

*A.2 Modèles de cultures*

*A.3 Sélection et préparation du sol*

*A.4 Mise en place des cultures – Conditions de culture*

*A.4.1 Préparation des pots de culture*

*A.4.2 Implantation des cultures*

*A.4.3 Conditions de culture*

*A.5 Protocole de fertilisation*

### B. Méthodes analytiques

*B.1 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits morphologiques des espèces*

*B.2 Incidence du ratio N : S du sol sur la compétitivité des espèces*

*B.2.1 Capacités compétitives de *L. perenne* et *T. repens* semés en association*

*B.2.2 Capacités compétitives au sein de la communauté 4 espèces*

*B.3 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits écophysiologicals des espèces*

*B.3.1 Quantification de l'N total, du S total et mesure de l'N et du S dérivés de la fertilisation*

*B.3.2 Analyse des protéines solubles des stolons de *Trifolium repens**

## **III. Analyses statistiques des données**

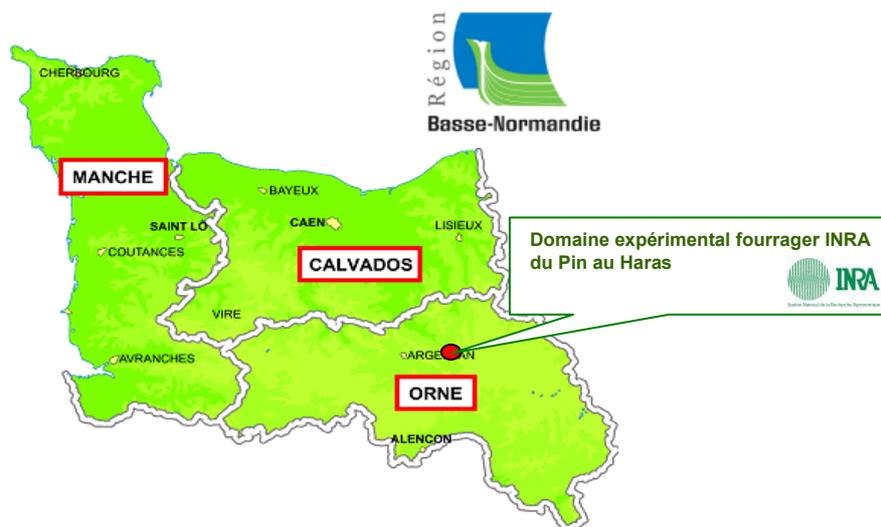


Figure 24 : Situation Géographique du site d'étude.

Tableau 8 : Propriétés du sol du domaine expérimental fourrager INRA du Pin au Haras (Orne) et utilisé pour les 3 séries de culture.

Profondeur (en cm)	Argiles (en % MS)	Limons (en % MS)	Sable (en % MS)	Matière organique (en % MS)	Azote (en %MS)	C / N	pH eau	Phosphate (en ppm)	Potasse (en ppm)	C.E.C. (en ppm)	Taux de saturation (en %)
0-10	10,3	58,4	31,3	6,28	4,66	7,83	5,9	0,42	0,259	17,0	88
10-20	36,7	41,3	22,0	4,20	3,18	7,67	6,1	0,20	0,179	30,9	41

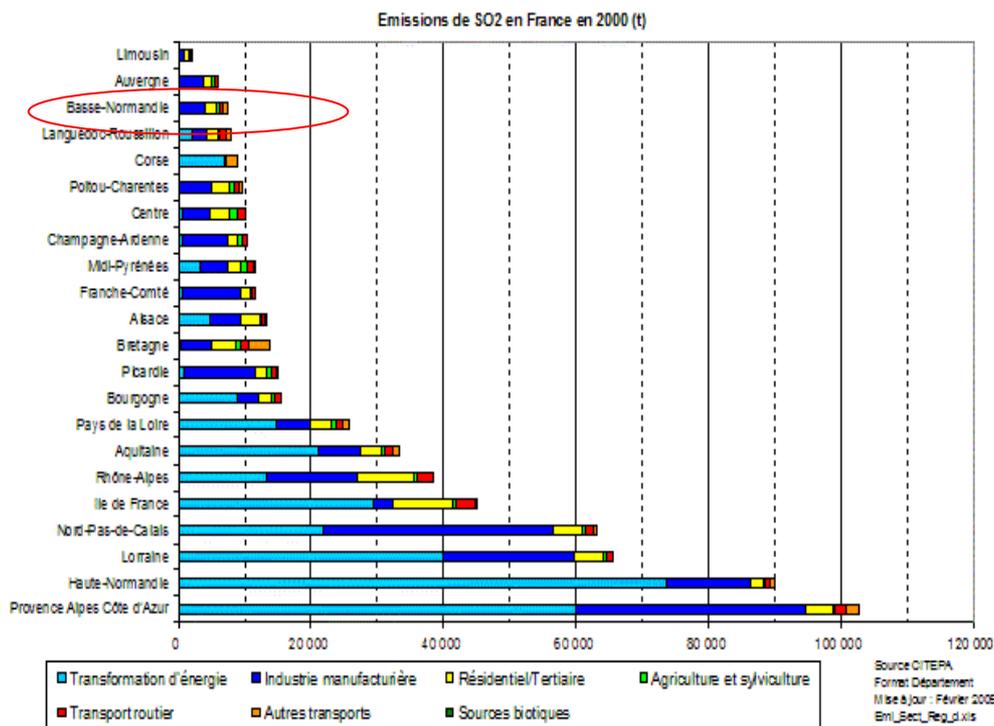


Figure 25 : Émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère de chaque région en France métropolitaine (d'après le ministère de l'Industrie, données 2005).

---

## MATÉRIELS & MÉTHODES

---

### **I. Expérimentations *in situ***

L'expérimentation *in situ* a consisté en la mise en place de deux dispositifs expérimentaux, l'un dans une prairie naturelle, et l'autre dans une prairie artificielle ray-grass/trèfle, suivis sur 2 ans. Ces dispositifs avaient pour objectif de caractériser les modifications à court terme de la composition et de la structure de communautés végétales le long d'un double gradient de fertilisation N/S. Cette dynamique a été suivie en termes d'abondance relative des espèces et de productivité.

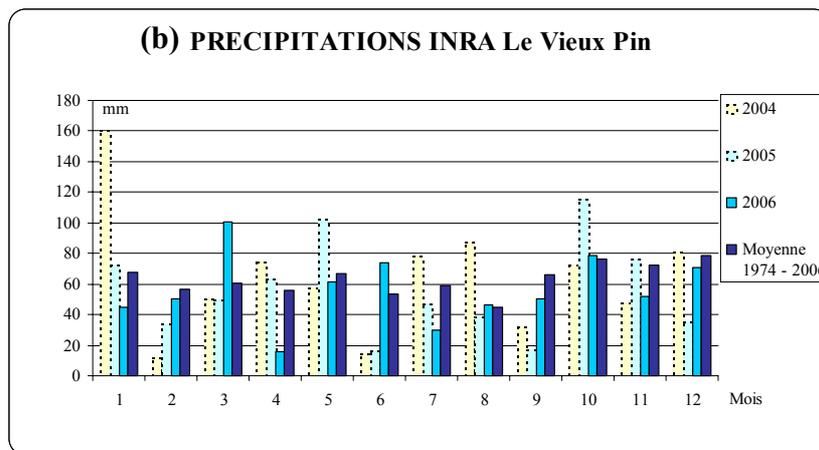
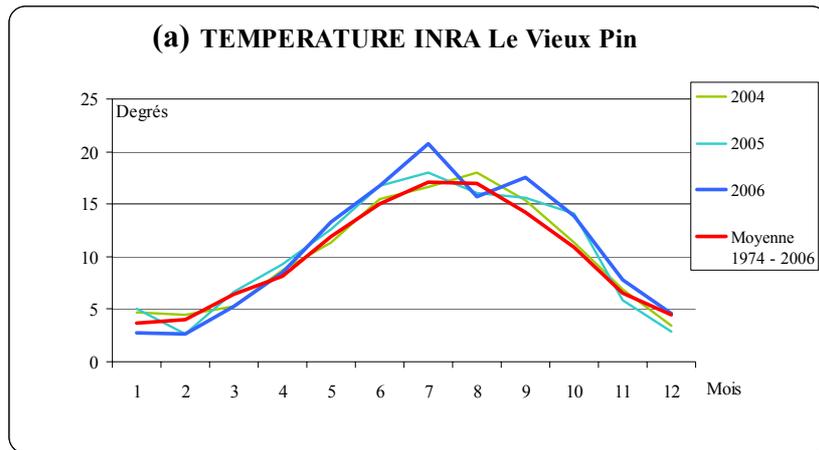
#### A. Dispositifs expérimentaux

##### *A.1 Caractérisation générale du site d'étude*

Cette étude a été réalisée au sein du domaine expérimental fourrager INRA du Pin au Haras, "le Vieux Pin", situé dans l'Orne (61) en Basse-Normandie (**Figure 24** ; 54°19'N, 0°14'W, France). Le paysage de cette région se caractérise par un réseau de haies dense intégrant principalement des prairies naturelles utilisées pour le pâturage ou la production de foin. Les prairies et cultures fourragères de cette région existent depuis l'implantation des Haras nationaux datant des années 1770, autrement dit depuis plus de 3 siècles.

Le domaine du Vieux Pin comprend plusieurs parcelles réparties sur 80 hectares (**Annexe 2**). Son sol repose sur de l'argile à silex. C'est un sol brun, limono-argileux, riche en matière organique. Les propriétés chimiques du sol des parcelles étudiées sont détaillées dans le **Tableau 8**. Ce sol ne présente pas de traces d'hydromorphie jusqu'à 20 cm de profondeur mais révèle ensuite des traces d'oxydation, voire des amorces ponctuelles de gleyfication à partir de 30 cm (petites marbrures grisées).

Situé à 205 m d'altitude, ce site constitue un bon modèle d'étude, de part sa situation géographique, l'ancienneté de ses prairies et le taux de matière organique de ses sols. Cette région fait en effet partie des trois de France où les émissions atmosphériques de SO<sub>2</sub> sont les plus faibles (**Figure 25**). Elle est soumise à des vents d'ouest provenant d'une région



**Figure 26** : Données météorologiques mensuelles moyennes des années 2003 à 2006 du domaine expérimental fourrager INRA du Pin au Haras (Orne) : **(a)**, température et **(b)**, précipitations.

(Bretagne) où ces émissions sont également réduites (**Figure 25**). La prairie naturelle sélectionnée est une communauté âgée de plus de 50 ans, ce qui confère à son sol un niveau de matière organique carbonée élevé, favorisant ainsi l'immobilisation du S en sulfures de carbones qui, comme nous l'avons vu précédemment, constituent une réserve de S plus difficilement accessible et disponible dans le temps.

### A.2 Le climat

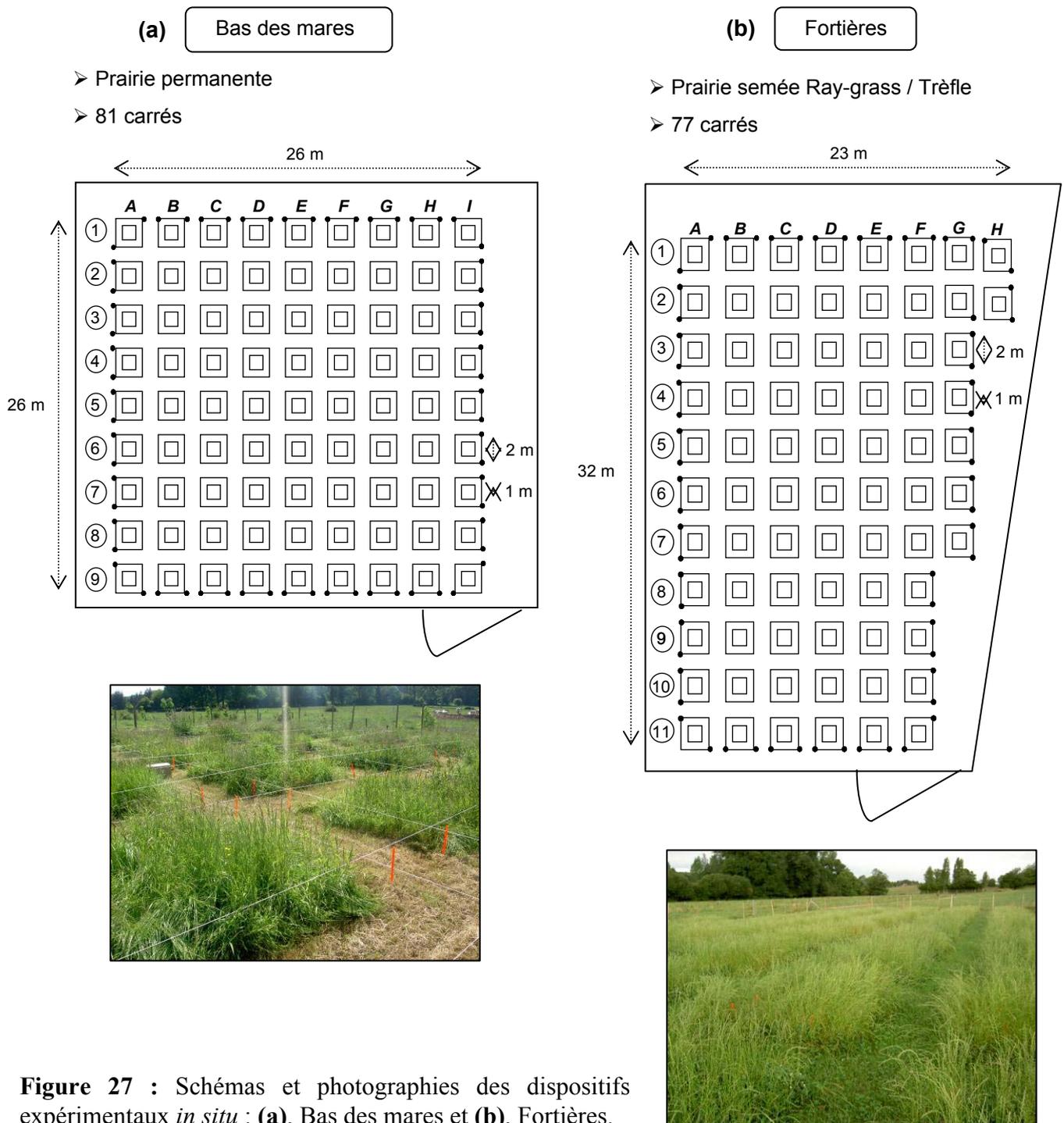
Ce site bénéficie d'un climat de type océanique, c'est-à-dire tempéré, relativement frais, avec une faible amplitude thermique annuelle et humide, avec un morcellement des pluies tout au long de l'année. La pluviométrie moyenne annuelle, mesurée sur 30 ans, avoisine les 760 mm (**Figure 26**). Notre étude s'est déroulée sur 2 années, 2005 et 2006. La station météorologique du Vieux Pin relève un total d'environ 668 et 674 mm de précipitations en 2005 et 2006 respectivement (**Figure 26a**).

La moyenne des températures sur 30 ans révèle un maximum de 17.1°C atteint en juin et un minimum de 3.7 °C atteint en janvier (**Figure 26b**). La température moyenne mensuelle maximale atteinte fut 20.8°C en juillet 2006, tandis que la température minimale fut 2.6°C en février 2005 et 2006 (**Figure 26b**).

### A.3 Les parcelles étudiées

**La prairie artificielle**, nommée "Fortières", est une parcelle qui était intégrée dans une rotation culturale alternant 1 à 2 ans de culture de maïs avec 3 à 5 ans de prairie temporaire. En août 2004, la parcelle a été traitée à l'aide d'un désherbant total non rémanent (round up) à 3 litres ha<sup>-1</sup> pour y semer en septembre 2004, 25 kg ha<sup>-1</sup> d'un mélange ray-grass anglais/trèfle blanc comprenant 14 kg ha<sup>-1</sup> de *L. perenne* L. var. Pastoral, 8.25 kg ha<sup>-1</sup> de *L. perenne* L. var. Barmilka et 2.75 kg ha<sup>-1</sup> de *T. repens* L. var. Alice. Les graines ont été réparties à l'aide d'un semoir les enterrant à environ 1 cm de profondeur en rangs espacés d'environ 13 cm. Au sein de cette prairie semée, nous avons délimitée une parcelle expérimentale d'une surface d'environ 700 m<sup>2</sup>.

**La prairie permanente**, nommée "Bas des Mares", a été implantée il y a plus de 50 ans. Cette prairie n'a pas été fertilisée entre 1950, année de l'implantation du domaine fourrager, et 2001. En 2002 et 2003, 50 kg ha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup> d'N ont été apportés sous forme de nitrate d'ammonium. C'est une prairie méso-hygrophile mésotrophe, se rattachant au *Lolio* –



*Cynosuretum cristati* Tx. 1937, sous association *ranunculetosum repentis*, telle que décrite dans le bocage virois par De Foucault (1980). Les espèces dominant la communauté végétale sont *Holcus lanatus* (houlque laineuse), *Alopecurus geniculatus* (vulpin genouillé), *Agrostis capillaris* (agrostide commune) et *Lolium perenne* (ray-grass anglais). Les espèces interstitielles les plus fréquentes sont *Phleum pratense* (fléole des prés), *Poa pratensis* & *trivialis* (pâturins des prés et commun), *Trifolium repens* (trèfle blanc), *Ranunculus repens* (renoncule rampante) et *Rumex crispus* & *obtusifolius* (grandes oseilles). Au sein de cette prairie pâturée, un exclos a été mis en place à l'automne 2003. L'année 2004 a été consacrée à la transition de gestion pâture – fauche. Le rythme de fauche en 2004 a été identique à celui mis en œuvre ensuite dans notre protocole expérimental, soit 3 fauches annuelles en juin, fin juillet et fin septembre - début octobre. La surface de la parcelle expérimentale (exclos) mise en place dans cette prairie est d'environ 700 m<sup>2</sup>.

Les dosages de nitrate, d'ammonium et de sulfate réalisés au préalable en 2003 sur les parcelles du domaine INRA du Vieux Pin ont permis de sélectionner ces deux prairies. Leur sol présentait en effet les teneurs en nitrate et en sulfate les plus faibles du domaine rendant ces parcelles les plus appropriées pour appréhender les effets d'un double gradient de fertilisation.

#### A.4 Protocole de fertilisation

Chaque parcelle expérimentale a été subdivisée en placettes de 4 m<sup>2</sup> séparées par des allées de 1 m de large (**Figure 27**), obtenant ainsi 77 carrés pour les Fortières et 81 pour le Bas des Mares. Sur ces placettes, afin de tester l'effet de la disponibilité en S et l'effet combiné de la disponibilité en N, différents niveaux de fertilisation N et S ont été testés :

**Cinq modalités d'apport de S** sous forme de gypse ( $\text{CaSO}_4$ ) ont tout d'abord été testées. Quatre ont consisté en une application annuelle unique (début printemps) : 0 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>, 15 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> correspondant au niveau de fertilisation des prairies et cultures fourragères couramment réalisée en Nouvelle-Zélande (Morton *et al.* 1999), 30 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> correspondant à un niveau médian et 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> correspondant au niveau de fertilisation préconisé pour les cultures exigeantes en S comme le colza (Merrien *et al.* 1999). La dernière modalité a consisté à apporter 20 kg ha<sup>-1</sup> de S en début de saison puis après les fauches de printemps et d'été, soit au total 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>. Nous avons choisi le gypse car c'est un fertilisant rapidement mis à disposition des végétaux (cf. analyse bibliographique).

Enfin, nous avons testé, en prairie permanente uniquement, une autre forme d'engrais soufré, le S élémentaire (S°) que nous avons appliqué en une seule fois (début printemps) à 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>. Ce type d'engrais soufré, nécessitant une oxydation, est mis à disposition beaucoup plus lentement que le gypse (cf. analyse bibliographique).

**Trois niveaux d'N** ont été appliqués en 3 fois (début printemps et après les fauches de printemps et d'été) sous forme de nitrate d'ammonium (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) : 0 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>, 50 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (fertilisation basse) correspondant à la fertilisation moyenne des prairies naturelles normandes et 180 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (fertilisation haute) correspondant au niveau de fertilisation développée localement en prairie semée intensive (Diquélou *et al.* 2003).

La combinaison de ces niveaux de fertilisation ((3 niveaux N × 5 niveaux S) + S°) donne un total de **15 traitements** pour la prairie semée **et 16** pour la prairie permanente. Chacun des traitements a fait l'objet de **5 répétitions**. Nous les avons répartis à travers les placettes selon la méthode des carrés latins, c'est-à-dire qu'un même traitement ne doit être présent qu'une seule fois sur une même ligne ou colonne.

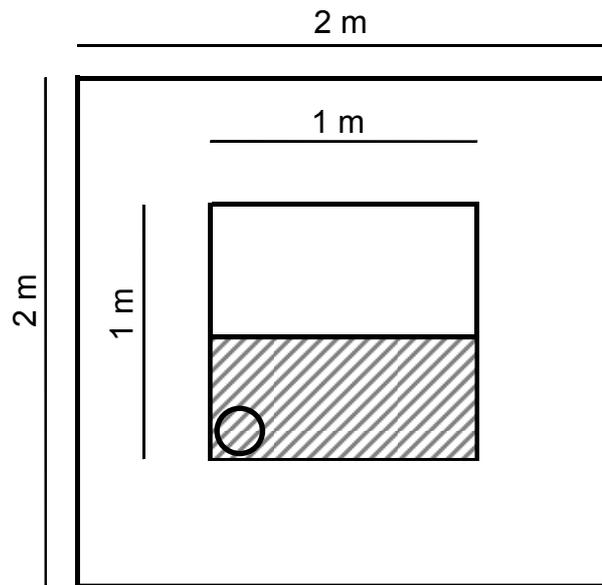
Afin d'éviter des phénomènes liés à des carences en P et/ou en K, une fertilisation de fond a été effectuée sous forme de Super Phospho-Potassique (SSP 0-13-18) : 150 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de P sous forme de phosphate d'anhydride phosphorique (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) et 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de K sous forme d'oxyde de potassium (K<sub>2</sub>O) ont été apportés (soit la fertilisation moyenne des prairies naturelles fertilisées localement).

## B. Analyse de la dynamique des communautés

Pour l'analyse des communautés, seul le m<sup>2</sup> central de chaque placette a été échantillonné, afin de s'affranchir des effets bordures en marge d'allée, tondu régulièrement et non fertilisée.

### *B.1 Production de matière sèche*

Afin d'étudier l'incidence des différents ratios N : S sur la production globale de chacune des placettes, 3 récoltes annuelles ont été effectuées entre juin (période habituelle de récolte des foins de printemps) et octobre (regains estivaux et automnaux), selon le stade phénologique, le niveau de repousse de la végétation et les conditions climatiques. Ces



**Figure 28** : Schéma du carré central de 1m<sup>2</sup> dans lequel, ○ l'échantillon trié est prélevé puis, ▨ la biomasse totale récoltée.



**Figure 29** : Photographies de (a) la serre INRA à l'Université de Caen où a été mis en place (b) le dispositif expérimental en mésocosme.

récoltes ont consisté à faucher la biomasse aérienne à une hauteur de 5 cm au dessus de la surface du sol. Seule une moitié du 1 m<sup>2</sup> central a été récoltée, l'autre moitié étant dévolue à d'autres études (**Figure 28**). La biomasse, récoltée et séchée dans une étuve à 65°C durant 48 heures, a ensuite été pesée.

## B.2 Composition floristique

Durant les deux années, nous avons étudié la dynamique des communautés en mesurant l'abondance relative des espèces présentes lors de la fauche de printemps. Nous avons procédé à deux échelles. Pour estimer l'abondance relative des différentes Poacées, un échantillon représentatif du m<sup>2</sup> central a été prélevé dans un cercle de 20 cm de diamètre (**Figure 28**). Le positionnement de ce cercle est resté identique au cours des différentes années de notre suivi. Les échantillons prélevés ont fait l'objet d'un tri par espèce et par genre quand la détermination se révélait difficile. Pour estimer l'abondance relative des autres espèces, nous les avons triées par taxon sur l'ensemble du ½ m<sup>2</sup> échantillonné pour l'estimation de la production de matière sèche. La biomasse relative de chaque taxon a alors été estimée après séchage à 65°C durant 48 heures.

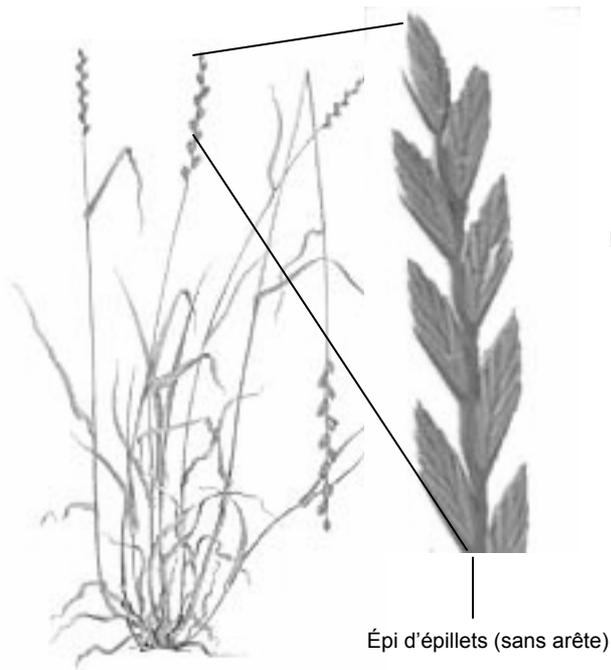
## II. Expérimentations en mésocosme

A cette échelle (**Figure 29**), l'étude a consisté à tester en conditions contrôlées et sur des modèles simplifiés mais représentatifs des 2 situations envisagées *in situ* (prairie permanente et prairie temporaire ray-grass anglais/trèfle blanc) les 8 hypothèses que nous avons émises.

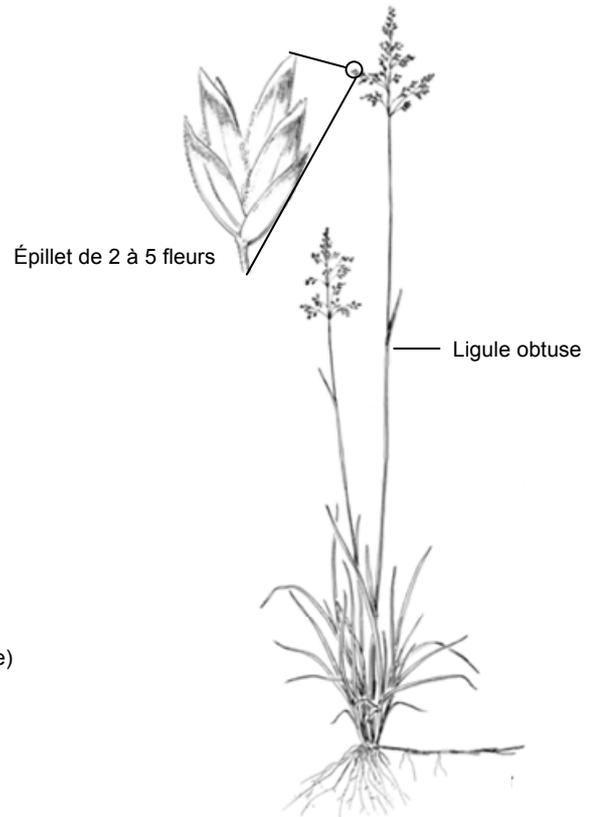
### A. Dispositifs expérimentaux

#### A.1 Les espèces modèles

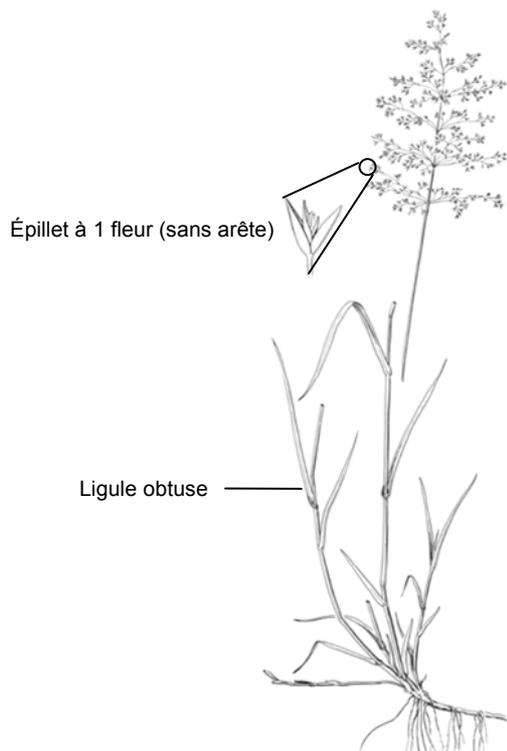
Les espèces modèles étudiées sont : *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Poa pratensis* et *Agrostis capillaris*. Le choix de ces espèces est justifié par le fait qu'elles coexistent et sont représentées par de fortes fréquence et abondance au sein des prairies. Elles sont néanmoins caractérisées par des optimums trophiques différents (milieu méso-



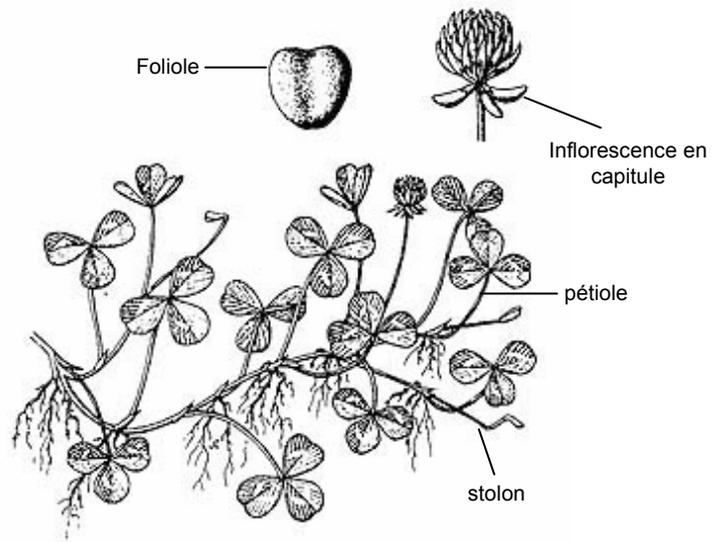
(a) *Lolium perenne* L.



(b) *Poa pratensis* L.



(c) *Agrostis capillaris* L.



(d) *Trifolium repens* L.

**Figure 30** : Présentation des 4 modèles biologiques étudiés.

oligotrophe à méso-eutrophe) et font parti de groupes fonctionnels différents (fixatrice et non fixatrices d' $N_2$ ). Les 3 premières proviennent de semences commerciales. La dernière est issue de graines récoltées sur le terrain (Arbiotech®). Nous avons choisi, dans la mesure du possible, de travailler sur des variétés commerciales afin de limiter la variabilité génétique. Cependant, aucune variété commerciale fourragère d'*A. capillaris* n'est disponible, toutes les variétés commercialisées étant destinées aux gazons et sélectionnées pour une croissance modérée et lente.

- *Lolium perenne* L., var. Bravo (ray-grass anglais)

Très fréquent dans les prairies naturelles, le ray-grass anglais (**Figure 30a**) est la Poacée pérenne la plus cultivée dans les régions tempérées de plaine ; elle se retrouve en abondance dans l'ouest de l'Europe. En plus de sa bonne adaptation à la défoliation, le ray-grass anglais donne un tapis végétal dense et possède une grande tolérance au piétinement. Sa reproduction naturelle est surtout végétative. Qualifiée d'excellente espèce fourragère, elle est reconnue pour sa bonne valeur alimentaire (Bourgoin 1995). Son optimum écologique correspond aux sols riches, de pH proche de la neutralité et possédant de bonnes réserves en eau. Ne supportant ni la sécheresse ni la submersion prolongée, c'est une espèce typique qualifiée de mésophile, de milieux méso-eutrophes. La variété Bravo, au moment des expérimentations, était l'une de celles majoritairement commercialisées et employées par les agriculteurs pour les cultures fourragères. Cette variété est semi-tardive à feuilles moyennes mais de bonne productivité.

- *Poa pratensis* L., var. Baronie (pâturin des prés)

Le pâturin des prés (**Figure 30b**) est une Poacée commune des prairies naturelles mésophiles. Plus abondante dans les prairies de niveau d'intensification médian, elle supporte bien la coupe et le piétinement ; elle est qualifiée de moyenne à bonne fourragère mais de "faiblement productive". Elle est l'un des constituant majeur des prairies des grandes plaines d'Amérique du Nord, connue sous le nom de Kentucky blue grass. Typique des climats atlantique et continental tempéré de plaine, elle préfère les sols sableux, limoneux, quel que soit leur pH. Elle exige des sols bien drainés. Elle peut être qualifiée de mésophile de milieux mésotrophes. Pérenne à durée de vie courte, elle se reproduit par multiplication végétative (rhizomes) et par graines. Depuis peu, cette espèce est cultivée, incorporée aux mélanges de graines de Poacées, pour permettre de "fermer" la prairie. La variété Baronie est une des rares



*Lolium perenne*



*Trifolium repens*



*Poa pratensis*



*Agrostis capillaris*

CULTURES PURES



Communauté 4  
espèces



Culture associée  
*L. perenne* / *T. repens*

**Figure 31** : Présentation des types de cultures.

variétés commercialisées en France, tant pour les prairies que pour les gazons. C'est une variété de taille moyenne, possédant de longues feuilles.

- *Agrostis capillaris* L. (agrostide commune)

L'agrostide commune (**Figure 30c**) est également une Poacée commune des prairies mésophiles des climats atlantique et continental tempéré de plaine. Elle est rencontrée sur des sols très variés, sableux à argileux, mais de préférence acides (pH =5,6) et oligotrophes. Elle résiste à la sécheresse du substrat. Espèce fourragère qualifiée de médiocre, mais assez productive, elle n'est pas cultivée. Pérenne à durée de vie longue, elle se reproduit par multiplication végétative (rhizomes) et, plus secondairement, par graines.

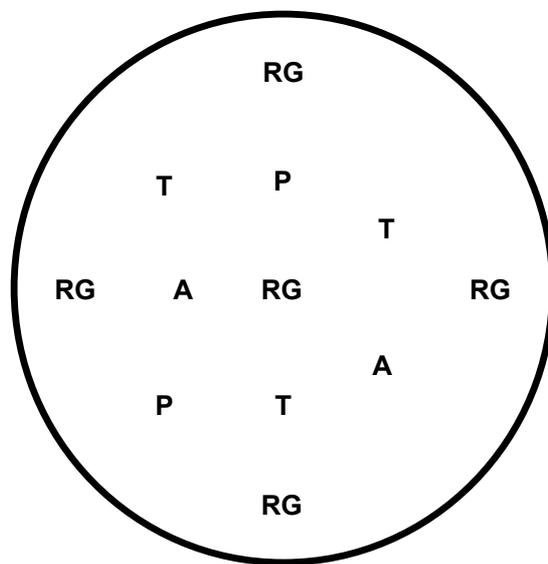
- *Trifolium repens* L., var. Huia (trèfle blanc)

Le trèfle blanc (**Figure 30d**) est la Fabacée la plus fréquente dans les prairies naturelles des régions tempérées, d'Europe du Nord, d'Amérique du Sud et de Nouvelle - Zélande. C'est une excellente plante fourragère qui résiste très bien au piétinement. Elle est également l'une des espèces les plus semées en prairie mésophile tempérée. Son optimum écologique correspond aux sols mésotrophes à eutrophes, avec de bons niveaux en P, K et S, de bonnes réserves en eau et un pH supérieur à 4,5. Espèce pérenne rampante, elle se reproduit par multiplication végétative (stolons) et, plus secondairement, par graines. La variété Huia, originaire de Nouvelle - Zélande, était l'une des variétés les plus employées en culture fourragère pure ou en association et pour l'implantation des prairies ; elle représentait en 1995 35 à 40 % des ventes mondiales de semences de trèfle (Mather *et al.* 1996). C'est une variété à feuilles moyennes, stolons moyens bien ramifiés et à floraison semi-tardive.

## A.2 Modèles de cultures

Trois modèles de cultures ont été retenus et répartis selon 3 séries (**Figure 31**) ; la densité de plantation par pot est conservée pour chaque série :

- **série 1** : cette série comprend des cultures en population de ray-grass anglais, de pâturin des prés, d'agrostide commune et de trèfle blanc.
- **série 2** : cette série comprend des cultures associées ray-grass anglais / trèfle blanc. Nous avons choisi de semer ces espèces en proportions identiques. Ce modèle correspond à la prairie artificielle semée ray-grass / trèfle.



**Figure 32 :** Schéma de la disposition des plants des différentes espèces : RG, ray-grass; P, pâturin; A, agrostide; T, trèfle.

- **série 3** : cette dernière série concerne les cultures en communauté 4 espèces. La culture est respectivement composée de 5 plants pour le ray-grass anglais, 2 plants pour l'agrostide commune, 2 plants pour le pâturin des prés et 3 plants pour le trèfle blanc. La disposition des plants est représentée sur la **Figure 32**. Cette série modélise les prairies naturelles mésophiles d'Europe de l'ouest.

### *A.3 Sélection et préparation du sol*

Nous avons choisi de travailler sur sol afin de se rapprocher au maximum des conditions naturelles, conservant ainsi des interactions sol-plante, un développement de la rhizosphère et une modulation de la mise à disposition des éléments nutritifs proche de ceux existant *in situ*. Le sol utilisé provient de la prairie permanente expérimentée du "Bas des mares". Il a fallu faire un choix sur la profondeur du sol à prélever. Mon stage de DEA a fait l'objet d'un test pour ce choix. À cette occasion, nous avons prélevé le sol de surface (10 premiers cm). L'expérimentation réalisée a mis en évidence l'absence d'effet des traitements appliqués, même sur des espèces sensibles à l'apport d'N. Ce sol de surface est en fait trop riche en matière organique (source potentielle d'une importante minéralisation après conditionnement en mésocosme). Les problèmes techniques rencontrés en DEA ont été corrigés. Cette hypothèse s'est trouvée validée lors des expérimentations menées en 1<sup>ère</sup> année de thèse où cette fois le type de sol prélevé (plus profond et pauvre en matière organique) n'a pas masqué les effets des fertilisations appliquées.

Nous avons alors prélevé un sol plus profond (10 à 25 cm) et plus pauvre en matière organique. L'analyse de sol révèle des teneurs moyennes en N et P et faibles en S (**Tableau 8**). La terre a été tamisée à 2 mm afin d'obtenir une structure homogène et d'éliminer les éléments grossiers et racines. Une partie de cette terre est passée à l'autoclave humide à 120°C, deux fois une demi-heure, pour être stérilisée (élimination des banques de graines : cf. mise en place des cultures).

### *A.4 Mise en place des cultures – Conditions de culture*

#### ***A.4.1 Préparation des pots de culture***

Les cultures en population et la culture associée ray-grass / trèfle sont réalisées dans des pots en PVC tronc – coniques de 1755 cm<sup>3</sup> (hauteur 15.5 cm, diamètre sommital 14 cm,

diamètre basal 10.5 cm ; **Figure 31**). Les communautés 4 espèces, nécessitant des pots plus grands afin d'obtenir une structure et une composition spécifique représentative des prairies naturelles, sont réalisées dans des pots de 3800 cm<sup>3</sup> (hauteur 19.5 cm, diamètre sommital 18 cm, diamètre basal 13.5 cm ; **Figure 31**).

Les pots sont remplis avec la terre tamisée de manière à obtenir une densité de 1, soit la densité mesurée *in situ* à la profondeur de récolte. Le sol est apporté progressivement et compacté manuellement pour obtenir la densité fixée. Les 2 premier centimètres de surface sont composés de terre stérilisée afin d'éviter la germination d'espèces non désirées (élimination de la banque de graines utile). L'humidité du sol est portée à 25 % (humidité relative au poids frais), par apport d'eau osmosée.

#### ***A.4.2 Implantation des cultures***

Les graines ont été mises à germer à l'obscurité sur de la perlite en suspension sur de l'eau osmosée durant 2 à 5 jours. Le même jour, dans chaque pot, nous avons transplanté toutes les plantules au stade première feuille vraie, en plaçant leurs racines dans de fins trous. Les pots ont ensuite été placés en serre. Quelques jours après le repiquage du trèfle, ses racines ont été inoculées par une souche efficiente de *Rhizobium trifolii* (T354) fournie par le laboratoire de microbiologie des sols de l'INRA de Dijon. Cette bactérie, en entrant au contact du système racinaire, permet la mise en place de l'association symbiotique responsable de la fixation de l'N<sub>2</sub>.

#### ***A.4.3 Conditions de culture***

En serre, la photopériode a été de 16 heures jour / 8 heures nuit, avec des températures de 20°C et 16°C respectivement. Les plantes ont reçu un éclairage artificiel complémentaire dispensé par des lampes à sodium haute pression (valeur moyenne du PAR à 5 cm au-dessus de la terre des pots : 300 à 400  $\mu\text{mol photon s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Une fois les traitements mis en place, chaque pot a été pesé afin de pouvoir les maintenir à humidité constante (25 %), en rajoutant toutes les 48 heures la quantité d'eau manquante. À chaque manipulation, les pots ont été aléatoirement changés de position afin d'éviter des effets "emplacement".

**Tableau 9** : Récapitulatif des différentes quantités de S, N, K et P appliqués aux séries de culture.

**Traitements soufrés variables**

Traitement S (Kg Ha <sup>-1</sup> )	30		15	
Série(s) de culture	1 et 2	3	1 et 2	3
<b>mg S Pot<sup>-1</sup></b>	<b>46</b>	<b>76</b>	<b>23</b>	<b>38</b>
mg CaSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> Pot <sup>-1</sup>	248	408	124	204

**Traitements azotés variables**

Traitement N (Kg Ha <sup>-1</sup> )	180		50	
Série(s) de culture	1 et 2	3	1 et 2	3
<b>mg N Pot<sup>-1</sup></b>	<b>277</b>	<b>458</b>	<b>77.0</b>	<b>127</b>
mg NH <sub>4</sub> /NO <sub>3</sub> Pot <sup>-1</sup>	792	1309	220	364

**Traitements appliqués à tous les pots**

Traitements K / P (Kg Ha <sup>-1</sup> )	150 / 60	
Série(s) de culture	1 et 2	3
<b>mg P Pot<sup>-1</sup></b>	<b>92</b>	<b>153</b>
<b>mg K Pot<sup>-1</sup></b>	<b>231</b>	<b>382</b>
mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Pot <sup>-1</sup>	516.0	854

### A.5 Protocole de fertilisation

**Trois niveaux de fertilisation S** ont été sélectionnés, similaires à ceux employés dans l'expérimentation *in situ* (0, 15 et 30 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>), et combinés à **3 niveaux de fertilisation N** (0, 50 et 180 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>). Pour cette expérimentation en serre, le niveau de fertilisation soufré 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> a été supprimé afin de simplifier le dispositif expérimental.

La combinaison de tous ces niveaux de fertilisation (3 niveaux N × 3 niveaux S) donne un total de **9 traitements**. Pour chaque série de culture et pour chaque croisement N × S, 4 répétitions ont été réalisées.

Pour ne pas risquer d'observer des phénomènes liés à une carence en P ou en K, une fertilisation de fond de 60 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de P et 150 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de K a été systématiquement apportée.

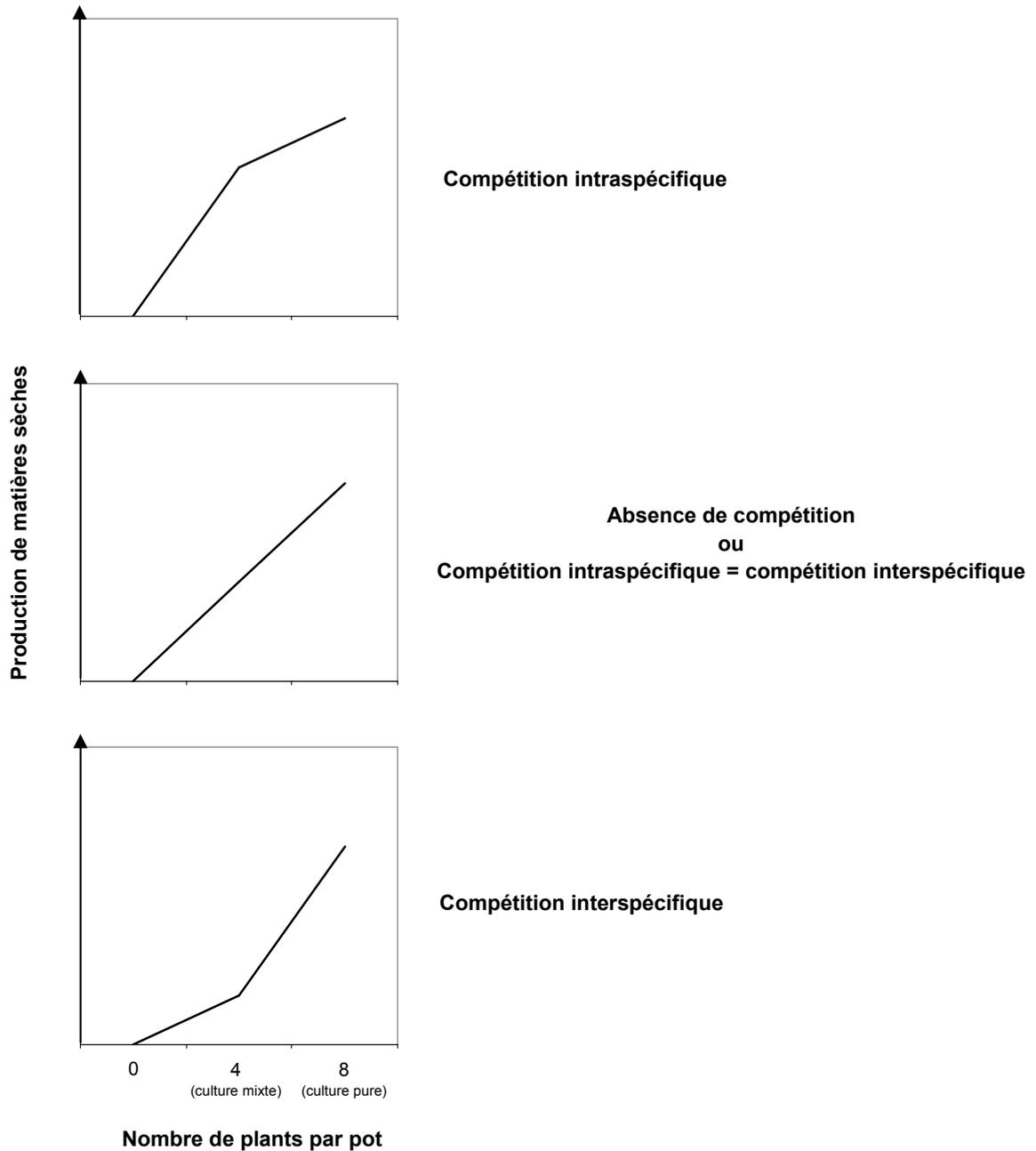
Nous avons réalisé la fertilisation à l'aide de solutions nutritives composées de CaSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (marqué au <sup>34</sup>S avec un excès isotopique de 1 % pour la série de cultures n°3 uniquement), de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (marqué au <sup>15</sup>N avec un excès isotopique de 5 %) et de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Les pots n'ayant pas reçu de traitement soufré, ont bénéficié de l'application de CaCl<sub>2</sub> afin de ne pas confondre l'effet d'une fertilisation soufrée avec celui d'une fertilisation calcique. Les quantités apportées par pot pour obtenir le niveau de fertilisation souhaité sont précisées dans le **Tableau 9**. La fertilisation a été réalisée en une fois, juste après l'implantation des cultures, **conférant aux sols différents niveaux de fertilité initiale**.

## B. Méthodes analytiques

### B.1 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits morphologiques des espèces

Les 3 séries de cultures ont été soumises à un régime de fauches (au nombre de 3 toutes les six semaines). La hauteur de coupe a été fixée à 5 cm.

Le ray-grass et le trèfle ont été, en population et en culture associée, soumis à un comptage de certains organes, précédant les 2 premières fauches. Les organes concernés sont les feuilles, les stolons pour *T. repens* et les talles pour *L. perenne*, ces deux derniers appareils végétatifs permettant d'évaluer l'intensité de la reproduction végétative des deux espèces en fonction de la disponibilité en N et en S du sol.



**Figure 33 :** Diagrammes conceptuels de série de remplacement, basés sur la production de matière sèche moyenne d'une espèce par pot schématisant, le type de compétition développée (d'après De Wit 1960).

Lors de chaque récolte, nous avons mesuré la surface foliaire (en cm<sup>2</sup>) des différentes espèces au planimètre, LI-COR, Li-3100.

Les échantillons récoltés ont ensuite été placés pendant 48 h à l'étuve à 65°C. La matière sèche a ensuite été déterminée par pesée. Nous avons mesuré les biomasses sèches aériennes des différentes espèces, précisant à la 3<sup>ème</sup> et dernière récolte les biomasses sèches de stolons de *T. repens*. Pour les séries 1 et 2, les stolons ont fait l'objet d'un aliquote de 450 mg de matière fraîche congelé à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures. À la dernière récolte, les biomasses sèches souterraines ont également été mesurées. Nous avons précautionneusement triées et séparées les racines de la terre, par égrenage progressif, afin de limiter les pertes de matériel végétal.

Pour les séries 1 et 2, le rapport entre la surface et la biomasse foliaire de *L. perenne* et de *T. repens* (S.L.A. : Specific Leaf Area) a été calculé.

## *B.2 Incidence du ratio N : S du sol sur la compétitivité des espèces*

### ***B.2.1 Capacités compétitives de *L. perenne* et *T. repens* semés en association***

Afin d'analyser l'impact de la disponibilité en N et en S sur les capacités compétitives des 2 espèces nous avons comparé les performances moyennes d'un individu en culture mixte à celles d'un individu en culture pure pour chacun des 9 traitements. L'existence de différences significatives pour les traits testés (biomasse, surface foliaire, nombre d'organes, ...) nous a permis de statuer sur la sensibilité des 2 espèces à la compétition intraspécifique (performance significativement moindre en culture pure) ou à la compétition interspécifique (performance significativement moindre en culture mixte). Afin d'illustrer de manière intuitive ces résultats, nous avons utilisé la représentation graphique proposée par De Wit (1960) pour son dispositif expérimental de série de remplacement où, comme dans notre cas, la densité en culture associée des deux espèces est la même que celle en culture pure. La forme des courbes, propre à chaque espèce, permet en effet de visualiser le type de compétition développée. Une courbe convexe indique une compétition de type intraspécifique (**Figure 33**), alors qu'une courbe concave indique une compétition de type interspécifique. Une droite indique l'absence de compétition (**Figure 33**).

### B.2.2 Capacités compétitives au sein de la communauté 4 espèces

La capacité d'une espèce à exploiter les ressources de l'environnement, constitue un facteur déterminant quant à son succès au sein d'une communauté. La performance relative de cette espèce peut se trouver modifiée le long d'un gradient trophique. Cela dépend de la réponse de l'espèce elle-même et également de celles des autres espèces voisines. C'est pourquoi, afin de comparer les réponses des espèces entre elles le long des gradients N et S, nous avons choisi d'utiliser, pour notre communauté 4 espèces, les indices développés par Austin (1982) : *RPP* (Relative Physiological Performance) et *REP* (Relative Ecological Performance). Ces indices permettent de mesurer la capacité relative d'une espèce à se développer en population (*RPP*) et en communauté (*REP*) sur un milieu donné. Le choix d'autres indices ne nous permettrait pas de prendre en compte l'ensemble de la communauté qui conditionne la compétitivité d'une espèce. La capacité relative d'une espèce est mesurée en comparant sa production à celle de l'espèce la plus productive sur ce même milieu. Ceci permet de rendre compte des capacités relatives d'une espèce à exploiter ou à tolérer un milieu par rapport aux autres espèces. La performance physiologique relative (*RPP*) et la performance écologique relative (*REP*) d'une espèce *i* sont définies comme suit :

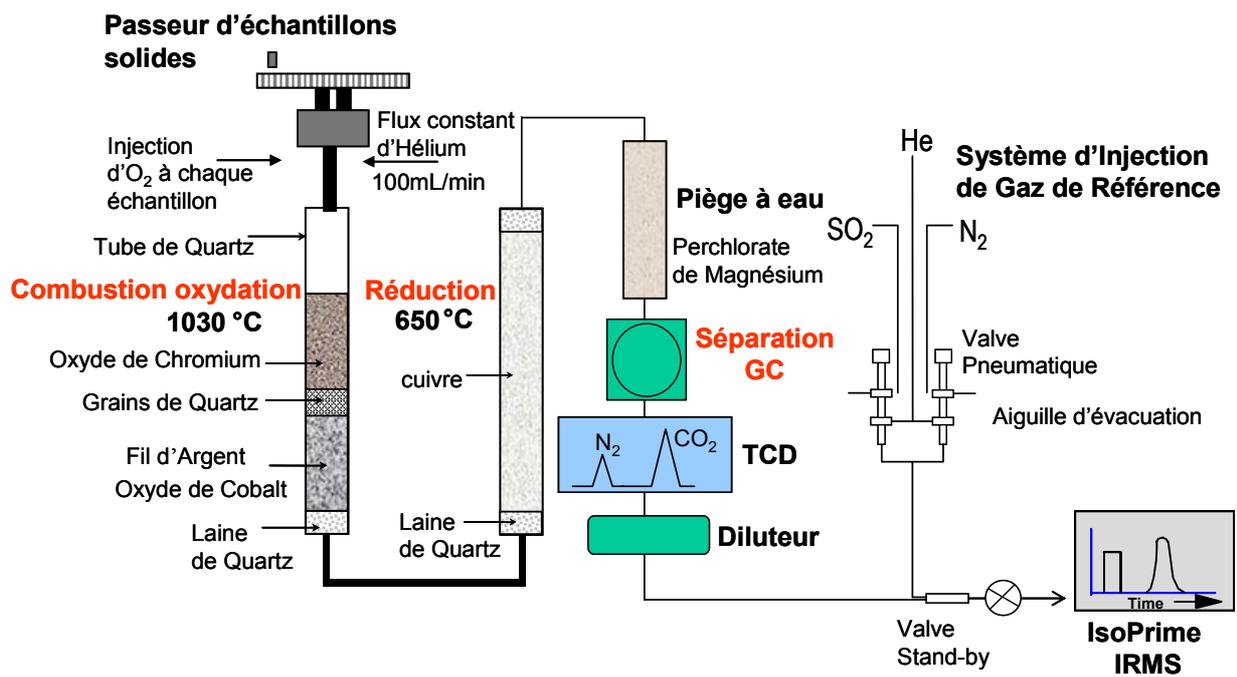
$$RPP = Bm_{ij}/Mm_j$$

où  $Bm_{ij}$  est la production de l'espèce *i* en population à un niveau trophique *j* et  $Mm_j$  est la production de l'espèce la plus productive en population, pour ce même niveau trophique *j*.

$$REP = Bx_{ij}/Mx_j$$

où  $Bx_{ij}$  est la production de l'espèce *i* en communauté à un niveau trophique *j* et  $Mx_j$  est la production de l'espèce la plus productive en communauté, pour ce même niveau trophique *j*.

Les valeurs des *RPP* et *REP* varient entre 0 et 1. La valeur croît parallèlement à l'augmentation de la performance de l'espèce *i* relative à celle de l'espèce la plus performante à un niveau trophique *j*. Un *RPP* élevé et un *REP* faible caractérisent une espèce aux capacités compétitives interspécifiques restreintes à ce niveau trophique *j*, bien que capable de l'exploiter. Inversement, la combinaison d'un *RPP* faible et d'un *REP* élevé signifie que l'espèce est très bonne compétitrice face aux autres espèces à ce niveau trophique *j*, bien que



**Figure 34** : Schéma simplifié du spectromètre de masse utilisé pour l'analyse isotopique de l'azote et du soufre d'échantillons sous forme solide.

peu apte à l'exploiter. Des *RPP* et *REP* faibles, ainsi que des *RPP* et *REP* forts signifient que l'espèce est soit mauvaise exploitatrice des ressources du milieu et subordonnée en communauté, soit une très bonne exploitatrice et compétitrice.

### *B.3 Incidence du ratio N : S du sol sur les traits écophysologiques des espèces*

#### ***B.3.1 Quantification de l'N total, du S total et mesure de l'N et du S dérivés de la fertilisation***

Afin d'appréhender les aptitudes des espèces à mobiliser les ressources du sol, et notamment l'N et le S issus des fertilisants, nous avons quantifié l'N total, le S total ainsi que l'N et le S provenant des fertilisants pour tous les échantillons des parties aériennes des séries n°1, n°2 et n°3.

##### *(a) Dosage de l'N et du S total - analyse des rapports isotopiques*

Le système utilisé pour la mesure de l'N total et du S total comprend un **analyseur élémentaire** (EA 3000, EuroVector) assurant la production d' $N_2$  ou de  $SO_2$  à partir d'échantillons solides ou liquides, couplé à un **spectromètre de masse** (IsoPrime, GV Instrument) permettant de mesurer les rapports isotopiques  $^{15}N/^{14}N$  ou  $^{34}S/^{32}S$  et de quantifier les teneurs en N et en S (**Figure 34**).

Les isotopes de l'N et du S nécessitent des colonnes différentes et ont donc été analysés séparément.

##### **Azote :**

Les échantillons sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des nacelles en étain, de façon à injecter environ 80 $\mu$ g d'N dans le spectromètre de masse. Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans un injecteur en tête de la colonne de combustion (autosampler EuroVector). Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'N moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu au niveau de la colonne d'oxydation (oxyde de chromium et oxyde de cobalt et d'argent à une température de 1030°C). Une élévation de la température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. À la sortie de la colonne d'oxydation, l'N contenu

dans l'échantillon de trouve sous forme de  $N_2$ , NO,  $NO_x$ . La réduction des oxydes d'N en  $N_2$  est alors assurée par le passage sur une colonne de cuivre à 650°C. Le piégeage de l'eau est réalisé par une colonne contenant du perchlorate de magnésium et le carbone (sous forme  $CO_2$ ) est piégé par du Carbosorb®. Enfin, un passage dans une colonne de chromatographie gazeuse à 60°C permet de regrouper les molécules d'N.

### **Soufre :**

La préparation des échantillons dans des nacelles en étain est similaire mais doit contenir environ 10µg de S seulement. Ils sont injectés dans une colonne qui assurera simultanément l'oxydation et la réduction (oxyde de tungstène et cuivre métallique pur à une température de 1030°C). Tout le S contenu dans l'échantillon est ainsi sous forme de  $SO_2$ . Puis l'eau est piégée par passage dans une colonne de perchlorate de magnésium, et une chromatographie en phase gazeuse à 95°C permet de bien séparer le  $CO_2$  du  $SO_2$  de l'échantillon. Le rapport C/S étant élevé, la portion d'échantillon qui contient le carbone est diluée en augmentant la proportion d'hélium grâce à un diluteur (GV Instrument) afin que la mesure par le spectromètre de masse des molécules de  $SO_2$  ne soit pas perturbée par le  $CO_2$ .

### **Au niveau du spectromètre de masse :**

Les paramètres de la source sont préalablement optimisés pour détecter soit les masses 28, 29 et 30 lors des dosages d'N, soit les masses 64 et 66 pour les dosages de S. L' $N_2$  ou le  $SO_2$ , sont injectés dans la source où les molécules sont d'abord ionisées par un bombardement d'électrons émis par un filament de tungstène. Les ions moléculaires positifs alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés dans un champ électromagnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse (m) à leur charge (z). Toutes les molécules d' $N_2$  (ou de  $SO_2$ ) ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est donc uniquement conditionné par leur masse. Ainsi, la déviation de l'N moléculaire de masse 28 ( $^{14}N^{14}N$ ) sera plus importante que celle de l'N de masse 29 ( $^{14}N^{15}N$ ), elle-même plus importante que celle de l'N de masse 30 ( $^{15}N^{15}N$ ).

Les ions sont collectés par trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis au système informatique. La quantification de l'N est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28, 29 et 30 et la quantification du S par la somme des signaux obtenus à partir des masses 64 et 66. L'abondance isotopique en  $^{15}N$  est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 29/28 et 30/29, l'abondance

isotopique en  $^{34}\text{S}$  par le rapport des signaux 66/64, et en comparant les résultats à des gaz de référence ( $\text{N}_2$  ou  $\text{SO}_2$ ) injectés entre chaque échantillon *via* un Reference Gas Injector (GV Instrument). Ces gaz ont été préalablement calibrés avec des standards internationaux (IAEA). Les quantités d’N et de S totales sont calculées par rapport à des échantillons références végétaux.

*(b) Détermination des quantités d’N et de S total et de celles issues des fertilisants*

La détermination de ces quantités se fait en plusieurs étapes. Le spectromètre de masse nous fournit deux résultats principaux : l’abondance isotopique et les teneurs en N et S des échantillons (N% et S%).

**L’abondance isotopique (A)** est le rapport en pourcentage de l’isotope donné à l’ensemble des isotopes du même élément (Guiraud 1984). Elle est synonyme de teneur isotopique.

$$\text{Pour l’N de masse 15 : } A_N = ({}^{15}\text{N} \times 100) / ({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})$$

$$\text{Pour le S de masse 34 : } A_S = ({}^{34}\text{S} \times 100) / ({}^{34}\text{S} + {}^{32}\text{S})$$

Cette abondance isotopique doit être corrigée par rapport à des références. La valeur corrigée est **l’excès isotopique (E)**. Pour l’N, l’abondance de référence est celle de l’air, soit  $0.3663 \pm 0.0004$  (Junk & Svec 1958). Pour le S, l’abondance de référence est celle de la météorite Canyon Diablo Troilite, soit 4.21. Par conséquent,

$$E_N (\%) = A_N (\%) - 0.3663$$

$$E_S (\%) = A_S (\%) - 4,21$$

A partir des excès isotopiques respectifs des fertilisants et des échantillons végétaux, **les pourcentages d’N et de S issus des fertilisants (%NDFF et %SDFF)** peuvent être calculés :

$$\%NDFF = (E^{15}\text{N}_{\text{éch}} / E^{15}\text{N}_{\text{fert}}) \times 100$$

$$\%SDFF = (E^{34}\text{S}_{\text{éch}} / E^{34}\text{S}_{\text{fert}}) \times 100$$

où  $E^{15}N_{\text{éch}}$  : excès isotopique de l'échantillon ;  $E^{15}N_{\text{fert}}$  : excès isotopique du fertilisant ;  $E^{34}S_{\text{éch}}$  : excès isotopique de l'échantillon et  $E^{34}S_{\text{fert}}$  : excès isotopique du fertilisant. Ces mesures permettent d'évaluer l'importance de la contribution des fertilisants appliqués en début d'expérimentations aux nutriments azotés et soufrés.

**Les quantités d'N (qNDF) et de S (qSDF) par plante issues des fertilisants** correspondent alors à :

$$qNDF = (N_{\text{tot}} \times \%NDF) / 100$$

$$qSDF = (S_{\text{tot}} \times \%SDF) / 100$$

$$\text{où : } N_{\text{tot}} = (\%N \times MS) / 100 \text{ et } S_{\text{tot}} = (\%S \times MS) / 100$$

Ces paramètres permettent alors de calculer **les coefficients réels d'utilisation de l'N et du S (RNUE et RSUE)**, c'est à dire le pourcentage des fertilisants appliqués utilisé par les différents individus ou espèces :

$$RNUE = (qNDF / N_{\text{fert}}) \times 100$$

$$RSUE = (qSDF / S_{\text{fert}}) \times 100$$

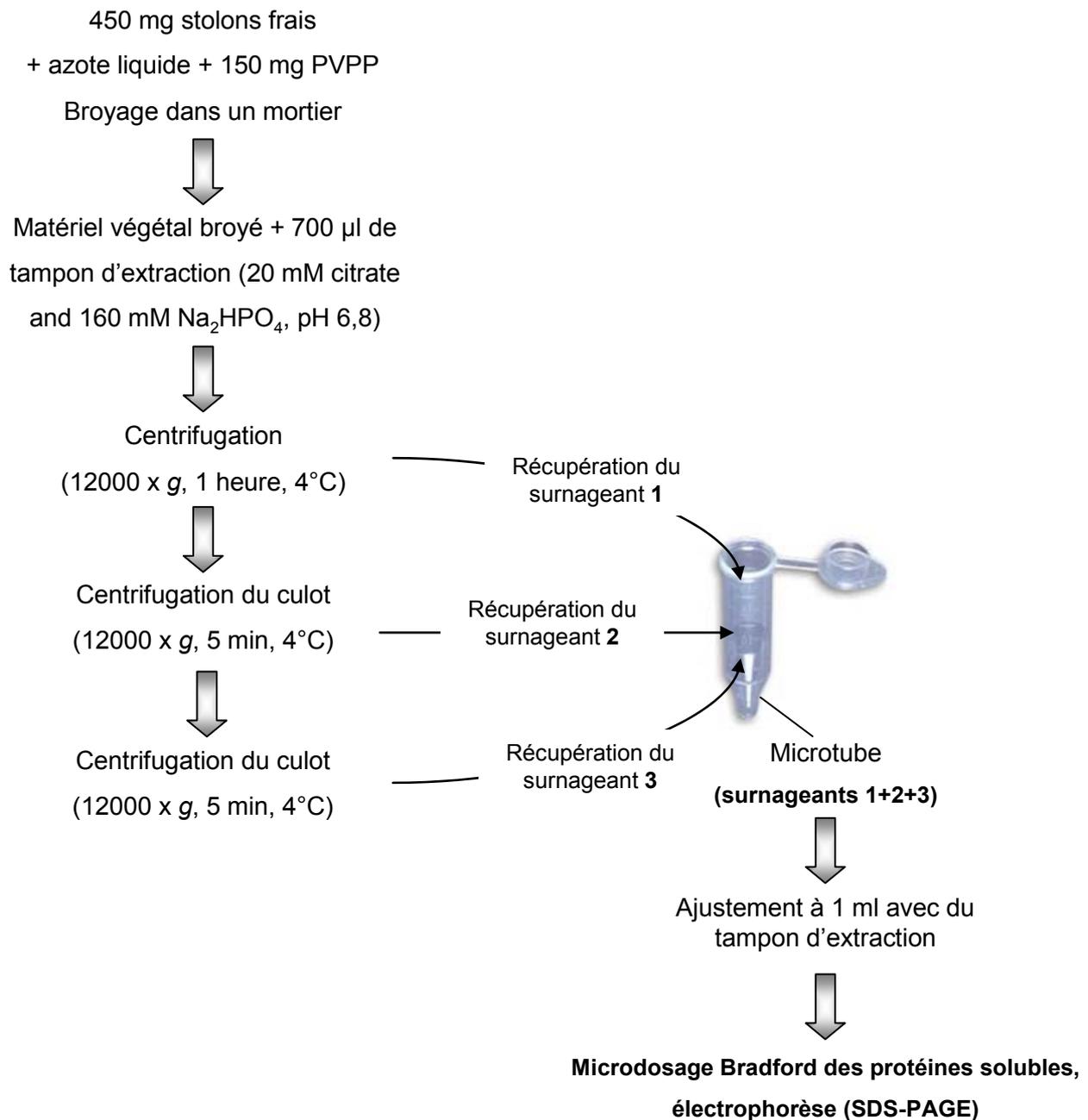
où  $N_{\text{fert}}$  : quantité de fertilisant azoté appliqué, exprimé en mg d'N par pot et  $S_{\text{fert}}$  : quantité de S appliqué, exprimé en mg par pot.

Ces coefficients constituent de bons indicateurs rendant compte du potentiel des différentes espèces à exploiter les ressources du sol. Ils nous permettent de déterminer quelles espèces tirent le plus profit de ces ressources.

Pour les cultures n'ayant pas bénéficié d'un marquage au  $^{34}S$ , une valeur approchée est utilisée : le **coefficient apparent d'utilisation du S (ASUE)** :

$$ASUE = (S_{\text{totS0}} - S_{\text{totS30}}) / S_{\text{fert}}$$

où  $S_{\text{totS0}}$  : quantité de S par plante quand la fertilisation soufrée est nulle ;  $S_{\text{totS30}}$  : quantité de S par plante quand la fertilisation soufrée est de 30 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> et  $S_{\text{fert}}$  quantité de S appliqué, exprimé en mg par pot.



**Figure 35** : Protocole d'extraction des protéines solubles des stolons du trèfle blanc (d'après Etienne *et al.* 2007).

**Tableau 10** : Composition du tampon Laemmli modifié concentré deux fois (d'après Laemmli 1970).

SDS 10 %	4 ml
Tris-HCl / pH 6,8 50mM	1,2 ml
Glycérol 99 %	2 ml
Bleu de bromophénol à 0,1 %	1 ml
H <sub>2</sub> O	1,8 ml
Volume total de Laemmli 2X modifié :	10 ml

### ***B.3.2 Analyse des protéines solubles des stolons de *Trifolium repens****

#### *(a) Extraction des protéines solubles*

Les protéines solubles des stolons du trèfle sont extraites à partir de 450 mg de matériel frais (**Figure 35**). Après addition de 150 mg de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone), qui permet de fixer les polyphénols végétaux qui pourraient interférer lors du dosage colorimétrique des protéines), le tissu végétal est broyé dans un mortier, d'abord à l'aide d'N liquide, puis en présence de 700 µl de tampon d'extraction (20 mM de citrate et 160 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8). Après centrifugation (12000g, 1h à 4°C), le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré. Le culot est à nouveau centrifugé 2 fois consécutivement à 12000g pendant 5 min à 4°C. Après chaque centrifugation, le surnageant est récupéré et regroupé avec les surnageants précédents. Le volume des surnageants est alors ajusté à 1 ml avec du tampon d'extraction (**Figure 35**).

#### *(b) Dosage des protéines solubles*

Le dosage des protéines solubles des stolons du trèfle est effectué selon la méthode de Bradford (1976). À 10 µl d'extrait protéique dilué 2 ou 5 fois (selon la concentration en protéines) sont ajoutés 200 µl de réactif de Bradford (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) dilué 4 fois. La coloration se révèle en 10 minutes et reste stable pendant 1 heure. L'absorbance est lue à 570 nm et la concentration en protéines solubles est déterminée par référence à une courbe étalon, établie avec du sérum d'albumine bovine (BSA).

#### *(c) Analyse qualitative des protéines par électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)*

Ce type d'électrophorèse, réalisée en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS), permet de séparer les protéines selon leur taille. Au cours de l'électrophorèse, la migration des polypeptides s'effectue sous l'influence d'un champ électrique et leur séparation en fonction du poids moléculaire est réalisée par le maillage d'un gel de polyacrylamide.

#### Préparation des échantillons :

Les extraits protéiques, préparés dans un tampon Laemmli 2x (**Tableau 10**), sont dénaturés à 100°C pendant 5 min, puis centrifugés (12000g, 5 min à température ambiante) afin d'éliminer les autres molécules présentes dans l'extrait (sucres, polyphénols...).

**Tableau 11 :** Composition du gel de concentration à 5,5% d'acrylamide et du gel de séparation à 15% d'acrylamide pour l'électrophorèse en SDS-PAGE.

	Gel de concentration	Gel de séparation
Pourcentage d'acrylamide :	5,5 %	15 %
Acrylamide 30% (Duracryl)	1,19 ml	6,1 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	-	3,13 ml
Tris 0,5 M / pH 6,8 / SDS 0,4%	1,56 ml	-
H <sub>2</sub> O	3,44 ml	3,15 ml
SDS 10%	-	125 µl
APS 10%	37,5 µl	62,5 µl
TEMED	8,75 µl	12,5 µl

APS: Ammonium Persulfate, SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, TEMED: N, N, N', N'-Tetraméthyléthylène diamine.

Les volumes indiqués sont utilisés pour la conception d'un mini gel (8x8x0,1 cm).

**Tableau 12 :** Protocole de révélation des protéines séparées en SDS-PAGE par la coloration au nitrate d'argent (adapté de Blum *et al.* 1987).

ETAPES	SOLUTIONS DE TRAITEMENT	DUREE DU TRAITEMENT
<b>1:</b> <i>Fixation</i>	100 ml de fixateur (Méthanol 50 %, acide acétique glacial 12 %) + 50 µl Formaldéhyde 37%	<i>au moins 1 heure</i>
<i>Lavages</i>	25 ml d'éthanol 50%	<i>3 x 2 minutes</i>
<b>2:</b> <i>Prétraitement</i>	5 ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 5H <sub>2</sub> O (4 mg/ml), eau ultra pure qsp 100 ml	<i>1 minute</i>
<i>Lavages</i>	Eau ultra pure	<i>3 x 20 secondes</i>
<b>3:</b> <i>Imprégnation</i>	200 mg de nitrate d'argent pour 100 ml d'eau ultra pure + 75 µl Formaldéhyde 37 %	<i>20 minutes</i>
<i>Lavages</i>	Eau ultra pure	<i>3 x 30 secondes</i>
<b>4:</b> <i>Révélation</i>	6 g de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> dans 100 ml eau ultra pure + 100 µl de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O (4g/L) + 50 µl Formaldéhyde 37 %	<i>Environ 2 minutes</i>
<i>Arrêt</i>	50 ml de fixateur (Méthanol 50 %, acide acétique glacial 12 %)	<i>10 minutes</i>
<i>Conservation du gel dans de l'eau ultra pure + Glycérol avant séchage</i>		

L'équivalent de 3 µg de protéines solubles est déposé par puits pour l'analyse en SDS-PAGE. Pour chaque traitement, des volumes équivalents d'extrait issu des 4 répétitions sont mélangés et constituent l'extrait protéique moyen (représentatif de la moyenne des extraits).

#### Préparation des gels et conditions de migration :

La séparation des protéines solubles est réalisée sur des gels verticaux coulés entre des plaques de verre (10 × 10 cm). La concentration en Duracryl (polymère d'acrylamide modifié à résistance mécanique élevée, COGER®) est de 5,5% pour le gel de concentration et de 15% pour le gel de séparation. La composition de ces deux types de gels est indiquée dans le **Tableau 11**. Une solution de persulfate d'ammonium (APS) et du TEMED permettent d'initier et de catalyser la polymérisation des gels. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration TRIS/SDS/Glycine (25 mM / 0.1% / 192 mM ; pH 8.8 ; Laemmli 1970). La migration dure environ 2 heures (100 mA, 150 V) à une température extérieure maintenue à 15°C. La migration est stoppée quand le bleu de bromophénol, utilisé comme marqueur de front de migration, arrive à la base des gels.

#### Révélation des protéines par coloration :

Les protéines séparées par électrophorèse sont révélées par coloration au nitrate d'argent selon la méthode décrite par Blum *et al.* (1987). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure. La méthode de coloration au nitrate d'argent comporte 4 étapes qui sont répertoriées dans le **Tableau 12**.

#### Analyse des profils électrophorétiques :

Après coloration, les gels sont numérisés. L'analyse des données est effectuée grâce à un système informatique de traitement de l'image (système Bioimage de Millipore). Elle comporte plusieurs étapes : acquisition de l'image, détection des bandes polypeptidiques, appariement des bandes homologues entre les différentes pistes d'un gel et exploitation des résultats (Damerval *et al.* 1993).

### **III. Analyses statistiques des données**

L'ensemble des expérimentations a été réalisé systématiquement avec 4 (en mésocosme) à 5 (*in situ*) répétitions par traitement. Les données observées sont présentées

sous forme de moyenne. La variabilité des résultats est donnée sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne pour  $n = 4$  ou  $5$ . Pour les analyses des profils électrophorétiques, les résultats correspondent à la réunion des extraits des 4 répétitions de chaque traitement.

L'étude de l'effet des niveaux de disponibilité en N et en S sur les différents paramètres a été faite par analyses factorielles de variances de type ANOVA à deux facteurs (N et S). Nous avons utilisé le logiciel Minitab 13 for Windows Version 13.31 (2000) (ANOVA à modèle linéaire généralisé). Ces ANOVA permettent d'envisager l'effet de chaque facteur et l'existence d'interactions entre facteurs. Les conditions d'utilisation de l'ANOVA nécessitent un respect de la normalité des valeurs analysées et de l'égalité des variances. Ces conditions ont été vérifiées respectivement par les tests de Ryan-Joiner et de Bartlett.

Afin de répondre à la condition de la normalité des valeurs analysées par des ANOVA, certaines données ont été transformées. La transformation des données a été faite selon les équations suivantes :  $\text{Log}(X)$ ,  $\text{Log}(1+X)$ ,  $1/X$ ,  $\text{racine}(X)$ , ou par la transformation Box-cox. Les tests de comparaison multiple choisis sont le test de Tukey pour les interactions de niveau 2 et celui de Bonferroni pour les interactions de niveau 3, au seuil  $\alpha = 5\%$ . Ces tests permettent de situer les différences observées.

Les données ne présentant pas une distribution normale, même après transformation, ou ne répondant pas à l'égalité des variances sont comparées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le test de Kruskal-Wallis ne permet pas de tester les interactions entre facteurs. Pour les approcher, l'effet traitement N+S a été testé. Les différences entre traitements ont alors été localisées grâce au test de la médiane de Mood.

Afin d'évaluer l'influence des différents traitements de fertilisation appliqués in situ sur la dynamique de végétation de la prairie naturelle, nous avons utilisé l'Analyse Factorielle des Correspondances sur Variables Instrumentales (AFCvi : Chessel *et al.* 1987), ou Analyse Canonique des Correspondances (Ter Braak 1986), à l'aide du logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.* 2001). Ce type d'analyses multivariées a été développé dans le but de permettre aux écologues de relier l'analyse d'un tableau de contingence (typiquement un tableau de fréquence, abondance ou comptage, croisant relevés et espèces) à des variables quantitatives ou qualitatives (données environnementales) mesurées sur les sites de relevés.

## **RÉSULTATS**

-

### **CHAPITRE I**

*Le ratio azote : Soufre modifie les interactions compétitives entre  
Trifolium repens et Lolium perenne en condition de fauche : production  
et capacités compétitives  
(article 1)*

# Plan du Chapitre I des résultats

## *Préambule*

## **Abstract**

## **I. Introduction**

## **II. Materials and methods**

- A. Plant material and growth conditions
- B. Plants harvests and morphological measurements
- C. Statistical analysis

## **III. Results**

- A. Above-ground dry matter (DM)
- B. Leaf and tiller - stolon traits
- C. Root dry matter (DM)
- D. Community structure and Competitive interactions

## **IV. Discussion**

- A. N : S effects on individual plant performance
- B. N : S effects on mixture composition and plant interactions

## **V. Conclusion**

## CHAPITRE I

-

### **Nitrogen : Sulphur ratio alters competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne* under cutting: production and competitive abilities**

**(Article 1)**

---

---

Tiphaine Tallec<sup>1</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1</sup>, Servane Lemauviel - Lavenant<sup>1</sup>, Jean-Bernard Cliquet<sup>1</sup>,  
Fabien Lesuffleur<sup>1</sup>, Alain Ourry<sup>1</sup>

*Article soumis à European Journal of Agronomy*

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale Agronomie & nutriments N, C, S (EVA), Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

**Key words:** competition; *Lolium perenne*; nitrogen; production; sulphur; *Trifolium repens*

## Préambule

L'analyse bibliographique nous a conduit à émettre un groupe de 8 hypothèses quant aux effets d'un double gradient de fertilité N / S sur la structure et le fonctionnement de communautés végétales de prairies bas-normande.

Dans une première expérimentation, réalisée en mésocosme afin de contrôler l'ensemble des facteurs susceptibles d'affecter la dynamique des espèces, nous avons eu pour objectif de **tester l'existence d'un effet S**, de **le qualifier et de le quantifier**. Pour cela nous nous sommes focalisés sur une approche purement écologique et agronomique des effets potentiels d'un gradient de disponibilité en S en testant nos hypothèses suivantes :

- (1) le S augmente la production de matière sèche,
- (2) l'effet du S dépend de l'espèce considérée,
- (3) l'effet du S varie en fonction du niveau de fertilité azotée du sol,
- (4) les effets du S varient en fonction de la situation de voisinage.

Nous avons sélectionné pour cela 2 espèces appartenant à des groupes fonctionnels très différents et caractérisées tant par leur forte occurrence au sein des prairies, que par leur importance dans le fonctionnement de ces écosystèmes et, en raison de leurs qualités de plantes fourragères, par leur importance économique : le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) et le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). La prise en compte du trèfle nous permet en outre de tester notre 7<sup>ème</sup> hypothèse : le S, dans un milieu riche en N, joue un rôle majeur dans l'occurrence des Fabacées au sein de la communauté.

Les deux espèces sont cultivées à la fois en population et en communauté (0.5 / 0.5). La confrontation des performances des espèces dans les deux situations permet d'envisager la modulation des interactions en fonction des niveaux trophiques. Ces deux modèles expérimentaux ont été soumis à un double gradient N  $\times$  S consistant en un croisement de 3 niveaux d'N (0, 50 et 180 kg ha<sup>-1</sup>) et de 3 niveaux de S (0, 15 et 30 kg ha<sup>-1</sup>) tel que décrit dans le chapitre précédent. Après une première phase de croissance correspondant à l'établissement, puis après une seconde, consécutive à une coupe à 5 cm de hauteur, correspondant à la repousse, nous avons considéré les traits suivants : production de matière sèche (aérienne, et souterraine à la récolte finale) et nombre de feuilles et d'organes végétatifs (talles et stolons).

Les résultats obtenus nous montrent que les deux gradients N et S modifient la performance des espèces, le résultat des interactions compétitives et ainsi la composition des

communautés qu'elles constituent, en permettant notamment un maintien du trèfle en situation de forte disponibilité en N.

Ce chapitre a été accepté en mars 2008 à *European Journal of Agronomy*.

## Abstract

Grasslands species, like others crops, no longer benefit from high atmospheric sulphur deposition. This may cause sulphur limitation and in turn may induce a shift in plant communities by altering species performance and competitive abilities. To test this hypothesis, a greenhouse pot experiment was designed to investigate the interacting effects of sulphur (S) and nitrogen (N) availability on production, morphology and competitive abilities of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Plants were grown in monocultures and mixtures during 4 months. They were supplied with combinations of three levels of S and three levels of N and subjected to 3 defoliation events. Both S and N gradients altered plants performance and modulated competitive interactions. In *L. perenne*, above- and below-ground dry matter production, leaf and tiller number and contribution to mixture DM production were little affected by S, but highly by N. For *T. repens*, these traits were significantly increased by S, but only slightly by N. At establishment, *T. repens* was subjected to a significant interspecific competition at low N – low S and high N – high S. But at regrowth (cuts 2 and 3), *T. repens* was much more affected by intra than interspecific competition. *L. perenne* was only sensitive to competition (intraspecific) when N supply was combined with no or moderate S supply. We conclude that N : S ratio of soil appears to drive species production, morphology and competitive abilities, which in turn affect leguminous – gramineous species ratio and grassland plant community structure. Since the growth of *T. repens* was significantly reduced in low S treatments, our results suggest that the drastic fall in atmospheric sulphur deposition could restrict leguminous species in high N soil conditions.

## **I. Introduction**

Sulphur (S) is one of the essential elements required for normal growth of plants. Although S is considered as a secondary nutrient, it is often called the fourth major nutrient ranking just below nitrogen (N), phosphorus and potassium. Inputs of this element from fertilizers and atmospheric deposition were more than sufficient to meet crop requirements, before last quarter of the 20<sup>th</sup> century. Nowadays, S deficiencies in crop production are increasing in Northern-Western Europe. S deficiencies first occurred in the early 1970s (Murphy & Boggan 1988). Control of industrial pollution has resulted in a steady decline in SO<sub>2</sub> emissions and thus a reduction in S deposition from the atmosphere. Supply of S is also reduced by a change in composition of fertilizer with a low S content and a high N content resulting in a high N : S ratio in fertilizers. Although the use of high N fertilizers has resulted in increased crop yields, S deficiency can occur if the entire above-ground portion of the crop is harvested (Murphy & Boggan 1988). Leaching of S from the soil constitutes the final and one of the major pathways of loss in pastures in humid regions (Curtin & Syers 1990). Much S is used in the formation of amino acids, proteins and oils, in the N fixation process, in plant structural components, and in activation of certain vitamins and enzymes (Droux 2004). As there is a strong interaction between N and S in plants (Clarkson *et al.* 1999), it is clear that an increase in use of N will increase the demand for S, which, if not satisfied, will result in S deficiency.

It has been shown that S fertilisation increases yield in many arable crops, eg oilseed rape (McGrath & Zhao 1995), barley (Withers *et al.* 1995), wheat (Zhao *et al.* 1999) and in grassland (Murphy *et al.* 2002). However, there has been little published on competitive interactions between species in response to change in S supply. Because species have different requirements for nutrients (Roem *et al.* 2002) and because fertilizers application influences botanical composition of grassland (de Vries & Kruijne 1960), we suppose that S alters competitive interactions between species (as does N) and thus modifies the balance of matrix species and population dynamics in grassland. *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L. are two of the most frequent matrix species in natural grassland of Northern-Western Europe and are commonly grown together in intensive grassland systems in temperate climates. Competition for N has long been recognized as being of great importance in determining the balance between *L. perenne* and *T. repens* in mixtures (Soussana *et al.* 1995). Indeed, these species have contrasting responses to mineral N availability (Schwinning &

Parsons 1996). Collins *et al.* (2003) showed that under conditions of high N, *L. perenne* demonstrates a distinct competitive advantage over *T. repens* when the species are grown together. Concerning S fertilization, Australian studies on mixtures of annual ryegrass and clover species showed that morphological variations and shifts in competition processes could be induced by N  $\times$  S supplies. Gilbert & Robson (1984a), considering the effects of two levels of sulphur supply, showed that S application had little effect on root morphology of either species, slightly increasing the clover and ryegrass roots system. Considering above-ground plant traits, they concluded that S application increased clover performance for many traits (lateral stolons, petiole length, ...) at low and high N supply but ryegrass performance only at a high N supply (Gilbert & Robson 1984b). They also showed that soil temperature and N availability could modulate competition for sulphur between these two species (Gilbert & Robson 1984c). Most other studies focused on production or N – S fate in grassland systems. They showed that S application enhanced higher dry matter production and N content (Walker *et al.* 1956), but also S content, the latter more significantly for *T. repens* than for *L. perenne* (Sinclair *et al.* 1996). Other nutrients availability has been proved to alter S effect (Cullen 1970), for example, *L. perenne* response to S depends on N availability (Brown *et al.* 2000). However, to our knowledge, the description of the impacts of N : S balance on the morphology of *L. perenne* and *T. repens* and on the competitive interactions developing between individuals of these two species, is not available.

Considering this, the objectives of the current study were to investigate changes in production, morphology and competitive abilities of these two species, induced by different initial levels of soil N and S availabilities. We hypothesized that S would favour especially *T. repens*, such as it did for annual species, by increasing its global performance; we will test this hypothesis on both population and mixture. And as N fertilization favoured mostly grasses compared to clover, we hypothesized that N : S ratio would modulate mixture composition by altering both intraspecific and interspecific interactions. We assessed these interaction and both species competitive abilities using a replacement design methodology (de Wit 1960). Finally, we hypothesized that species responses should defer between establishment and regrowth after cutting. To test these hypotheses, we considered a defoliation regime derived from local intensive managed grassland and 9 soil-fertilities obtained by crossing 3 N and 3 S levels of initial fertilization.

## II. Materials and methods

### A. Plant material and growth conditions

A greenhouse experiment was conducted between March and July with *Lolium perenne* L. cv Bravo (great productivity and medium time earing) and *Trifolium repens* L. cv Huia (medium leaves, well branched medium stolons, medium time flowering cultivar representing 35-40% of world sales in the 1980s and 1990s). Three species compositions were considered: 8 *L. perenne*, 8 *T. repens* and 4 *L. perenne* + 4 *T. repens* (plants per pot). This corresponded to a standard replacement design (de Wit 1960): total plant density in the mixture is equal to the plant density used in the monoculture of each component species. 9 treatment combinations (3 N × 3 S) were applied, each combination being replicated 4 times (108 pots). Plants were submitted to cuts, at 50 mm above ground level, on days 63 (42 days after planting), 105 and 149.

Pots consisted in a polyvinyl-chloride (PVC) containers (soil volume: 1755 cm<sup>3</sup>, basal diameter: 10.5 cm, top diameter: 14 cm, height = 15.5 cm) filled with a homogeneous, nutrient-poor sieved soil (2 mm mesh), collected from a grassland not fertilized between 1948 and 2001 and which received 50 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> in 2002 and 2003 (INRA experimental station “Le Vieux Pin”, Le Pin au Haras, France: 54°19'N, 0°14'W). Soil was taken at 15-25 cm depth. Its main characteristics were: clay content, 36.7%, silt content, 41.3%, organic matter content, 4.2%. Total N and S contents were respectively 3.18‰ and 1‰. Soil pH was 6.1 (and remained stable during experiment). The upper 2 cm thick soil layer of containers was autoclaved twice at 120°C for 30 minutes to avoid the growth of undesired species.

*L. perenne* and *T. repens* were germinated on perlite with demineralised (reverse osmosis) water in darkness at 20 °C until radicles ruptured the testa. This was designated day 0. On day 21, they were planted in containers. The 9 N × S combinations were applied on day 31. S was applied as calcium sulphate at a rate of 0, 15 kg S ha<sup>-1</sup> (conventional grassland fertilization in New Zealand: MAFF 2000) and 30 kg S ha<sup>-1</sup> (fertilization level suggested for cereals: Withers *et al.* 1998). N was applied as ammonium nitrate at 0, 50 kg N ha<sup>-1</sup> (conventional local fertilization of permanent grasslands) and 180 kg N ha<sup>-1</sup> (local fertilization of intensive sown grasslands). Potassium (150 kg K ha<sup>-1</sup>) and Phosphorus (60 kg P ha<sup>-1</sup>), as K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, were applied to each container, at the same time. Containers receiving no or moderate calcium sulphate were supplemented with CaCl<sub>2</sub>, so that each container received the

same Ca amount. *T. repens* plants were infected on days 28 and 35 with a standard mixture of *Rhizobium trifolii* T354 known to support N fixation.

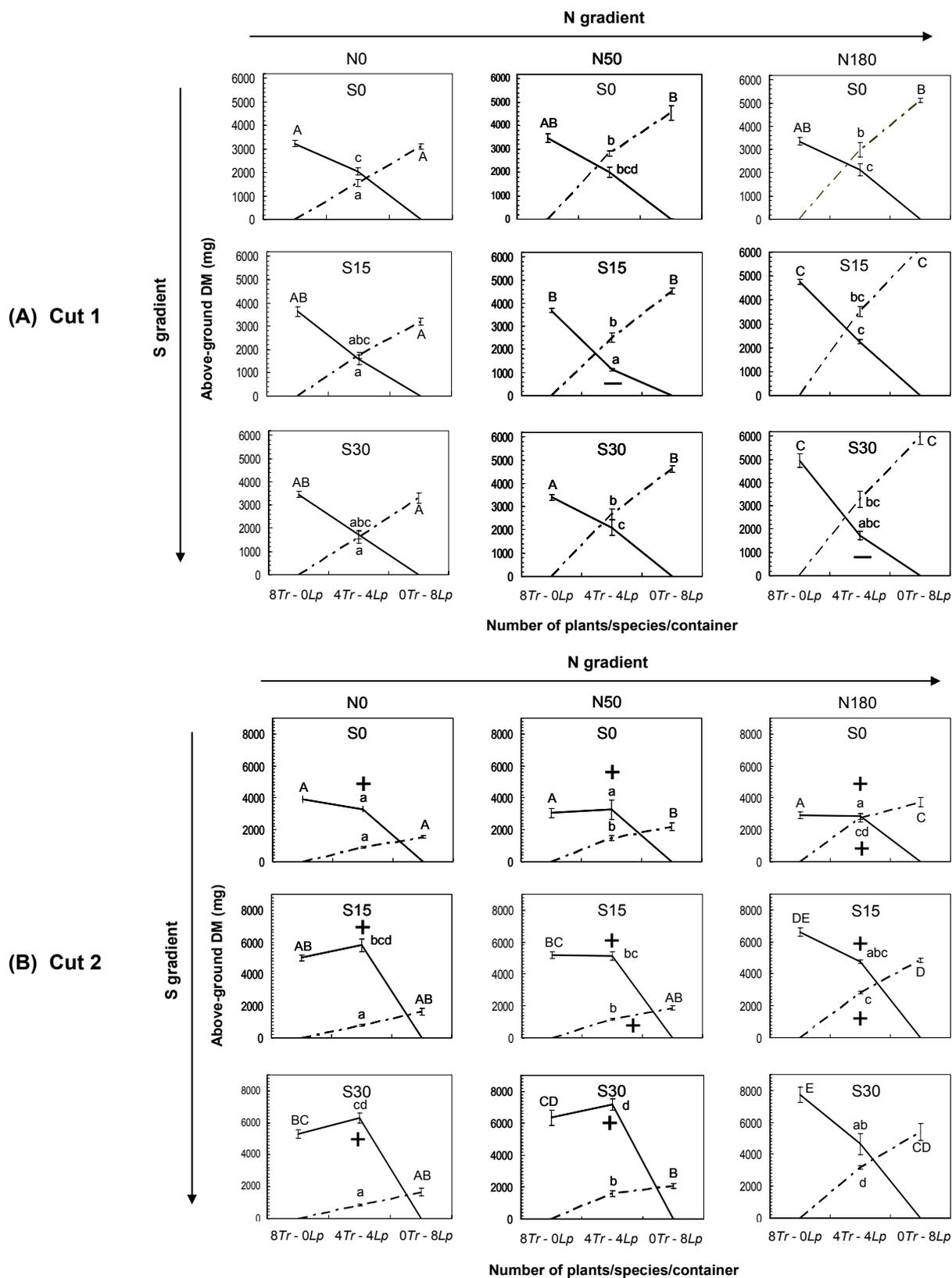
Throughout the experiment, soil water content was kept at  $\pm 25\%$  by weighing all containers once a week and watering them 4 times a week. Air temperature was kept at  $20/16 \pm 2^\circ\text{C}$  (day/night). Plants were grown under natural light conditions until day 21, and then supplemented by artificial illumination (400 W high-pressure sodium lamps, Phytoclaude) providing  $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  PAR (photosynthetically active radiation) at plant height with a 16/8h photoperiod. The containers were moved twice a week to avoid any positional effect.

## B. Plants harvests and morphological measurements

Plants were harvested with a cutting height of 50 mm above the root-shoot junction on days 63 (42 days after planting), 105 and 149 resulting in two regrowth periods (P1: 42 days; P2: 44 days). At harvest plants were divided into leaf-blade, petioles, dead matter and inflorescence (if present) for *T. repens*; and leaves, stems and dead matter for *L. perenne*. Dry weights were obtained after 48 h at  $65^\circ\text{C}$ . The area of fresh leaf blades of both species was measured with an electronic leaf area meter (Li-3100, LI-COR). Before each cut, leaf number and tiller (*L. perenne*) or stolon (*T. repens*) of one individual of each species per pot were counted. At the end of the experiment, all roots were washed clean of soil particles, and root dry matter was determined.

## C. Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) were used to test for significant differences in above-ground and below-ground traits among the 9 fertility levels (= treatments). Where necessary, data were log transformed to satisfy the requirement (normality and homogeneity) for constant variance in ANOVA. Comparison of means for the individual treatments was done at the 5% probability level based on the Tukey test. However, not all variables satisfied normality due to neighbouring effects, even after transformation, and the non-parametric Kruskal-Wallis correlation test was used to analyse the relationship between the different factors. When H-values were significant, results were subjected to Mood median test to determine which means differed significantly.



**Figure I-1 :** Replacement diagrams based on average above-ground DM per container of *Lolium perenne* (*Lp*, dashed lines) and *Trifolium repens* (*Tr*, solid lines) for different levels of N and S inputs at **(A)** cut 1 and **(B)** cut2 (means  $\pm$  1 SE, n = 4 containers).

Above-ground DM: two different uppercase major letters indicate a significant difference in DM per plant between treatments in monoculture, and minor letters a significant difference between treatments in mixture (Tukey test,  $*P \leq 0.05$ ).

Competitive interactions: "+" indicates a significantly higher DM per plant in mixture than in monoculture = dominant intraspecific competition (convex curve); "-" indicates a significantly lower DM per plant in mixture than in monoculture = dominant interspecific competition (concave curve) (Bonferroni test,  $*P \leq 0.05$ ).

Competitive ability of each species is given by the difference between their yield in mixture and their yield in monoculture. This difference was tested using ANOVA and Bonferroni t test which allows some control of family-wise Type I error rate.

### III. Results

Only data for the 1<sup>st</sup> (initial growth) and 2<sup>nd</sup> (regrowth after cutting) cuts are presented, because results from the 3<sup>rd</sup> cut followed the same trend as the 2<sup>nd</sup> one.

#### A. Above-ground dry matter (DM)

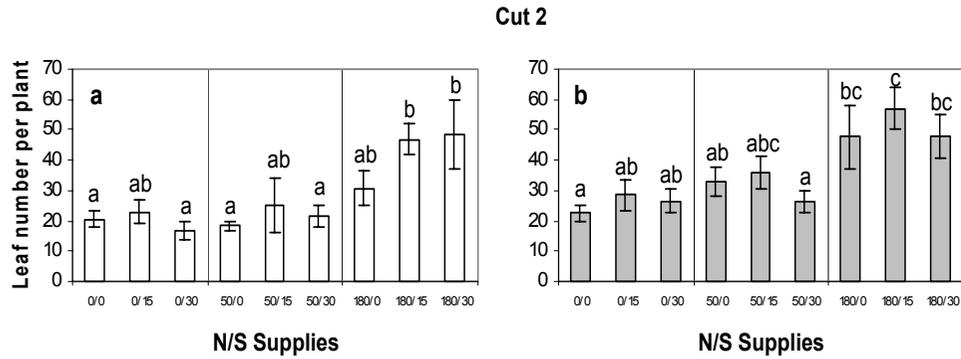
At each cut, above-ground DM varied greatly among treatments (**Table I-1**) in both monocultures and mixture.

**Table I-1** : Single and interaction effects of N supply, S supply and Neighbouring (Ng) on traits measured on *L. perenne* (*L. p.*) and *T. repens* (*T. r.*). Results of F and H (*in italic*) tests, ns: non significant, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

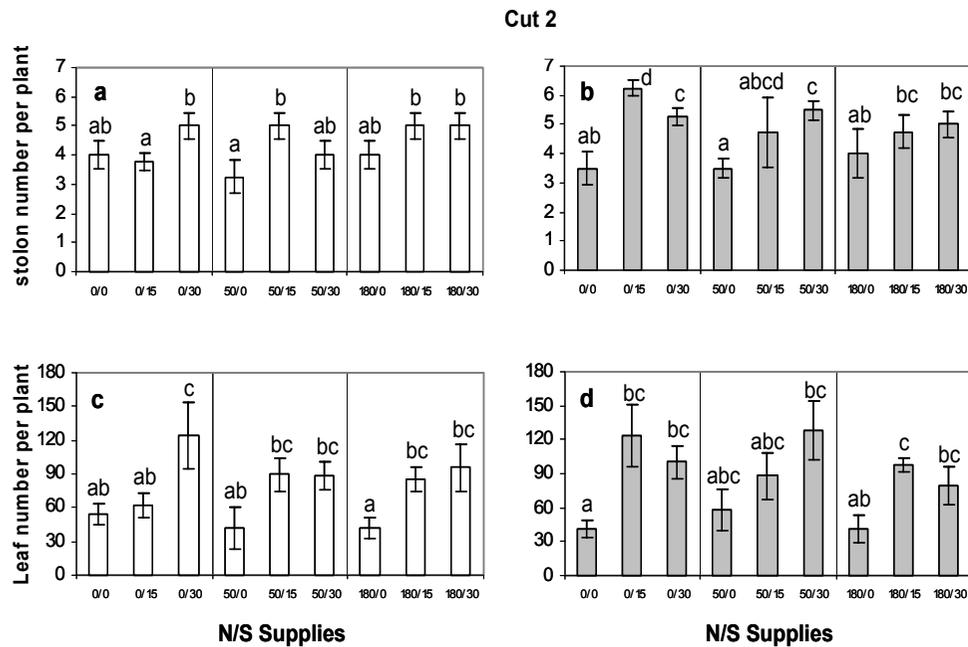
Variable	Above-ground								Below-ground				
	Cut1				Cut2				N	S	Ng	NxS	
	N	S	Ng	NxS	N	S	Ng	NxS					
H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p	H/F p		
DM per plant (mg)	<i>L. p.</i>	72,1 ***	1,0 <sup>NS</sup>	2,7 <sup>NS</sup>	74,1 ***	78,4 ***	0,8 <sup>NS</sup>	4,2 *	5,37 **	63,6 ***	4,1 *	23,6 ***	3,39 *
	<i>T. r.</i>	11,8 **	0,3 <sup>NS</sup>	0,6 <sup>NS</sup>	22,6 *	4,1 *	35,9 ***	411,4 ***	3,81 **	3,1 *	13,1 ***	54,5 ***	0,39 <sup>NS</sup>
Leaf area per plant (cm <sup>2</sup> )	<i>L. p.</i>	70,5 ***	0,8 <sup>NS</sup>	6,3 *	nt	44,6 ***	1,0 <sup>NS</sup>	34,1 ***	nt				
	<i>T. r.</i>	8,7 *	2,1 <sup>NS</sup>	0,2 <sup>NS</sup>	nt	1,2 <sup>NS</sup>	58,2 ***	4,3 <sup>NS</sup>	nt				
Leaf number per plant	<i>L. p.</i>	21,2 ***	1,8 <sup>NS</sup>	5,1 *	1,8 ns	60,4 ***	2,5 <sup>NS</sup>	18,4 ***	0,85 <sup>NS</sup>				
	<i>T. r.</i>	9,1 *	6,3 <sup>NS</sup>	3,0 <sup>NS</sup>	nt	0,6 <sup>NS</sup>	30,6 ***	1,2 <sup>NS</sup>	0,47 <sup>NS</sup>				
Tiller (stolon) number per plant	<i>L. p.</i>	20,8 ***	0,8 <sup>NS</sup>	7,7 **	1,16 <sup>NS</sup>	40,9 ***	1,6 <sup>NS</sup>	0,1 <sup>NS</sup>	1,9 <sup>NS</sup>				
	<i>T. r.</i>	3,2 *	1,6 <sup>NS</sup>	0,6 <sup>NS</sup>	0,26 <sup>NS</sup>	0,8 <sup>NS</sup>	13,8 ***	3,1 <sup>NS</sup>	0,25 <sup>NS</sup>				
Total DM in mixture per container (mg)		29,7 ***	2,26 <sup>NS</sup>		39,7 ***	8,2 **	42,2 ***		2,74 *				

nt: not tested (normality not fitted)

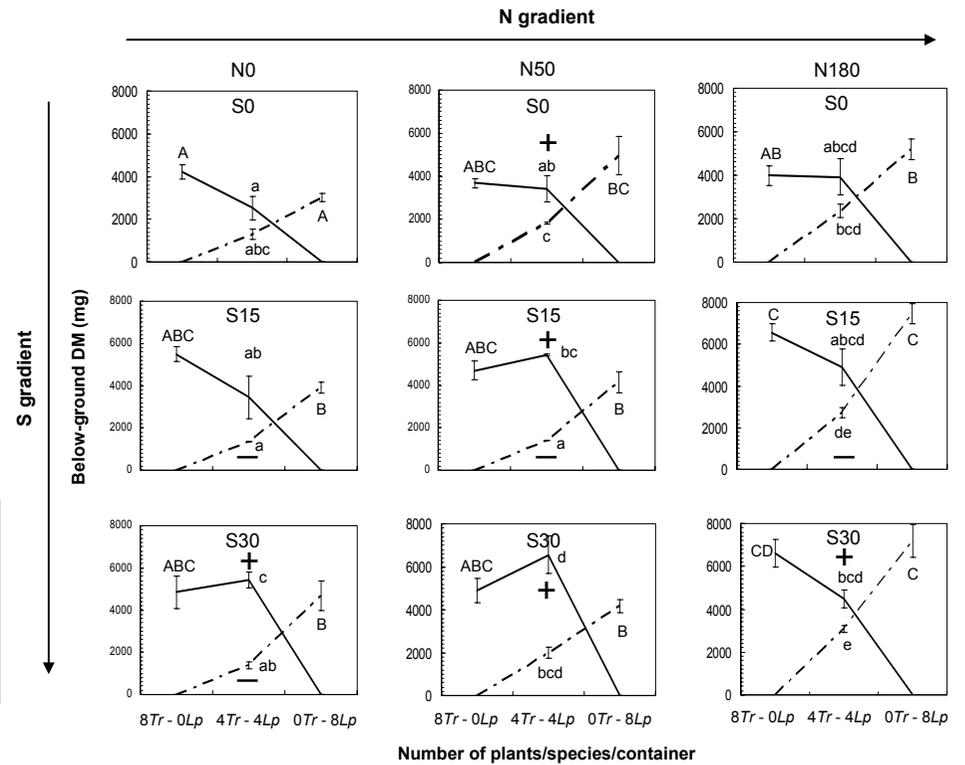
*L. perenne* DM significantly ( $P \leq 0.001$ ) increased along the N gradient (**Figures I-1A, B**). N had the main effect. At cuts 1 and 2, compared to N<sub>0</sub>, DM was almost doubled at N<sub>180</sub> (**Figures I-1A, B** :  $P \leq 0.001$ ). However, DM significantly decreased at cut 2 compared to cut 1 in N<sub>0</sub> and N<sub>50</sub> treatments. A slight S effect appeared: in monoculture, S input significantly increased above-ground DM at high N (N<sub>180</sub>) by 15% at the first cut (N × S effect; **Figure I-1A**:  $P \leq 0.001$ ) and by 31% at the 2<sup>nd</sup> cut (**Figure I-1B** :  $P \leq 0.001$ ). High N



**Figure I-2 :** Leaf number of *Lolium perenne* at cut 2 in monoculture (a □) and in mixture (b ■) for different level of N and S inputs. Data are means  $\pm$  1 SE (n = 4 containers). Two different uppercase letters indicate a significant difference between treatments ( $*P \leq 0.05$ ).



**Figure I-3 :** Morphological traits of *Trifolium repens* at cut 2 in monoculture (□) and in mixture (■) for different level of N and S inputs: Leaf number (a, b), and stolon number (c, d). Data are means  $\pm$  1 SE (n = 4 containers). Two different uppercase letters indicate a significant difference between treatments ( $*P \leq 0.05$ ).



**Figure I-4 :** Replacement diagrams based on average below-ground DM per container of *Lolium perenne* (Lp, dashed lines) and *Trifolium repens* (Tr, solid lines) for different levels of N and S inputs (means  $\pm$  1 SE, n = 4 containers).

*Below-ground DM:* two different uppercase major letters indicate a significant difference in DM per plant between treatments in monoculture, and minor letters a significant difference between treatments in mixture (Tukey test,  $*P \leq 0.05$ ).

*Competitive interactions:* “+” indicates a significantly higher DM per plant in mixture than in monoculture = dominant intraspecific competition (convex curve); “-” indicates a significantly lower DM per plant in mixture than in monoculture = dominant interspecific competition (concave curve) (Bonferroni test,  $*P \leq 0.05$ ).

+ S supplies ( $N_{180}$ ;  $S>15$ ) allowed DM production to remain similar for cuts 1 and 2, whereas it decreased in low N or high N;  $S_0$  treatments.

*T. repens* DM remained almost stable at cut 1 for  $S_0$  treatments whatever N supply was (**Figure I-1A**). In  $S_{15}$  and  $S_{30}$  treatments, DM was increased by  $N_{180}$  inputs ( $N \times S$  effect, Figure I-1:  $P \leq 0.05$ ). DM significantly increased at cut 2 compared to cut 1, for most treatments (**Figure I-1A, B**). At cut 2, S had the main effect. S supply increased DM in all N treatments, by 50% to 100% in monoculture and 50% to 250% in mixture (**Figure I-1B**,  $P \leq 0.001$ ). In mixture, *T. repens* DM was much greater in the  $N_0$  and  $N_{50}$  treatments than in the  $N_{180}$  treatment ( $N \times S$  interaction,  $P \leq 0.01$ ).

## B. Leaf and tiller - stolon traits

*L. perenne* leaf and tiller numbers per plant (**Figures I-2a, b**), but also leaf area (**Table I-1**) were significantly increased by N input at both cuts ( $P \leq 0.001$ ). No significant S effect was noted.

*T. repens* leaf number per plant and leaf area were slightly affected by N at cut 1 (**Table I-1**). At the 2<sup>nd</sup> cut, whatever N level, leaf number increased in response to S in both monoculture and mixture (**Figures I-3a, b**). Stolon number was slightly increased by N inputs at first cut ( $P \leq 0.05$ , **Table I-1**), but not at the 2<sup>nd</sup> cut (**Figures I-3c, d**). At this cut, it increased in response to S supply in both monoculture and mixture independently of N level.

## C. Root dry matter (DM)

*L. perenne* was more sensitive to N than to S supplies (**Figure I-4**): root DM was increased by 44 % in the  $N_{180}$  treatment ( $P \leq 0.001$ ) compared with  $N_0$  and  $N_{50}$  treatments. An  $N \times S$  interaction effect was revealed ( $P \leq 0.05$ ): in  $N_0$  monoculture and in all  $N_{180}$  treatments, a S supply promoted higher root DM (increased by 28% in  $S_{30}$  compared to  $S_0$  treatments).

*T. repens* was more sensitive to S than to N supplies (**Figure I-4; Table I-1**). N only slightly increased root DM: 15% higher at  $N_{180}$  compared with  $N_0$  ( $P \leq 0.05$ ; **Table I-1**). When *T. repens* was grown in a mixture, S supply significantly enhanced root DM at  $N_0$  and  $N_{50}$ : 40% higher at  $S_{30}$  compared with  $S_0$  ( $P \leq 0.001$ ). At  $N_{180}$ , S level had no effect ( $N \times S$  interaction). In monoculture, S effect was less significant. S supply significantly increased root DM, only in  $N_{180}$  treatments (+40%;  $P \leq 0.05$ ).

## D. Community structure and Competitive interactions

As a result of their different growth responses to N and S, the contribution to mixture standing DM of *T. repens* and *L. perenne* greatly varied at both cuts. At cut 1, *T. repens* mean contributions were respectively 52%, 39% and 38% at N<sub>0</sub>, N<sub>50</sub> and N<sub>180</sub> regardless of S supply (**Table I-2**). At cut 2, *T. repens* became dominant. It produced from 79% (S<sub>0</sub>) to approx. 88% (S<sub>15</sub>, S<sub>30</sub>) of total yield in N<sub>0</sub> treatments and from 68% (S<sub>0</sub>), to approx. 81% (S<sub>15</sub> and S<sub>30</sub>) at N<sub>50</sub>. At N<sub>180</sub>, *L. perenne* was more dominant; *T. repens* contributed to 51%, 63% and 59% of total yield respectively in S<sub>0</sub>, S<sub>15</sub> and S<sub>30</sub> treatments.

**Table I-2** : Effects of different levels of N and S supplies on % *T. repens* content in mixture.

Cut 1		S (kg ha <sup>-1</sup> )			Mean
		0	15	30	
N (kg ha <sup>-1</sup> )	0	56,9	47,0	51,5	51,8
	50	41,4	31,3	43,3	38,7
	180	41,7	39,1	34,7	38,5
Mean		46,7	39,1	43,2	

Significance of effects: N effect, \*\*\* $P \leq 0.001$ ; S effect, ns; N x S interaction, ns.

Cut 2		S (kg ha <sup>-1</sup> )			Mean
		0	15	30	
N (kg ha <sup>-1</sup> )	0	78,7	87,8	88,1	84,9
	50	68,3	81,3	81,8	77,1
	180	50,9	62,7	58,8	57,5
Mean		66,0	77,3	76,2	

Significance of effects: N effect, \*\*\* $P \leq 0.001$ ; S effect, \* $P \leq 0.05$ ; N x S interaction, \*\*\* $P \leq 0.001$ .

Considering replacement diagrams based on above-ground DM, *L. perenne* showed an almost straight line at cut 1 (**Figure I-1A**): individual DM were almost the same in mixture or monoculture, meaning that *L. perenne* was not subjected to competition or was equally subjected to intra- and interspecific competition. At cut 2 (**Figure I-1B**), in N<sub>50</sub> × S<sub>15</sub>, N<sub>180</sub> × S<sub>0</sub> and N<sub>180</sub> × S<sub>15</sub> treatments, a significant convex curve was noticed: above-ground growth appeared to be more constrained by intraspecific than by interspecific competition. In other treatments, *L. perenne* was equally subjected to intra- and interspecific competition.

In most N × S treatments at cut 1, *T. repens* was also not subjected to competition or was equally subjected to intra- and interspecific competition (straight line: **Figure I-1A**). But for N<sub>50</sub> × S<sub>15</sub> and N<sub>180</sub> × S<sub>30</sub> treatments, a significant concave curve was observed: above-ground growth was more suppressed by interspecific competition exerted by *L. perenne* than

by intraspecific competition. At cut 2, in almost every treatment *T. repens* appeared to be much more sensitive to intraspecific than to interspecific competition (**Figure I-1B**).

Considering replacement diagrams based on below-ground DM (**Figure I-4**), *L. perenne* root growth always appeared to be more suppressed by interspecific than intraspecific below-ground competition. This trend was significant in S<sub>15</sub> treatments and in N<sub>0</sub> S<sub>30</sub>. Conversely, in all treatments, *T. repens* root DM was more restricted by intraspecific than interspecific below-ground competition, this significantly in all S<sub>30</sub> and N<sub>50</sub> treatments.

#### **IV. Discussion**

##### **A. N : S effects on individual plant performance**

Considering DM production as well as leaf number and leaf area, *L. perenne* growth was much more limited by N than by S, whereas *T. repens* growth was highly limited by S and marginally by N. Our results confirmed that S only increases *L. perenne* above-ground DM at high N as suggested by Jones *et al.* (1973). According to Brown *et al.* (2000), it could be attributed to a higher N use efficiency induced by the enhancement of S availability. Our results demonstrate that it lies on a higher root foraging, root DM significantly increasing with S. As mentioned by Sinclair *et al.* (1996), *T. repens* above-ground DM was significantly increased by the application of S whatever N levels. Moreover, our results proved that when S is provided, N supply could increase *T. repens* yields even when it is submitted to *L. perenne* competition. Its regrowth after cutting was also much more efficient with S supply than with no S, projecting S as essential for physiological processes such as nutrient assimilation and utilisation during regrowth after defoliation. Multiplication and persistence of *T. repens* were also modulated by S. For instance, stolon number was increased. This could enhance potential competitive abilities as stolons are the means by which *T. repens* persists and colonises in grassland (Chapman 1987). That might imply a long-term competitive advantage compared to individuals growing in poor S soils.

##### **B. N : S effects on mixture composition and plant interactions**

We found that N : S ratio modulates DM production and proportion of both species when grown in a mixture. This was due to an alteration in their interactions and competitive

abilities. Response patterns were different at establishment (cut 1) then regrowth after cutting (cut 2).

At establishment, *L. perenne* was dominant in the N<sub>50</sub> and N<sub>180</sub> treatments, not in the N<sub>0</sub> treatment. Indeed, under low N conditions, *T. repens* has a comparatively high relative growth rate and can compete with grass by increasing N fixation (Woledge 1988). When N supplies increased, the relative above-ground production of *T. repens* decreased, in agreement with numerous studies in grasslands (Simon *et al.* 1997). In most treatments but N<sub>50</sub> S<sub>15</sub> and N<sub>180</sub> S<sub>30</sub>, this was not due to an increase in interspecific competition. However, in the two latter treatments, *L. perenne* however possessed a competitive advantage. This has been attribute to a more efficient N allocation to *L. perenne* above-ground growth (Davidson & Robson 1986, Thompson & Harper 1988, Collins *et al.* 2003), which give it a competitive advantage for light (Laidlaw & Withers 1998) and to a restriction of N<sub>2</sub> fixation by *T. repens* (Macduff *et al.* 1996; Murphy & Quirke 1997; Soussana *et al.* 2002). However, our results clearly show that, at this growth stage, N is not the only nutrient influencing competition, S availability should also be considered. In the S<sub>15</sub> treatment, N<sub>50</sub> benefited *L. perenne* growth compared to N<sub>0</sub>. *L. perenne* competed more efficiently for available S and restricted *T. repens* growth. Indeed, Gilbert & Robson (1984a) reported that, in annual communities, grasses, which have a well branched root system during the first growth stage compared to legumes, absorb more S at the expense of legumes. In N<sub>50</sub> S<sub>30</sub>, sufficient amount of S appeared to be available for both species and *T. repens* was not subjected to interspecific competition. This trend is in agreement with the findings of Walker & Adams (1958). They reported that with N fertilizer, a low rate of application of S increased grass (mostly *Anthoxanthum odoratum*, *Agrostis capillaris* and *Dactylis glomerata*) growth and suppressed clover, but that this suppression was overcome with higher S supply. In the N<sub>180</sub> S<sub>30</sub> treatment, supplementary available N enhanced the growth of *L. perenne* compared to N<sub>50</sub> and promoted an increase in competition for S to the detriment of *T. repens*. However, competition for S, when N supplies enhanced *L. perenne* growth, is not a sufficient explanation. In the S<sub>0</sub> treatment (= low S availability), N supplies increased *L. perenne* DM, without any effect on *T. repens* performance. Also, in the N<sub>180</sub> S<sub>15</sub> treatment, where S was less available than in N<sub>180</sub> S<sub>30</sub> treatment, no interspecific competition was noticed. All these results suggest that initial suppression of *T. repens* in grass-clover mixture should be dependent on the N : S ratio of the fertilizers applied. This also underlines the view that interactions between species may depend on both nutrient ratio and overall supply, as showed by Güsewell & Bollens (2003) for N : P ratio.

At regrowth, *L. perenne* dominance declined, possibly because of N depletion in N<sub>0</sub> and N<sub>50</sub> treatments. *T. repens* always had a higher DM than in cut 1 and became the dominant species in these treatments and co-dominant in N<sub>180</sub> mixture. This dominance could also be interpreted as a consequence of cutting regime or (and) a time lag in growth rates. Kessler & Nösberger (1994) showed that frequent cutting, such as in our experimental design, improves the light conditions and so performance of *T. repens*. Such asynchrony in species growth and dominance is well documented (Nassiri & Elgersma 1998) and has an important role in the cohabitation of species. *T. repens* dominance resulted in a strong relationship between its proportion and total herbage yield, as observed by Elgersma & Schlepers (1997). *T. repens* generally had a lower DM in monoculture than in mixture. Intraspecific competition was then higher than interspecific competition, even in N<sub>180</sub> mixture where *L. perenne* growth remained as high as in cut 1. For *L. perenne*, the significantly higher intraspecific than interspecific competition measured in S<sub>0</sub> and S<sub>15</sub> treatments could be induced by a low global interspecific competition or even by the appearance of a facilitation process. *T. repens* competes poorly with *L. perenne* for soil N, but is able to fix atmospheric N<sub>2</sub>. Moreover, it can transfer N resulting from N<sub>2</sub> fixation to *L. perenne* by root exudation (Høgh-Jensen & Schjoerring 1997; Elgersma *et al.* 2000; Paynel *et al.* 2001) and decomposition of dead roots (Høgh-Jensen & Schjoerring 2001).

## V. Conclusion

*L. perenne* and *T. repens* do not share the same N : S requirements. *L. perenne* growth is mostly enhanced by N, and only slightly by S at high N. *T. repens* growth is governed by S input and much less by N. So N : S ratio appears to modulate relative species abundance in mixtures. Concurrently, the enhancement of stolon growth promoted by S input, clearly establishes S fertilizer as a tool to control *T. repens* persistence in grass systems, and possibly to drive the leguminous – gramineous species ratio. As a major interest in the persistence of *T. repens* lies in its ability to fix atmospheric nitrogen and to release N into the soil to benefit other species, S supply could indirectly help to reduce the amount of N fertilisation. In grassland systems not supplied with S, the decrease in atmospheric inputs could cause a reduction in the abundance of leguminous species. According to our results, this change should be more effective in mesotrophic systems than in oligotrophic, low available N ones.

## **Acknowledgements**

MP Bataillé, P Beauclair, J Bonnefoy, R Segura and AF Ameline helped with the experimental work. T Gordon and anonymous referees improved the manuscript through helpful comments. Their assistance is gratefully acknowledged.

## **RÉSULTATS**

-

### **CHAPITRE II**

*Les disponibilités relatives en N et S affectent différemment  
l'efficacité d'utilisation de l'N et du S par *Trifolium repens* et *Lolium*  
perenne en cultures pures ou mixte  
(article 2)*

## Plan du Chapitre II des résultats

### *Préambule*

### **Abstract**

### **II. Materials and methods**

- A. Greenhouse experiment
- B. Treatments
- C. Plant chemical analyses
- D. Extraction and separation by SDS-PAGE of soluble proteins from stolons of *T. repens*
- E. Data analysis

### **III. Results**

- A. N yield (Shoot N content, N% DW) and uptake (NDFF, RNUE)
- B. S yield (Shoot S content, S% DW) and uptake (ASUE)
- C. Dry matter and changes in soluble proteins in stolons of *T. repens*

### **IV. Discussion**

### **V. Conclusion**

## CHAPITRE II

-

**N : S availabilities affect N and S use efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture**

**(Article 2)**

---

---

Tiphaine Tallec<sup>1</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1</sup>, Jean-Christophe Avice<sup>1</sup>, Fabien Lesuffleur<sup>1</sup>, Servane Lemauiel - Lavenant<sup>1</sup>, Jean-Bernard Cliquet<sup>1</sup>, Alain Ourry<sup>1</sup>

*Article soumis en février 2008*

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale Agronomie & nutritions N, C, S (EVA), Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

**Keywords:** N : S ratio, N and S yields, N<sub>2</sub> fixation, soluble proteins

## **Préambule**

La première expérience nous a permis de confirmer l'existence d'un effet S et de valider les hypothèses suivantes :

- (1) le S augmente la production de matière sèche,
- (2) l'effet du S dépend de l'espèce considérée,
- (3) l'effet du S varie en fonction du niveau de fertilité azotée du sol,
- (4) les effets du S varient en fonction de la situation de voisinage,
- (7) le S, dans un milieu riche en N, joue un rôle majeur dans l'occurrence des Fabacées au sein de la communauté.

Dans cette deuxième approche, notre objectif est d'expliquer ces effets en recherchant les mécanismes impliqués dans les dynamiques observées. Nos hypothèses sont que la disponibilité en S module l'efficacité d'absorption et d'utilisation de l'N et du S ainsi que leur mise en réserve (**hypothèse 5**), et que cette modulation est fonction de la co-disponibilité en N.

Reprenant le protocole expérimental du chapitre précédent, l'N est apporté sous forme d'engrais marqué à 5% avec du  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NH}_4$   $^{15}\text{NO}_3$ ). L'analyse isotopique des tissus récoltés des deux espèces nous permet de déterminer le devenir de l'N apporté au sein des populations et associations et l'efficacité réelle d'utilisation de l'N pour l'élaboration de la biomasse aérienne. Parallèlement, l'analyse des teneurs en S nous permet d'estimer le coefficient apparent d'utilisation du S. A la récolte finale, les protéines solubles des stolons de *T. repens*, principale réserve mobilisée lors de la repousse, sont également analysées quantitativement et qualitativement et considérées au regard de la biomasse totale de stolons produits.

Les résultats obtenus nous permettent de montrer que le gradient de S permet d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'N chez *T. repens*, de stimuler, voire de dé-réprimer la fixation de l'N atmosphérique chez cette espèce. La disponibilité en S conditionne également la quantité de réserves protéiques des stolons de trèfle et en modifie le profil.

**Abstract**

Deficiency of sulphur (S) has been recognised as a limiting factor for crop production in many regions in the world, mainly as a consequence of a massive decrease of atmospheric S inputs. In grasslands, S deficiency has been shown to alter competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne*. *T. repens* has been presented as more sensitive to S than *L. perenne* whereas the latter was more favoured by nitrogen (N) than *T. repens*. To establish the role of N and S availabilities on competitive interaction for these nutrients in mixture, two S rates (0 and 30 kg ha<sup>-1</sup>) combined with three N rates (0, 50 and 180 kg ha<sup>-1</sup>) were investigated in a cut/regrowth experiment over a period of 4 months. Both species were grown in monoculture and in mixture under glasshouse conditions. N was applied as <sup>15</sup>NH<sub>4</sub> <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> in order to determine the real species N use efficiency (RNUE). The apparent species S use efficiency (ASUE) was estimated using the S yields. At the final harvest, N reserves of *T. repens* stolons were analyzed to estimate their implication in the regrowth process. In monoculture and in both cuts (1 and 2), N benefited to both species increasing their N and S yields, while S benefited only to *T. repens*, mainly at regrowth phase (cut 2). In mixture, at establishment phase (cut 1), *L. perenne* behave as a better competitor than *T. repens* thanks to N, while at regrowth phase, *T. repens* dominated the community by a strong positive S effect on its performances. RNUE of *L. perenne* grown in mixture was greatly improved by S supply. For *T. repens*, S enhanced its ability to fix N<sub>2</sub>. S also improved the accumulation of soluble proteins in stolons of *T. repens*, then contributing to its capacity to regrowth and to survive in mixture. It was concluded that N : S ratio of soil may affect the functionality of grassland plant community and then their structure. The reduction of *T. repens* performances under low S conditions, suggest that (i) the shortage in S soil availability could restrict leguminous species growth in high N soil conditions, and (ii) the modulation of S level could be used as a tool to drive grassland community.

## I. Introduction

Sulphur (S) is an essential nutrient required for all living organisms. It is an essential constituent of cysteine, methionine, several co-enzymes, thioredoxins, sulpholipids and proteins (Droux *et al.* 2004). In the past, the requirement of S has been met by the presence of S in NKP fertilizers and by the deposition of atmospheric S from the industrial pollution; thus S-deficiency was rare. Nowadays, many regions suffer from a fundamental shift in the S balance toward deficit in agricultural systems for several reasons. One of the most important reasons is the massive decline in the deposition of S from atmospheric SO<sub>2</sub> emissions (from 1600 kt S in 1980 to less than 219 kt S in 2006 in France) due to industrial pollution control policies. These changes contribute to an increase of S deficiency in crops. Thus, the shortage in the S availability to the crop lowers the use of other nutrients, particularly nitrogen (N). Several physiological studies have established regulatory interactions between N and S assimilation in plants like tobacco (Barney & Bush 1985) or oilseed rape (Kopriva *et al.* 2000). Sulphur availability may regulate N utilization efficiency of plants and, thus photosynthesis, growth and dry mass accumulation of crops since photosynthates accumulation has a close relationship with N and S assimilation (Kopriva *et al.* 2000). However these interactions remain largely unknown for grassland species. S has been shown to be of considerable significance in grassland and hay production in Australia and in New Zealand (Walker *et al.* 1956; Sinclair *et al.* 1996a). Fabaceae appear to respond primarily with subsequent increasing yield whatever N level (Gilbert & Robson 1984a, b), whereas the response of rye-grass to S appears only at high N availability (Brown *et al.* 2000).

White clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) are two pastures dominant species. The persistence of an adequate rate of clover in mixture is of major interest in the maintenance of grass/clover association. N : S ratio appears to modulate relative *L. perenne*/*T. repens* abundance in mixtures (Tallec *et al.*, article 1). Tallec *et al.* (article 1) establishes that S fertilizer could be used as a tool to control *T. repens* abundance in cut grass systems, especially in a rich-N environment. In agreement with the findings of Walker & Adams (1958), their results suggest that S should be taken into account when considering the group of elements for which *L. perenne* competes intensely when grown with *T. repens*. This S effect on species balance and on *T. repens* persistence is poorly documented, in contrary to N effect. Indeed, *T. repens* and *L. perenne* have contrasting responses to soil mineral N availability. Ryegrass acquires most of its N from soil mineral N,

whereas clover can supplement uptake from the soil with N acquired by fixation of atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>). Incompatibility of clover persistence with N fertilisation has been frequently reported (Soussana & Arregui 1995; Tallec *et al.*, article 1). The persistence of clover depends largely on its ability to regrow after the removal of some of its photosynthetic surface. Because defoliation after cutting causes a marked reduction in acquisition from symbiotic fixation of N<sub>2</sub> (strong decrease of Nitrogenase activity) and/or mineral N uptake (Ourry *et al.* 1994; for a review on the specific effect of defoliation, see Volonec *et al.* 1996), the mobilisation of endogenous organic N reserves is crucial to meet the N requirements of new regrowing shoots during the first days following cutting (Ourry *et al.* 1989, Meuriot *et al.* 2004). Soluble proteins are one of the most important soluble N fraction in the main storage organs (stolons and roots) of *T. repens* (Corre *et al.* 1996). In perennial forage legumes such as *T. repens* (Corre *et al.* 1996) or *Medicago sativa* (Dhont *et al.* 2006), specific soluble proteins called vegetative storage proteins (VSP) are extensively mobilized to meet the N requirements of new shoot growth in spring or after cutting. Additionally, the storage level of soluble proteins as well as VSP is influenced by several environmental factors, such as N availability, temperature or photoperiod (Corre *et al.* 1996; Goulas *et al.* 2001, Noquet *et al.* 2003; Dhont *et al.* 2006), while the effect of S availability remains unknown. One of the major known factors affecting the accumulation of soluble proteins in forage leguminous is the mineral N availability (Meuriot *et al.* 2003). This element has been particularly studied, while S, to our knowledge, has never been investigated whereas metabolisms of both elements are closely linked. As S has positive effect on the production of clovers (Walker *et al.* 1956; Gilbert & Robson 1984a, b; Sinclair *et al.* 1996a), and particularly in the regrowth phases (Tallec *et al.*, article 1), this element may play an important role in the survival of *T. repens* in mixtures *via* a regulation from N-assimilation (Anderson 1990) to N accumulation in perennial organs. Therefore, as previously reported for N availability, the level of mineral S could have an impact on the accumulation of soluble proteins (including VSP) in perennial organs.

As the application of S has been shown to increase *L. perenne* production in pot experiment (Tallec *et al.*, article 1) and its N use efficiency in a field experiment (Brown *et al.* 2000), especially at high N, we hypothesis that higher dry matter yields of grass achievable with added S may be associated with greater N uptake. The second hypothesis is that S has a related physiological contribution to the competitive abilities and persistence of *T. repens* in community, in increasing N acquisition efficiency and storage. The third hypothesis is that both species response is altered by species neighbouring. The present investigation aims to

determine the impact of different N : S initial availabilities on (i) the nutrient status (N and S yields) of *L. perenne* and *T. repens* growing in monoculture and in mixture under cutting; (ii) the plant capacity to take up S and N, the latter being determined by  $^{15}\text{N}$  labelling and (iii) the quantitative and qualitative changes of the soluble proteins in stolons of *T. repens*. The first two points were analyzed at establishment phase (cut 1), where N was potentially ample available, and at regrowth phase (cut 2), where N limitation and competition between *L. perenne* and *T. repens* was exacerbated. The last point was determined at the end of the experiment (cut 3).

## II. Materials and methods

### A. Greenhouse experiment

Ryegrass (*Lolium perenne* cv. Bravo) and white clover (*Trifolium repens* cv. Huia) were cultivated in a greenhouse experiment in monoculture and in mixture with a homogeneous and nutrient-poor soil as previously described (Tallec et al., article 1). It was a silty-clay soil (clay content: 36.7%, silt content: 41.3%), and the organic matter content was 4.2%. The total N and S contents of the soil was respectively 3.18‰ and 1‰. After 3 weeks of germination, 8 seedlings per pot were established in a regular pattern, pots consisted either in monoculture of the two species or in their 0.5:0.5 mixture (4 seedlings of each species per pot). *T. repens* plants were inoculated with a standard mixture of *Rhizobium trifolii* T354 known to support  $\text{N}_2$  fixation.

### B. Treatments

Fertilizers were applied once at species establishment in order to obtain a constraining N nutrition for *T. repens* at establishment phase and limiting N availability at regrowth phase. Six initial fertility levels were obtained by crossing three N levels with two S levels. S was applied as calcium sulphate ( $\text{CaSO}_4$ ) at a rate of 0 (LS, low S availability) and 30 kg S  $\text{ha}^{-1}$  (HS, high S availability: 46 mg S per pot). N was applied as ammonium nitrate at 0 (LN, low N availability), 50 kg S  $\text{ha}^{-1}$  (IN, intermediate N availability: 77 mg N per pot) and 180 kg S  $\text{ha}^{-1}$  (HN, high N availability: 277 mg per pot), labelled with 5% atom  $^{15}\text{N}$  excess to quantify N use efficiency by each species. A basal mix of potassium (150 kg K  $\text{ha}^{-1}$ : 231 mg K per pot)

and phosphorus (60 kg P ha<sup>-1</sup>: 92 mg P per pot) as K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was applied to each pot, at the same time. Pots receiving no CaSO<sub>4</sub> were supplemented with CaCl<sub>2</sub>, so that each pot received the same Ca amount. Four pots were used as replicates for each treatment, and the pots were moved twice a week to avoid any positional effect. The soil moisture content in each pot was kept at ± 25 % (relative to dry weight) by weighing the pots once a week and watering them with osmotic water 4 times a week during the experiment. Air temperature was kept at 20/16 ± 2°C (day/night). Plants were grown under natural light from germination to implantation (day 0), and then supplemented by artificial illumination (400 W high-pressure sodium lamps, Phytoclaude) providing 300 μmol/m<sup>2</sup>/s PAR (photosynthetically active radiation) at plant height with a 16/8h photoperiod.

### C. Plant chemical analyses

Three cuts were harvested at 5 cm plant height for chemical analyses of the total above-ground matter, first 42 days after planting (cut 1), second 42 days later (cut 2) and third 44 days later (cut 3). At the end of the experiment (cut 3), stolons of *T. repens* were separated and an aliquot of 450 mg of fresh matter was kept at -80°C until further analysis of soluble protein concentration and electrophoresis. The fresh material was dried at 65 °C for 48 h for the determination of dry weight (DW) and mineral concentration of N and S. Plant material were finely powdered. N and S contents and <sup>15</sup>N abundance were estimated using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument). Natural <sup>15</sup>N abundance (0.3663% ± 0.0004) of atmospheric N<sub>2</sub> was used as a reference for <sup>15</sup>N analysis. In the above-ground plant biomass, the quantity of N derived from fertilizer (NDFE) was calculated by isotope mass balance as:

$$NDFE(\%) = \frac{E^{15}N_{plant}}{E^{15}N_{fert}} \times 100$$

where N<sub>plant</sub> are the total N content in the above-ground biomass per plant and E the isotopic excess.

The real N and apparent S fertilizers use efficiency coefficients (RNUE and ASUE, respectively) were calculated per plant as:

$$RNUE = \frac{N_{plant} \times NDF}{N_{fert}}$$

$$ASUE = \frac{S_{plant.HS} - S_{plant.LS}}{S_{fert}} \times 100$$

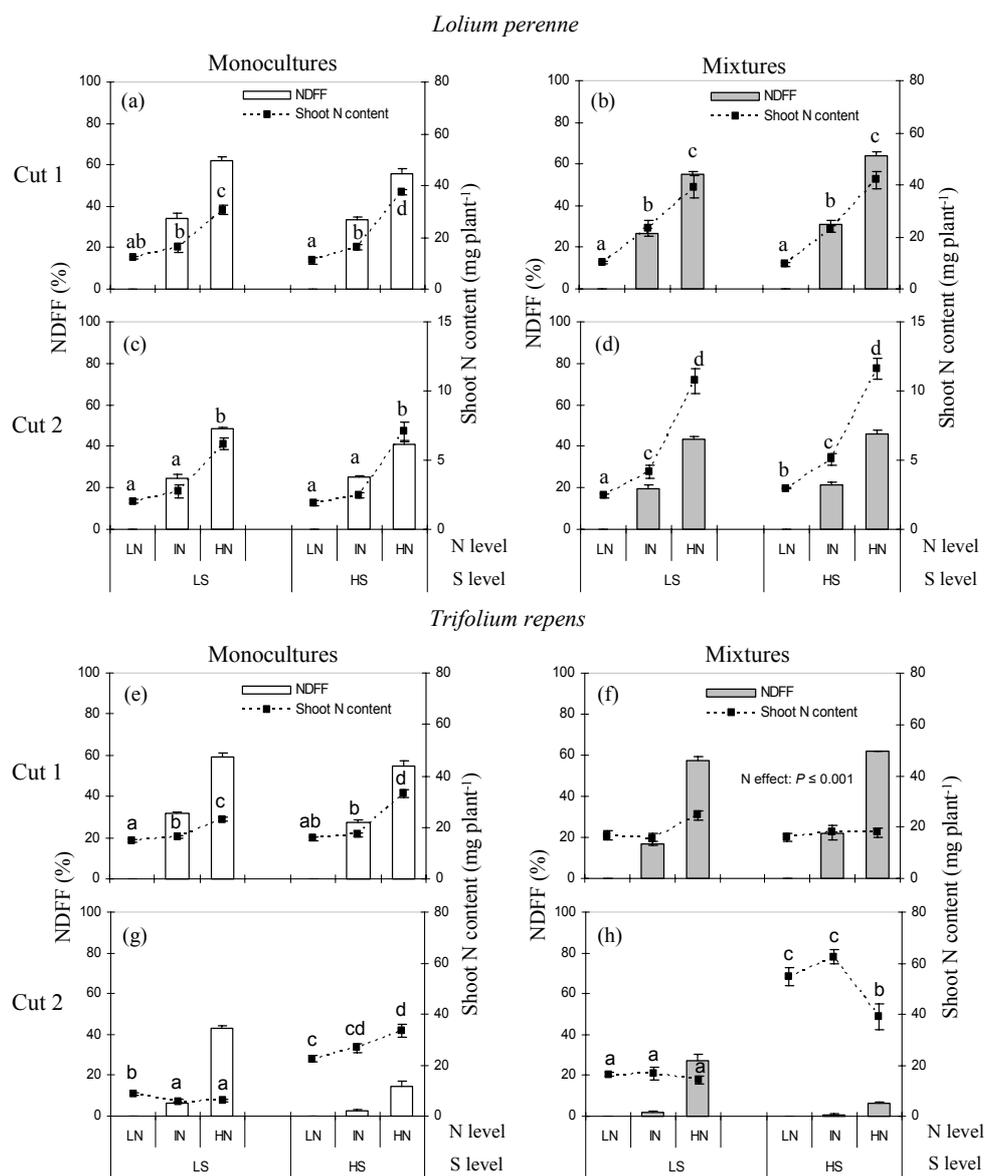
where  $S_{plant.HS}$  is the total S content in the above-ground biomass at high S level;  $S_{plant.LS}$ , the total S content in the above-ground biomass at low S level (non S fertilized pot);  $S_{fert}$  the amount of applied S fertilizer and  $N_{fert}$  the amount of applied N fertilizer.

#### D. Extraction and separation by SDS-PAGE of soluble proteins from stolons of *T. repens*

Frozen stolon samples (450 mg fresh weight) were ground in a mortar with liquid nitrogen and extracted in citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM  $Na_2HPO_4$ , pH 6.8) in the presence of 150 mg PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone). The homogenate was centrifuged at 12000 g, 4°C for 1h. The resulting supernatant was used for determination of total soluble proteins by protein-dye staining (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard. For detection of total soluble proteins, 3 µg (one volume of each triplicate mixed) were prepared in 2× Laemmli lysis buffer (Laemmli 1970) containing β-mercaptoethanol (5% v/v). SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) using a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 15% polyacrylamide (w/v) resolving gel. Equal amounts of protein (3 µg) were loaded into the gel. Gels were stained with the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987). Gels were scanned with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer) and analyzed using the Millipore BioImage computerized image analysis system by measurement of integrated intensity. The molecular mass was estimated by comparison with standard markers of molecular mass.

#### E. Data analysis

Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) and significantly different means between treatments were separated with the Tukey's multiple range test ( $P \leq 0.05$ ). When variables did not satisfy normality due to culture effects, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to test N effect, S effect and treatment effect (N+S) as it does



**Figure II-1 :** Shoot N content and N derived from fertilizer (NDFFF) in *Lolium perenne* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture and in *Trifolium repens* grown (e, g) in monoculture and (f, h) in monoculture, at cuts 1 and 2, along the N and S gradients.

Lines : shoot N content (right vertical axis; note the changed scales for this axis); Histograms : NDFFF (N derived from fertilizer expressed as percentage of shoot N content; left vertical axis). Bars are mean  $\pm$  SE (n = 4). Two different letters indicate a significant difference; \* $P \leq 0.05$ .

**Table II-1 :** Effect of different N and S levels on the mean N % in shoot DW per plant of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*, at cuts 1 and 2.

Two different minus letters indicate a significant difference (Tukey test or Mood median test) between treatment in monoculture (mono; 8 plants of each species) and two different major letters indicate a significant difference between treatment in mixture (mix; 4 plants of each species) within each species and cut; \* $P \leq 0.05$ .

		N% DW							
		<i>Lolium perenne</i>				<i>Trifolium repens</i>			
		mono		mix		mono		mix	
		LS	HS	LS	HS	LS	HS	LS	HS
Cut1	LN	2,62 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup>	2,93 <sup>AB</sup>	2,36 <sup>A</sup>	3,69 <sup>a</sup>	3,64 <sup>a</sup>	3,27 <sup>A</sup>	3,74 <sup>B</sup>
	IN	4,13 <sup>ab</sup>	3,97 <sup>b</sup>	2,30 <sup>A</sup>	2,62 <sup>AB</sup>	3,79 <sup>a</sup>	4,06 <sup>b</sup>	3,05 <sup>A</sup>	3,44 <sup>A</sup>
	HN	6,75 <sup>c</sup>	6,16 <sup>c</sup>	3,81 <sup>BC</sup>	4,12 <sup>C</sup>	5,51 <sup>c</sup>	5,36 <sup>c</sup>	4,68 <sup>C</sup>	4,61 <sup>C</sup>
Cut 2	LN	1,03 <sup>a</sup>	0,94 <sup>a</sup>	1,09 <sup>A</sup>	1,41 <sup>C</sup>	1,79 <sup>a</sup>	3,40 <sup>c</sup>	1,98 <sup>A</sup>	3,48 <sup>B</sup>
	IN	1,00 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>	1,13 <sup>A</sup>	1,29 <sup>BC</sup>	1,52 <sup>a</sup>	3,36 <sup>c</sup>	2,10 <sup>A</sup>	3,48 <sup>B</sup>
	HN	1,32 <sup>b</sup>	1,05 <sup>a</sup>	1,56 <sup>C</sup>	1,47 <sup>C</sup>	1,67 <sup>a</sup>	3,45 <sup>c</sup>	1,98 <sup>A</sup>	3,39 <sup>B</sup>

not test the N×S interaction. When H-values were significant, datas were subjected to Mood median test to determine which means differed significantly.

### III. Results

Only data for the 1<sup>st</sup> cut (establishment phase) and the 2<sup>nd</sup> cut (regrowth after cutting) are presented, because results from the 3<sup>rd</sup> cut followed the same trend as the 2<sup>nd</sup> one.

#### A. N yield (Shoot N content, N% DW) and uptake (NDFE, RNUE)

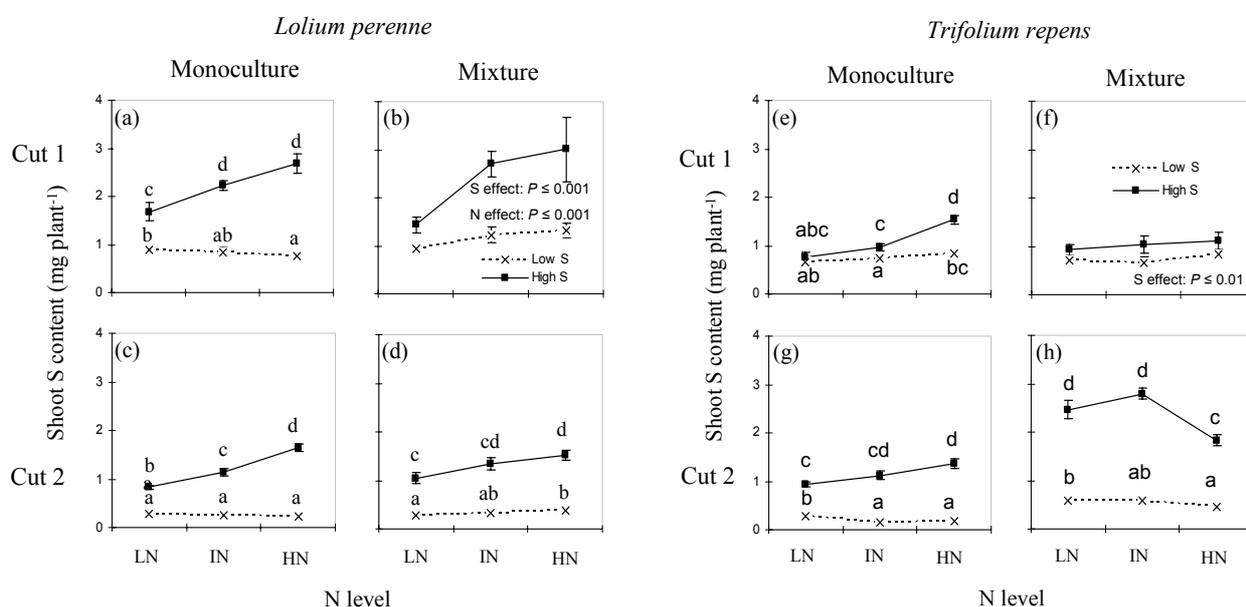
For *L. perenne*, shoot N content and N derived from <sup>15</sup>N labelled fertilizer (NDFE%, **Figure II-1**) were increased by N fertilization, irrespective of culture condition or cuts (monoculture *versus* mixture; **Figures II-1a, c** *versus* **Figures II-1b, d**). N effect on N% DW depended on cut and S level. At cut 1, N enhanced N% DW (**Table II-1**). At cut 2, it significantly increased N% at LS only, in both monoculture and mixture. S fertilization slightly increase shoot N content or N derived from fertilizer of *L. perenne* only in HN monoculture at cut 1 (by 1.2, LS *versus* HS, **Figure II-1a**) and in LN mixture at cut 2 (LS *versus* HS, **Figure II-1d**). Between cut 1 (**Figures II-1a, b**) and cut 2 (**Figures II-1c, d**), while N derived from fertilizer slightly decreased, shoot N content decreased more drastically, but remained higher by about two-fold in mixture than in monoculture (**Figure II-1d** *versus* **Figure II-1c**). N% DW in the shoot of *L. perenne* at cut 2 was also higher when grown with *T. repens* (left side of **Table II-1**). Moreover, high S increased N% DW in the shoot of *L. perenne* when grown as mixture whereas it decreased it when grown as monoculture (**Table II-1**).

The recovery of <sup>15</sup>N labelling in the shoot, allowed the calculation of real N use efficiency (RNUE; **Table II-2**). Most of <sup>15</sup>N was recovered at the first cut, from 50% to 60% of applied fertilizer (calculated from 8 plants in monoculture and from 4 plants of each species in mixture), and then less than 10% at the second cut. Increasing N availability modified RNUE of *L. perenne* only at cut 2: RNUE was 1.3 times higher in HN than in IN monoculture and mixture (left side of **Table II-2**). Very clearly, S fertilization strongly increased RNUE for *L. perenne* only when grown with *T. repens*, and whatever the N level (IN or HN) or cut. As a result, RNUE found in mixture always exceeded that found in monoculture, especially at HS (**Table II-2**).

**Table II-2** : Effect of different N and S levels on the mean RNUE (real N use efficiency as % of <sup>15</sup>N-fertilizer applied) per plant of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*, at cuts 1 and 2.

Two different minus letters indicate a significant difference (Tukey test or Mood median test) between treatment in monoculture (mono; 8 plants of each species) and two different major letters indicate a significant difference between treatment in mixture (mix; 4 plants of each species) within each species and cut; \**P* ≤ 0.05.

		RNUE							
		<i>Lolium perenne</i>				<i>Trifolium repens</i>			
		mono		mix		mono		mix	
		LS	HS	LS	HS	LS	HS	LS	HS
Cut 1	IN	7,04 <sup>NS</sup>	7,04 <sup>NS</sup>	7,72 <sup>A</sup>	9,32 <sup>B</sup>	6,74 <sup>b</sup>	6,17 <sup>b</sup>	3,24 <sup>A</sup>	5,05 <sup>B</sup>
	HN	6,81 <sup>NS</sup>	7,53 <sup>NS</sup>	7,75 <sup>A</sup>	9,60 <sup>B</sup>	4,91 <sup>a</sup>	6,50 <sup>b</sup>	5,11 <sup>B</sup>	4,42 <sup>AB</sup>
Cut 2	IN	0,84 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a</sup>	1,05 <sup>A</sup>	1,39 <sup>B</sup>	0,49 <sup>a</sup>	0,96 <sup>b</sup>	0,41 <sup>A</sup>	0,69 <sup>AB</sup>
	HN	1,07 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	1,67 <sup>C</sup>	1,94 <sup>D</sup>	0,96 <sup>b</sup>	1,67 <sup>c</sup>	1,38 <sup>C</sup>	0,85 <sup>BC</sup>



**Figure II-2** : Shoot S content of *Lolium perenne* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture and of *Trifolium repens* grown (e, g) in monoculture and (f, h) in monoculture at cuts 1 and 2 under low (dashed lines) and high (solid lines) S availability along the N gradient level. Bars are mean ± SE (n = 4).

Two different letters indicate a significant difference; \**P* ≤ 0.05.

**Table II-3** : Effect of different N and S levels on the mean S% in shoot DW per plant of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*, at cuts 1 and 2.

Two different minus letters indicate a significant difference (Tukey test or Mood median test) between treatment in monoculture (mono; 8 plants of each species) and two different major letters indicate a significant difference between treatment in mixture (mix; 4 plants of each species) within each species and cut; \**P* ≤ 0.05.

		S% DW							
		<i>Lolium perenne</i>				<i>Trifolium repens</i>			
		mono		mix		mono		mix	
		LS	HS	LS	HS	LS	HS	LS	HS
Cut1	LN	0,23 <sup>a</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,25 <sup>B</sup>	0,36 <sup>C</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,22 <sup>D</sup>
	IN	0,15 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,17 <sup>A</sup>	0,40 <sup>C</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>c</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,20 <sup>C</sup>
	HN	0,12 <sup>a</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,17 <sup>A</sup>	0,36 <sup>C</sup>	0,20 <sup>bc</sup>	0,25 <sup>c</sup>	0,16 <sup>B</sup>	0,26 <sup>E</sup>
Cut 2	LN	0,14 <sup>c</sup>	0,43 <sup>e</sup>	0,13 <sup>C</sup>	0,49 <sup>F</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,07 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>
	IN	0,10 <sup>b</sup>	0,44 <sup>e</sup>	0,09 <sup>B</sup>	0,34 <sup>E</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,07 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>
	HN	0,05 <sup>a</sup>	0,25 <sup>d</sup>	0,05 <sup>A</sup>	0,19 <sup>D</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,06 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>

*T. repens*, due to its capacity to fix atmospheric N, showed a more complex pattern than *L. perenne* between cuts 1 and 2. At cut 1 and whatever the culture type, increasing N improved *T. repens* shoot N content, N derived from fertilizer, from 20 to 30 % under IN to 60% under HN (**Figures II-1e, f**), and N% DW (right side of **Table II-1**). At cut 2, for which a limitation of N availability was expected, N increased shoot N content only in HS monoculture (**Figure II-1g**), whereas it partly negatively affected it in HS mixture (**Figure II-1h**). Shoot N content at LS remained similar whatever the N level, suggesting in this case a deficiency for S that was not found for *L. perenne* (**Figures II-1c, d**). The response of *T. repens* in term of N% DW (**Table II-1**) further supported the previous results, as N% DW in the shoot was i) decreased between cuts 1 and 2, ii) strongly increased between low S and high S at cut 2, iii) slightly decreased by *L. perenne* competition at cut 1, while iv) an opposite trend was noticed at cut 2 (higher N% DW in mixture). Overall, N yield of *T. repens* was increased by more than two-fold between LS and HS (**Figures II-1g, h**), showing its highest competitive ability under LN availability if sufficient S level was available. On the contrary, S significantly decreased N derived from fertilizer, especially in HN treatment in both culture types at cut 2 (**Figures II-1g, h**).

The efficiency with which *T. repens* used N from fertilizer was always lower than that found for *L. perenne*. At cut 1, N altered RNUE of *T. repens* in LS treatment, decreasing it in monoculture, but increasing it in mixture (right side of **Table II-2**). At cut 2, N increased RNUE in all treatments. As previously found for *L. perenne* in mixture, S generally increased RNUE of *T. repens* whatever the cut, except in HN mixture (**Table II-2**).

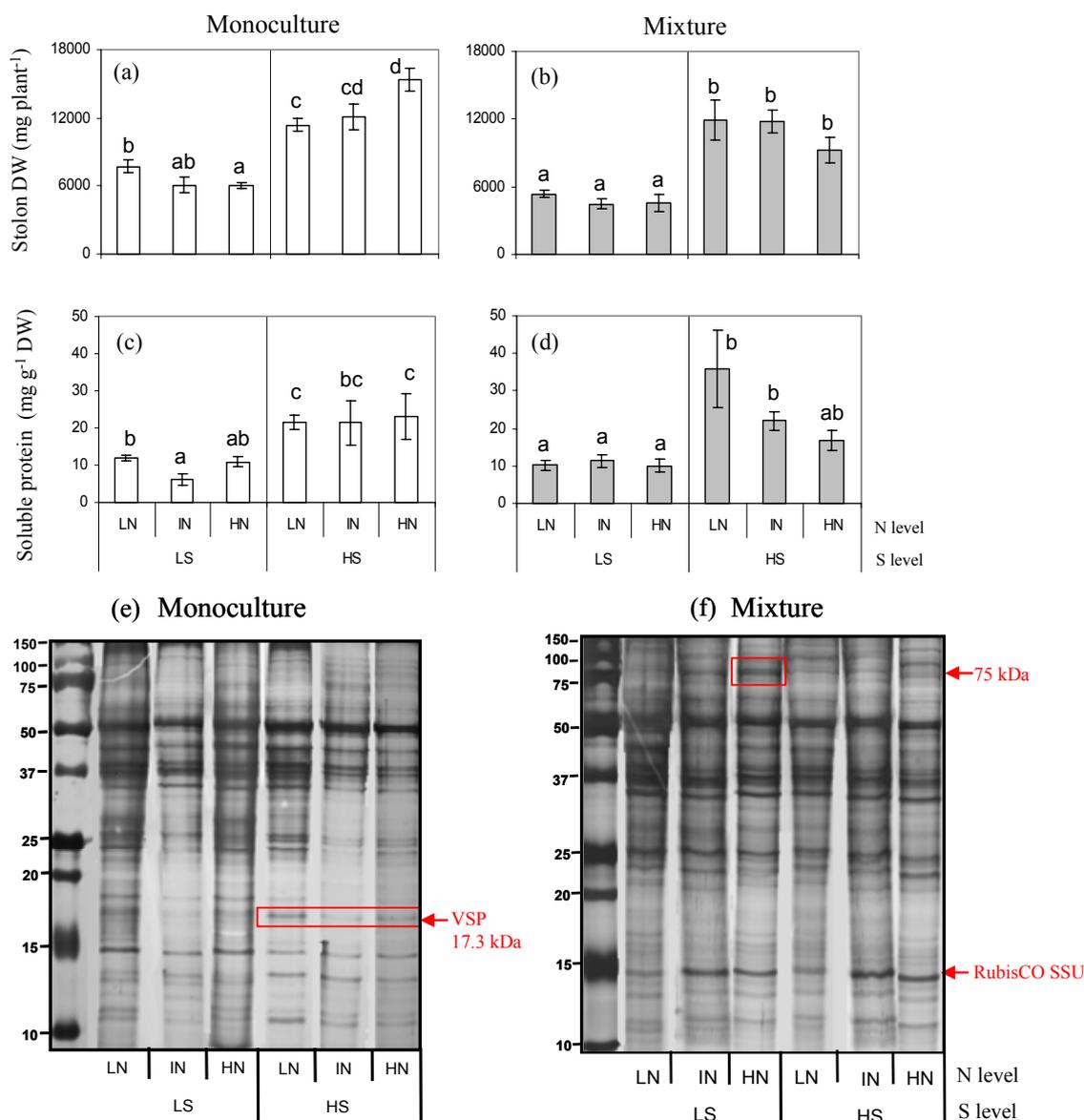
## B. S yield (Shoot S content, S% DW) and uptake (ASUE)

The shoot S content of *L. perenne* (**Figures II-2a, b, c, d**) increased with S supply and in such case was even higher when plants received N fertilization. This general trend was independent of cut or culture type (monoculture, **Figures II-2a, c**; mixture, **Figures II-2b, d**). Accordingly, S% DW in the shoot of *L. perenne* (left side of **Table II-3**), was increased by 2 to 3-fold by S supply without any effect of N level at the first cut, while at the second cut, S% DW decreased along the N gradient.

**Table II-4 :** Effect of different levels of N on the mean ASUE (apparent S use efficiency as % of S-fertilizer applied) per plant of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*, at cuts 1 and 2.

Two different minus letters indicate a significant difference (Tukey test or Mood median test) between treatment in monoculture (mono; 8 plants of each species) and two different major letters indicate a significant difference between treatment in mixture (mix; 4 plants of each species) within each species; \* $P \leq 0.05$ .

		ASUE			
		<i>Lolium perenne</i>		<i>Trifolium repens</i>	
		mono	mix	mono	mix
Cut 1	LN	1,72 <sup>a</sup>	1,06 <sup>NS</sup>	0,35 <sup>a</sup>	0,50 <sup>NS</sup>
	IN	3,00 <sup>b</sup>	3,19 <sup>NS</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,82 <sup>NS</sup>
	HN	4,16 <sup>b</sup>	3,67 <sup>NS</sup>	1,52 <sup>b</sup>	0,57 <sup>NS</sup>
Cut 2	LN	1,19 <sup>a</sup>	1,64 <sup>A</sup>	1,43 <sup>a</sup>	4,08 <sup>B</sup>
	IN	1,89 <sup>b</sup>	2,18 <sup>AB</sup>	2,10 <sup>b</sup>	4,81 <sup>B</sup>
	HN	3,09 <sup>c</sup>	2,47 <sup>B</sup>	2,57 <sup>b</sup>	2,98 <sup>A</sup>



**Figure II-3 :** Soluble protein concentration (in mg per gram of dry weight) and dry weight of stolon of *Trifolium repens* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture at cut 3 along the N and S gradients. Bars are mean  $\pm$  SE (n = 4). Two different letters indicate a significant difference; \* $P \leq 0.05$ .

Changes in SDS-PAGE profiles of soluble proteins, extracted from stolon of *Trifolium repens* grown (e) in monoculture and (f) in mixture along the N and S gradients.

The apparent S use efficiency (ASUE), calculated from the balance of S recovered in shoot of plants with (HS) or without (LS) S fertilization is given in **Table II-4**. ASUE of *L. perenne* always increased along the N gradient whatever the cut and the culture type, being of the same magnitude in both monoculture and mixture.

For *T. repens*, at both cuts, S supply increased shoot S content (**Figures II-2e, f, g, h**) which was even higher when N was applied, in monoculture only (**Figures II-2e, g**). At cut 2 HN supply negatively affected shoot S content in mixture (**Figure II-2h**). The S% DW in the shoot of *T. repens* was roughly increased by S supply (right side of **Table II-3**), but did not reach values as high as those found for *L. perenne*. Increasing N availability also increased the S% DW of *T. repens*, only at cut 1 (**Table II-3**). Moreover the S% DW decreased between cuts 1 and 2.

The apparent S use efficiency of *T. repens* given in **Table II-4**, was lower at cut 1 than that of *L. perenne*, but similar or higher at cut 2. When grown in monoculture, N supply increased ASUE, while when grown in mixture, at cut 2, high N decreased it (**Table II-4**). In mixture, ASUE of *T. repens* reached higher values than in monoculture, except at high N level.

### C. Dry matter and changes in soluble proteins in stolons of *T. repens*

The stolon growth of *T. repens*, estimated by dry weight (**Figures II-3a, b**) as well as soluble protein concentration (**Figures II-3c, d**) were unaffected by N supply (except a slight increase of stolon DW in HS monoculture; **Figure II-3a**). They were significantly increased by S supply. S increased stolon DW on average by 40% (**Figures II-3a, b**) and doubled soluble protein concentration (**Figures II-3c, d**). Similar values were found in monoculture and in mixture grown with *L. perenne*.

SDS-PAGE electrophoresis revealed that relative abundance of some proteins slightly changes along the N and S gradients (**Figures II-3e, f**). The VSP at 17.3 kDa was slightly accumulated for HS only in monoculture, whatever N level (**Figure II-3e**). In mixture, the abundance of RubisCO small subunit (SSU) at 15 kDa increased along the N gradient whatever the S level (**Figure II-3f**). This could be related to a high photosynthetic rate of this

tissue resulting from *L. perenne* competition. The same pattern was observed in mixture for a protein of 75 kDa only under LS (**Figure II-3f**).

#### **IV. Discussion**

The present set of experiment focused on competitive interaction between two dominant grassland species, *L. perenne* and *T. repens*, under variable levels of N and S availabilities. Although other mechanisms may be involved to explain competition amongst which competition for light is of prime importance, our work was conducted on relatively short term and included defoliation, which may reduce this kind of competition. The growth culture could be divided in two successive phases: establishment of plants with different and potentially ample availabilities of N and S, and a regrowth period during which N deficiency may exacerbate the competition for nutrient between the grass and the legume. Analysis of plant N and S use efficiency in monoculture and in mixture was then used to identify specific effect of competition.

When grown in monoculture, both species benefited from increasing N availability as expected (e.g. Jones *et al.* 1973; Marschner 1986; McKenzie 1996), even *T. repens* at establishment phase, during which N<sub>2</sub> fixation was poorly established. Such effects can be seen through the increased amount of N content in the shoots (**Figures II-1a, c, e, g**) and through the highest values of N derived from fertilizer. In monoculture, at regrowth phase, shoot N content of *T. repens* was also increased by S supply while that of *L. perenne* was not affected. It appears then that the S requirement is higher for the legume than for the grass. The real N (**Table II-2**) and apparent S (**Table II-4**) use efficiencies were nearly in all cases higher in *L. perenne* than in *T. repens*, except when N deficiency at regrowth phase reduced *L. perenne* growth. This illustrates the competitive ability of *L. perenne* for nutrient capture when its growth is not limited by one of them and projects this species as the best performer. Rye grass species have a deeper and a better prospective branched root system during the first growth stage than legumes, and can probably absorb more S at the expense of the latter, especially under HN availability as proved by Gilbert & Robson (1984c) on annual species, *L. rigidum* and *T. subterraneum*.

When grown in mixture, and therefore under competition, both species were submitted to different situations in our experiment: potentially an ample availability of N during the establishment phase that may even reduces the capacity of *T. repens* to fix N<sub>2</sub>, followed by a progressive N deficiency before the second cut. Therefore such resulting competition has to be analyzed through the interaction of N and S availabilities, species performance for nutrient capture, progressive increase of N<sub>2</sub> fixation by *T. repens* and interaction between these different processes. During the establishment period (up to cut 1), *L. perenne* clearly behave as a better competitor than *T. repens*. This can be illustrated by higher shoot N (**Figure II-1b versus Figure II-1f**) and S contents (**Figure II-2b versus Figure II-2f**) and higher N and S use efficiencies (**Tables II-2 and II-4**) being further increased with higher N and S availabilities. Moreover, *L. perenne* grows faster and can exert a negative effect on the performances of adjacent *T. repens* plants, for example by altering the quality and quantity of light which infiltrates through the canopy, necessary to growth (Thompson & Harper 1988). This shading may explain the poor N<sub>2</sub> fixation and the subsequent restriction of *T. repens* growth, compared to monoculture, as Haynes (1980) proved that it induces rapid nodule senescence and so restricts N<sub>2</sub> symbiotic fixation.

During the regrowth period, the reduction in N availability, as illustrated by the strong decrease in N use efficiency (**Table II-2**) of *L. perenne*, changed the mineral environment which became more favourable for *T. repens*. *T. repens* dominance can be seen through a higher N yield than that of *L. perenne* (**Figure II-1h and Table II-1**) and through the very strong positive effect of S supply which reduced the amount of N derived from fertilizer. In such case, it seems clear that the advantage of *T. repens*, relied to its capacity to fix N<sub>2</sub>, resulting from a lower inhibition by mineral N. Indeed, at low N, 100% of *T. repens* shoot N content depended on fixation or other pools (low soil N reserves, N remobilisation from other plant organs), at intermediate N 97% and at high N 70% (**Figure II-1h**). This negative N effect on clover had been described by numerous authors (Macduff *et al.* 1996; Soussana *et al.* 2002). They explained this phenomenon by a decrease in nodule number and dry weight and by a direct effect of nitrate on nitrogenase activity. However our results are original data, as they show that initial S supply probably increases N<sub>2</sub> fixation by *T. repens* and lowers N depressive effect on that species. This is illustrated by an increasing N yield in the shoot, combined with a lowering value of N derived from fertilizer (**Figure II-1h**). This resulted in acquisition of other pools than fertilizers applied, corresponding to 98% of total shoot N content at intermediate N and 93% at high N. In a different legume species, *Medicago sativa*, DeBoer & Duke (1982) attributed the loss of N<sub>2</sub> fixation to S deficiency, as S deprivation

restored N yield. At high N, S beneficial effect on shoot N content of *T. repens* was lower than at intermediate N availability. *L. perenne* neighbouring appeared to lower S effect by competing for S and decreasing S uptake of *T. repens* as shown in **Table II-4**. Moreover, at high N and S availabilities, *T. repens* shoot S content significantly fell (**Figure II-2h**). However, S effect on N<sub>2</sub> fixation was still high. This indirect S effect explains the increasing dry matter production of clover species under S fertilization, reported by Tallec *et al.* (article 1). Different physiological mechanisms may explain this S effect. Scherer & Lange (1996) and Habtemichial *et al.* (2007), found that S fertilization increased nodule number and nodule fresh weight of many legume species (*Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Vicia faba* and *Pisum sativum*), especially by enhancing root growth. Another regulatory process may be suggested: Janssen & Vitosh (1974) showed that S limitation triggers an increase in amino-acid content in plant tissue, which may subsequently down-regulates N<sub>2</sub> fixation. However, when nutrient use efficiency is considered, it seems clear that *T. repens*, under competition with *L. perenne*, strongly increased its S use efficiency (**Table II-4**) as ASUE values were closed or even doubled in mixture. Similarly, when N<sub>2</sub> fixation by *T. repens* is increased by S fertilization, more mineral N is available for *L. perenne* which maximize its nitrogen use efficiency (RNUE; see **Table II-2**), probably due to lower competition of *T. repens* that derives most of its N from fixation.

Even if nutrient capture fell for *L. perenne* at regrowth phase, S still enhanced the N use efficiency of the remaining N fertilizer (**Table II-2**). This resulted in an increase in N% DW at low and intermediate N availabilities (**Table II-1**), and even in a significant increase in shoot N content at low N. In that latter case, S effect may be linked with the high performance of *T. repens*, whose N nutrition depended mostly on N<sub>2</sub> fixation. As already discussed, fixation was strongly enhanced by S. *L. perenne* could then benefited from higher N transfer from *T. repens*. *L. perenne* could so benefited from an indirect S effect *via T. repens*.

Others mechanism may be involved to explain competition process amongst grassland species, submitted to frequent defoliation, and amongst which the ability to mobilize N reserves (Volenc *et al.* 1996), such as VSP (Corre *et al.* 1996; Goulas *et al.* 2001), can maximize regrowth potential and subsequent photosynthesis. Our results show that S allows high colonization ability as stolons are the means by which *T. repens* persists and colonises in grassland (Chapman 1987). That might imply a long-term competitive advantage compared to

individuals growing in poor S soils. S may also induce a high competitive advantage during regrowth after cutting. Indeed, initial S supply strongly enhanced the accumulation of soluble protein in stolons. This increase was correlated with the enhancement of N<sub>2</sub> fixation. This effect demonstrates that S input also modifies N allocation to storage organs. However, S availability did not clearly affect specifically the main storage form of N, such as VSP, but it does not exclude that soluble protein in general may be able to be remobilized to support the growth of new tissues after defoliation. This S effect should be particularly crucial under high N condition, to allow *T. repens* persistence in intensive grasslands as S appears to be seriously implied in the regrowth process of *T. repens*. Future work will need to identify the specific protein involved.

## **V. Conclusion**

The overall findings indicate that S fertilisation may lead to improve N use efficiency. In temporary grassland, *L. perenne* and *T. repens* have to compete with neighbour of their own and other species to colonize gap in the sward canopy. Their success in colonizing horizontal and vertical space depends partly on rapid dry matter accumulation and subsequently on nutrient uptake abilities and mobilisation. A significant effect of S was achieved on the N use efficiency of *L. perenne* while it greatly increased N yield of *T. repens*, by stimulating the N<sub>2</sub> fixation process. The uptake of both N and S and their assimilation seemed to be mutually regulated denoting the existence of a strong link between both metabolic pathways. Moreover, S improved the capacity of *T. repens* to persist in N-rich environment, enhancing the accumulation of soluble proteins in stolon for both stolon growth and leaf development after defoliation. Without S, *T. repens* was a poor performer. Finally, since *T. repens* brings N into the soil, that benefits other species, S inputs should be recognized as a tool and integrated in fertilizers in order to minimize N fertilization unfavourable effects like the disappearance of legumes in intensive grassland.

## **Acknowledgment**

We gratefully acknowledge MP Bataillé, P Beauclair, J Bonnefoy, R Segura and AF Ameline for help with the experimental work and E. Personeni for helpful comments on the manuscript.

## **RÉSULTATS**

-

### **CHAPITRE III**

*Effets d'un double gradient N : S sur la performance des plantes,  
l'efficience d'utilisation de l'N et du S et la communauté prairiale  
(article 3)*

## Plan du Chapitre III des résultats

### *Préambule*

### **Abstract**

### **I. Introduction**

### **II. Materials and methods**

- A. Experimental set up
- B. Measurement
- C. Relative plant performances
- D. Statistical analyses

### **III. Results**

- A. Above-ground DM production
- C. S yield (Shoot S content, S% DM) and uptake (SDFF, RSUE)
- D. N yield (Shoot N content, N% DM) and uptake (NDFF, RNUE)
- E. N : S ratio

### **IV. Discussion**

- A. Effect of N and S availabilities on species performance at establishment phase
- B. Effect of N and S availabilities on species performance at regrowth phase

### **V. Conclusion**

## **CHAPITRE III**

-

**Effects of nitrogen and sulphur gradients on plant performance, N & S use efficiencies  
and grassland community.**

**(Article 3)**

---

---

Tiphaine Tallec<sup>1</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1</sup>, Charlotte Fauveau<sup>1</sup>, Marie-Paule Bataillé<sup>1</sup>, Alain Ourry<sup>1</sup>

*Article soumis en février 2008*

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale Agronomie & nutriments N, C, S (EVA), Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

**Key words:** nutrient availability, plant community, competition, dynamics

## **Préambule**

Au cours des deux chapitres précédents, nous avons validé l'existence d'un effet S et analysé ses mécanismes et conséquences sur deux populations modèles et une association végétale simple composée de deux espèces, *L. perenne* et *T. repens*.

Il s'agit maintenant de valider le même groupe d'hypothèses sur une communauté plus complexe, multi Poacées, plus proche dans sa structure de celle d'une communauté végétale de prairie naturelle.

Pour cela, nous associons aux deux espèces précédentes, l'agrostide commune (*Agrostis capillaris* L.) et le pâturin des prés (*Poa pratensis* L.) et nous analysons les variations de performance des 4 espèces en population et en communauté le long de notre double gradient N  $\times$  S. Pour cette analyse, nous confrontons la modulation de leur production de biomasse aérienne au devenir de l'N et du S appliqués au sein de la communauté, tant en termes de contenus et de teneurs en N et S dans la biomasse végétale qu'en termes d'origine (fertilisants apportés en début de culture *versus* autres sources) et d'efficacité d'utilisation des fertilisants azotés et soufrés. Ceci est permis grâce à l'utilisation originale d'un double marquage  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  des fertilisants, apportés en début de culture.

Nos résultats montrent notamment que le gradient de S modifie les aptitudes compétitives des espèces et la structure de communauté et module l'effet du gradient azoté. La réponse des espèces est fonction de leurs exigences absolues et relatives en N et en S et de leur aptitude à entrer en compétition pour l'absorption de ces deux éléments. Nos résultats démontrent bien que selon le ratio N : S du sol, l'abondance relative et par conséquent la structure de la communauté sont modifiées (**hypothèse 7**). Les effets du gradient de S sont à la fois directs et indirects par l'augmentation de l'efficacité d'acquisition de l'N, du sol pour les Poacées, et atmosphérique pour *T. repens*. Au travers de cette 3<sup>ème</sup> approche, la disponibilité en S apparaît comme un facteur potentiel de modulation de la structure des communautés végétales de prairie.

Cette expérimentation a permis la rédaction d'une publication soumise le 1<sup>er</sup> février 2008 à *Plant and Soil*.

## Abstract

Sulphur (S) depletion of grassland soils has occurred in Europe for many decades. This is known to promote a decrease in ecosystem productivity and is suspected to alter plant community structure. Considering the strong links between nitrogen (N) and S metabolisms in plants, these effects should depend on N availability. We tested this hypothesis in a pot experiment, considering a four grassland species plant community (3 Poaceæ: *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris* and *Poa pratensis* and 1 Fabaceæ: *Trifolium repens*), and submitted it to a double N and S gradient. We used labelled  $^{15}\text{N}$ -fertilizer and  $^{34}\text{S}$ -fertilizer in order to determine both nutrients use efficiency by species and to analyze the influence of competition for these nutrients on community dynamics. We compared species relative physiological performance (RPP) in the population (monocultures) and their relative ecological performance (REP) in the community (mixtures of 4 species). We analysed gradient effects at establishment and at regrowth after cutting. At establishment, grasses production and S use efficiency increased along N gradient. S gradient slightly favoured *L. perenne* dominance, increased *A. capillaris* production and enhanced N use efficiency of both species. At regrowth, S gradient promoted more significant effects, enhancing *T. repens* performance in increasing its  $\text{N}_2$  fixation ability and maintaining this at high N. It also induced a change in grass species relative performance (dry matter production and N use efficiency) at high N, enhancing that of *L. perenne* and decreasing that of *A. capillaris*. At both establishment and regrowth, RPP did not reflect REP, meaning that species behave differently along the gradient when grown in community. Finally, S gradient, as N gradient, appeared to modulate plant community structure. It appears that modulation of S availability could be used as a tool to drive grassland community.

## **I. Introduction**

Sulphur (S) is an important nutrient for plant growth and development (Droux 2004). During recent decades, increasing frequency of S deficiency has been reported in northern European croplands and grasslands, mainly due to the reduction in SO<sub>2</sub> emissions from industrial air-borne pollution (Murphy & Boggan 1988). S deficiency reduces yields and quality of both crops, eg oilseed rape (McGrath & Zhao 1995), wheat (Withers *et al.* 1995), barley (Zhao *et al.* 1999b), and grasslands (Murphy *et al.* 2002), and is reported to affect grassland plant diversity (Cullen 1971; Murphy & Boggan 1988).

Grassland species are affected by defoliation (herbivory or cutting), nutrient availability and competition from neighbouring plants. These three factors influence the growth, survival and reproduction of individual plants and subsequently the abundance of plant populations (Harper 1977). According to Tilman (1987), competition occurs when species share at least one limited resource. The ability of a single plant to capture nutrient resources from the soil more rapidly and/or more efficiently than another should confer to this plant a higher competitive ability than its neighbours. When nutrient availability changes, these differences between species may enhance a change in biodiversity (De Vries & Kruijne 1960; Olde Venterink *et al.* 2001). Numerous field studies and mesocosm competition experiments tested nutrient gradient effects on species composition or functional group diversity and on productivity of grassland or old-fields (Austin 1982; Campbell & Grime 1989; Aerts & Van der Peijl 1993; Wedin & Tilman 1993; Aerts 1999; Güsewell & Bollens 2003). Most of them considered nitrogen (N), phosphorus (P), or potassium (K) gradients. Only few considered S or N × S gradients, and mainly dealt with annual ryegrass/clover mixture, like *Trifolium subterraneum* and *Lolium rigidum*. They proved that morphological variations and shifts in competition processes between species could be induced by different relative and total N / S availabilities (Gilbert & Robson 1984a, b; Sinclair *et al.* 1996a; Morton *et al.* 1999). They showed that S supply enhances the growth of clover independently of N supply and that of ryegrass under high N supply only. Walker *et al.* (1956) showed that S enhances higher dry matter production and plant N content in a grasses/clover pasture and hypothesized that these effects may be due to an increase in N<sub>2</sub>-fixation by clovers and underground transference from the latter to grasses. However, as for most studies (Ceccotti & Messick 1997), they did not consider species balance and fertilizer use efficiency was not determined.

As species have different S requirements (Scherer 2001), we state that, as N gradient does, S gradient modifies the balance of matrix species and plant community dynamics in grasslands. As suggested by previous studies on annual species (Gilbert & Robson 1984a, b), we hypothesize that S effect should depend on N availability, since N and S assimilation and metabolism in plants are linked (constant N : S ratio; Clarkson *et al.* 1999). The dynamics induced, such as the underlying mechanisms such as competition to capture N and S nutrients, are poorly documented, especially in herbaceous perennial plant communities, submitted to defoliation regime (grazing or cutting).

Selecting four of the most common co-occurring perennial species of western Europe grasslands: 3 grasses, *Lolium perenne* L. (Perennial Rye-grass), *Poa pratensis* L. (Kentucky Bluegrass), *Agrostis capillaris* L. (Common Bent-grass) and a legume, *Trifolium repens* L. (White Clover), we built up a model community and submitted it to various initial N  $\times$  S availabilities. Our aims were (1) to investigate changes in plant community structure (biomass production and relative abundance of species) along a N  $\times$  S gradient, following both establishment phase, where N was potentially ample available, and regrowth phase after cutting, where N limitation was exacerbated, (2) to establish if these changes result from alterations of species physiological aptitude to exploit environment and/or of their competitive abilities in community, (3) to analyse the implication of N - S uptake abilities on these processes. To reach the first two objectives, we performed a mesocosm experiment in which N : S availabilities were modulated at species establishment and compared species performance in community (mixture) to that in population (monoculture). We assessed the third objective by the simultaneous supply of  $^{15}\text{N}$  and  $^{34}\text{S}$  isotope when setting up the nutrient gradient. This allowed us to determine the fate of these nutrients in the plant community and to assess the alteration in the ability of each species to exploit N and S along this gradient.

## **II. Materials and methods**

### **A. Experimental set up**

The experiment was conducted in a greenhouse between February and April 2006. Plants were grown from seed and sown 3 weeks prior to the start of experiment. When seedlings had their first well developed leaf (= day 0), they were transplanted into polyvinylchloride (PVC) pots of 2 L (population; pot area: 154 cm<sup>2</sup>) or 3.5 L (community; pot area: 254

cm<sup>2</sup>). Pots were filled with a sieved (2 mm mesh), homogeneous and nutrient-poor soil (silty-clay soil: 36.7% clay, 41.3% silt, 4.2% organic matter, 3.18‰ total N, 1‰ total S, pH: 6,1). Populations (monocultures) consisted of 8 plants per pot (520 plants m<sup>-2</sup>) and communities (mixtures of 4 species) of 12 plants per pot (480 plants m<sup>-2</sup>), established according to their relative natural abundance in Normandy grasslands (France): five plants of *L. perenne* (41%), three of *T. repens* (25%), two of *P. pratensis* (17%) and two of *A. capillaris* (17%). Their spatial pattern was assessed to ensure that each plant had neighbouring plants of all other species.

9 treatments combinations (3 N × 3 S) were applied on day 2, each combination being replicated 4 times (180 pots). S was applied as calcium sulphate (1% atom <sup>34</sup>S excess) at a rate of 0 (low S), 15 (intermediate S) and 30 (high S) kg S ha<sup>-1</sup>. N was applied as ammonium nitrate (5% atom <sup>15</sup>N excess) at 0 (low N), 50 (intermediate N) and 180 (high N) kg N ha<sup>-1</sup>. A basal mix of K (150 kg K ha<sup>-1</sup>) and P (60 kg P ha<sup>-1</sup>) as K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was applied to each pot, at the same time. Pots receiving no or moderate calcium sulphate were supplemented with CaCl<sub>2</sub>, so that each pot received the same Ca amount. *T. repens* plants were infected with a standard mixture of *Rhizobium trifolii* T354 known to support N fixation.

Throughout the experiment, air temperature was kept at 20/16 ± 2°C (day/night). Plants were grown under natural light conditions until day 5, and then supplemented by artificial illumination (400 W high-pressure sodium lamps, Philips SON T-PIA Agro) providing 400 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR (photosynthetically active radiation) at plant height with a 16/8h photoperiod. Soil water content was kept at ± 25 % (relative to dry weight) by weighing the pots once a week and by adding the required quantity of water and watering them 4 times a week. The containers were moved twice a week to avoid any positional effect.

Species response to N × S gradient was analyzed during the establishment phase and, following cutting, during the regrowth phase in established community and population.

## B. Measurement

Biomass was harvested by species with a cutting height of 50 mm above the root-shoot junction on days 42 and 84 (6 weeks for both first growth and regrowth). All samples were dried (48 h at 65 °C) to constant weight, and dry mass (DM) per plant was determined for each species.

N and S analyses were achieved for species grown in mixture, to assess the fate of nutrients in plant community. As individual number per species differed, results per plant are considered in order to allow comparisons between species. Plant material was finely powdered. N and S contents and  $^{15}\text{N}$  and  $^{34}\text{S}$  abundances were estimated using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instrument). Natural  $^{15}\text{N}$  abundance ( $0.3663\% \pm 0.0004$ ) of atmospheric  $\text{N}_2$  was used as a reference for  $^{15}\text{N}$  analysis. Natural  $^{34}\text{S}$  abundance (4.21%) of Canyon Diablo Troilite meteorite was used as a reference for  $^{34}\text{S}$ .

S derived from  $^{34}\text{S}$ -fertilizer (*SDF*) and N derived from  $^{15}\text{N}$ -fertilizer (*NDF*) were calculated per plant by isotope mass balance as:

$$SDF(\%) = \frac{E^{34}\text{S}_{plant}}{E^{34}\text{S}_{fert}} \times 100$$

$$NDF(\%) = \frac{E^{15}\text{N}_{plant}}{E^{15}\text{N}_{fert}} \times 100$$

where  $S_{plant}$  and  $N_{plant}$  are the shoot S and N contents in the above-ground DM per plant,  $E^{34}\text{S}$  and  $E^{15}\text{N}$ , the  $^{34}\text{S}$  and  $^{15}\text{N}$  atom % excess.

The real S and N fertilizers use efficiencies (*RSUE* and *RNUE*, respectively), indicating the proportion of fertilizer taken up per plant for each species, were calculated as:

$$RSUE = \frac{S_{plant} \times SDF}{S_{fert}}$$

$$RNUE = \frac{N_{plant} \times NDF}{N_{fert}}$$

### C. Relative plant performances

In order to analyse and compare species' behaviour in population then in community along the nutrient gradient, we selected two indices defined by Austin (1982): the relative physiological performance (*RPP*) and the relative ecological performance (*REP*). They are considered as good indices of performance ability and competitiveness because the response of each species is evaluated, taking into account the relative ability of that species and others

**Table III-1** : N and S effect on *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* dry mass, N, S shoot and derived from fertilizer contents and N, S use efficiencies, grown in community. Results of F (ANOVA) or H (Kruskal-Wallis; *in italic*): \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \* $P \leq 0.5$ ; NS, not significant; nt, not tested.

Variable		Establishment phase						Regrowth phase							
		Transf	N		S		N×S		Transf	N		S		N×S	
			F/H	p	F/H	p	F/H	p		F/H	p	F/H	p	F/H	p
<b>DM in population</b>	<i>Lolium perenne</i>		72,1 ***		1,0 <sup>NS</sup>		74,1 ***		78,4 ***		0,8 <sup>NS</sup>		5,4 **		
	<i>Agrostis capillaris</i>		37,9 ***		0,1 <sup>NS</sup>		0,3 <sup>NS</sup>		23,0 ***		0,7 <sup>NS</sup>		25,1 **		
	<i>Poa pratensis</i>		3,8 *		0,4 <sup>NS</sup>		0,6 <sup>NS</sup>		28,0 ***		0,8 <sup>NS</sup>		30,5 ***		
	<i>Trifolium repens</i>		11,8 **		0,3 <sup>NS</sup>		22,6 *		4,1 *		35,9 ***		3,8 **		
<b>DM in community</b>	<i>Lolium perenne</i>		25,3 ***		3,8 *		0,7 <sup>NS</sup>	log(X)	130,9 ***		28,3 ***		9,0 ***		
	<i>Agrostis capillaris</i>		28,1 ***		1,3 <sup>NS</sup>		3,0 *	log(X)	14,8 ***		1,7 <sup>NS</sup>		0,8 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>		5,6 **		0,8 <sup>NS</sup>		0,1 <sup>NS</sup>	log(X)	12,1 ***		0,9 <sup>NS</sup>		0,2 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>		4,7 *		0,4 <sup>NS</sup>		4,1 **		8,7 *		22,5 ***		nt		
<b>Shoot S content</b>	<i>Lolium perenne</i>	log(X)	6,8 **		34,7 ***		2,0 <sup>NS</sup>		0,0 <sup>NS</sup>		30,5 ***		nt		
	<i>Agrostis capillaris</i>	log(X)	9,4 ***		3,9 *		1,6 <sup>NS</sup>		2,4 <sup>NS</sup>		1,2 <sup>NS</sup>		1,6 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>		0,5 <sup>NS</sup>		6,6 **		0,5 <sup>NS</sup>		1,0 <sup>NS</sup>		11,4 ***		0,7 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>		5,9 **		19,0 ***		2,7 *		2,0 <sup>NS</sup>		39,7 ***		5,4 *		
<b>S% DM</b>	<i>Lolium perenne</i>		4,5 *		41,7 ***		1,2 <sup>NS</sup>	log(X)	77,1 ***		218,7 ***		1,5 <sup>NS</sup>		
	<i>Agrostis capillaris</i>		4,1 *		5,6 **		1,3 <sup>NS</sup>	log(X)	20,2 ***		15,3 ***		0,6 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>		7,0 **		9,8 ***		1,4 <sup>NS</sup>		39,7 ***		69,8 ***		5,0 **		
	<i>Trifolium repens</i>		31,1 ***		57,6 ***		1,9 <sup>NS</sup>	1/X	6,5 **		34,2 ***		6,7 ***		
<b>SDFF</b>	<i>Lolium perenne</i>	1/X	47,1 ***		8,3 **		3,0 <sup>NS</sup>		0,3 <sup>NS</sup>		20,4 ***		3,8 *		
	<i>Agrostis capillaris</i>	log(X)	104,3 ***		7,3 *		1,9 <sup>NS</sup>		12,6 ***		12,6 **		4,7 *		
	<i>Poa pratensis</i>		5,4 *		2,3 <sup>NS</sup>		1,0 <sup>NS</sup>	log(X)	0,4 <sup>NS</sup>		11,9 **		0,3 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>		0,8 <sup>NS</sup>		0,7 <sup>NS</sup>		1,2 <sup>NS</sup>		0,4 <sup>NS</sup>		29,4 ***		nt		
<b>RSUE</b>	<i>Lolium perenne</i>	log(X)	51,8 ***		7,1 *		0,6 <sup>NS</sup>		0,7 <sup>NS</sup>		1,5 <sup>NS</sup>		0,0 <sup>NS</sup>		
	<i>Agrostis capillaris</i>		17,6 ***		0,9 <sup>NS</sup>		nt	log(X)	2,8 <sup>NS</sup>		2,1 <sup>NS</sup>		0,5 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>	log(X)	5,2 *		1,1 <sup>NS</sup>		0,6 <sup>NS</sup>		0,6 <sup>NS</sup>		0,0 <sup>NS</sup>		0,5 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>		10,7 ***		19,6 ***		4,3 *		40,7 ***		42,8 ***		1,3 <sup>NS</sup>		
<b>Shoot N content</b>	<i>Lolium perenne</i>	log(X)	62,2 ***		0,0 <sup>NS</sup>		0,5 <sup>NS</sup>	1/X	245,5 ***		63,7 ***		14,2 ***		
	<i>Agrostis capillaris</i>	log(X)	28,3 ***		0,3 <sup>NS</sup>		1,3 <sup>NS</sup>		15,2 ***		0,9 <sup>NS</sup>		3,7 *		
	<i>Poa pratensis</i>		21,2 ***		0,4 <sup>NS</sup>		0,1 <sup>NS</sup>	log(X)	5,9 **		0,4 <sup>NS</sup>		0,8 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>		1,2 <sup>NS</sup>		4,5 *		2,9 *	log(X)	460,1 ***		223,8 ***		2,8 <sup>NS</sup>		
<b>N% DM</b>	<i>Lolium perenne</i>	1/X	57,6 ***		16,1 ***		0,4 <sup>NS</sup>	1/X	53,4 ***		8,9 ***		8,5 ***		
	<i>Agrostis capillaris</i>		19,2 ***		0,9 <sup>NS</sup>		0,6 <sup>NS</sup>	1/X	5,8 **		13,0 ***		2,1 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>	1/X	34,3 ***		3,6 *		0,7 <sup>NS</sup>		5,6 **		16,2 ***		5,1 **		
	<i>Trifolium repens</i>		20,8 ***		17,8 ***		3,0 *	1/X	18,1 ***		39,3 ***		2,8 *		
<b>NDFF</b>	<i>Lolium perenne</i>		12,0 ***		0,7 <sup>NS</sup>		nt		16,5 ***		0,6 <sup>NS</sup>		nt		
	<i>Agrostis capillaris</i>		17,3 ***		0,4 <sup>NS</sup>		nt		17,3 ***		0,4 <sup>NS</sup>		nt		
	<i>Poa pratensis</i>		17,3 ***		1,3 <sup>NS</sup>		nt		16,8 ***		2,0 <sup>NS</sup>		nt		
	<i>Trifolium repens</i>		548,3 ***		56,8 ***		4,2 *		8,8 *		23,8 ***		nt		
<b>RNUE</b>	<i>Lolium perenne</i>	box-cox	14,9 ***		0,7 <sup>NS</sup>		0,0 <sup>NS</sup>		20,1 ***		11,1 ***		0,8 <sup>NS</sup>		
	<i>Agrostis capillaris</i>		9,8 **		0,3 <sup>NS</sup>		4,5 *		0,3 <sup>NS</sup>		2,0 <sup>NS</sup>		1,2 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>		1,0 <sup>NS</sup>		0,3 <sup>NS</sup>		0,6 <sup>NS</sup>	log(X)	0,4 <sup>NS</sup>		2,0 <sup>NS</sup>		0,2 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>	1/X	6,1 *		2,8 <sup>NS</sup>		0,3 <sup>NS</sup>	log(X)	1,1 <sup>NS</sup>		5,0 *		4,7 *		
<b>N : S ratio</b>	<i>Lolium perenne</i>	1/X	97,6 ***		149,5 ***		0,9 <sup>NS</sup>	log(X)	224,7 ***		203,1 ***		3,6 *		
	<i>Agrostis capillaris</i>	1/X	33,2 ***		20,4 ***		1,2 <sup>NS</sup>	log(X)	17,6 ***		3,1 *		0,4 <sup>NS</sup>		
	<i>Poa pratensis</i>	1/X	61,9 ***		25,6 ***		0,1 <sup>NS</sup>	1/X	25,3 ***		50,7 ***		1,1 <sup>NS</sup>		
	<i>Trifolium repens</i>	1/X	17,2 ***		58,7 ***		0,9 <sup>NS</sup>		2,6 <sup>NS</sup>		26,2 ***		5,4 **		

DM : Dry mass (mg per plant); Shoot S and N contents (mg per plant); SDFF: S derived from fertilizer (%); RSUE: Real S use efficiency (%); NDFF: N derived from fertilizer (%); RNUE: Real N use efficiency (%).

to tolerate or exploit the environment (Navas *et al.* 2002). Austin (1982) defined the relative physiological performance (RPP) of a species *i* in population at nutrient level *j* as:

$$RPP_{ij} = \frac{B_{mij}}{M_{mj}}$$

where  $B_{mij}$  is the DM of species *i* per area unit of population at nutrient level *j* and  $M_{mj}$  is the DM of the most productive species per area unit of population at nutrient level *j*.

Relative ecological performance (REP) of a species *i* in community at nutrient level *j* was defined as:

$$REP_{ij} = \frac{B_{xij}}{M_{xj}}$$

where  $B_{xij}$  is the DM of species *i* per area unit of community at nutrient level *j* and  $M_{xj}$  is the DM of the most productive species per area unit of community at nutrient level *j*.  $RPP$  and  $REP$  vary between 0 and 1 and the value increase with enhanced performance of species *i* relative to other species at nutrient level *j*.

#### D. Statistical analyses

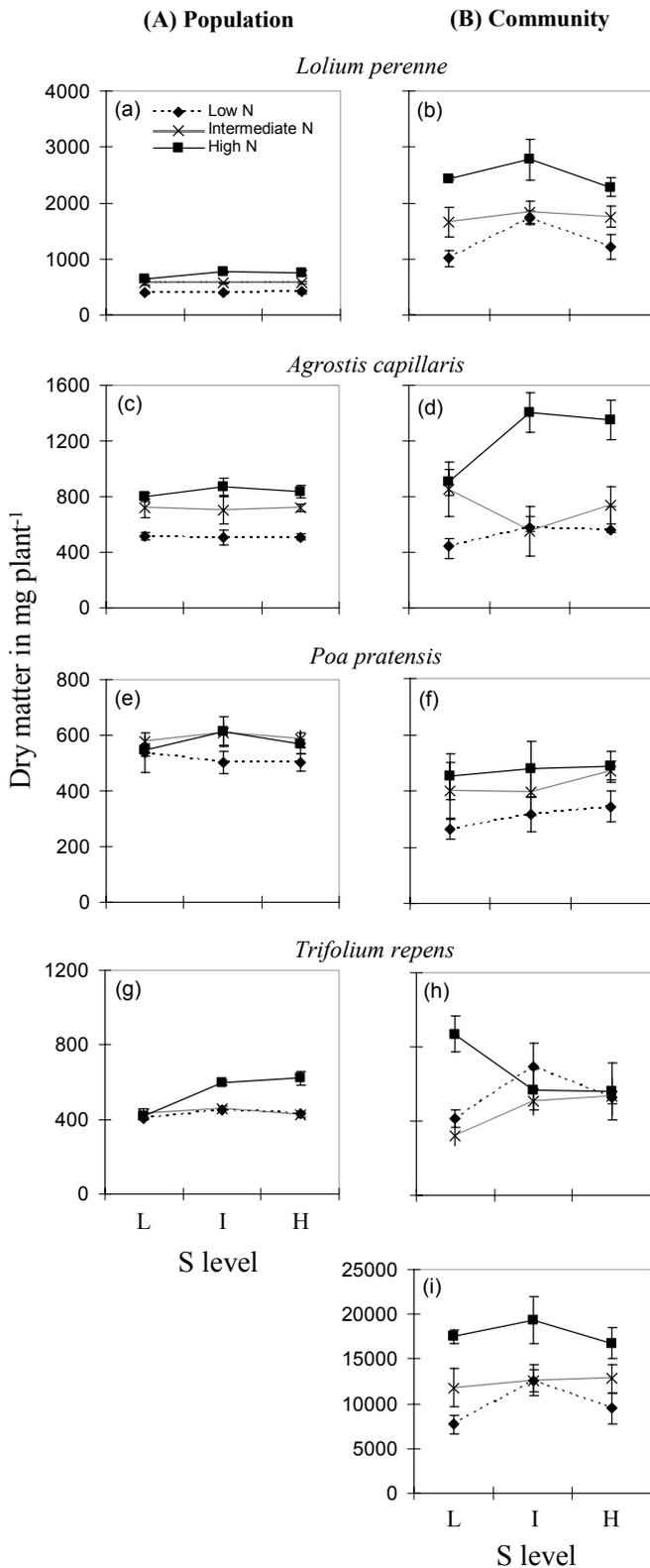
The effects of S availability, N availability and their interaction on individual plant variables in communities were tested for each species by a two-way ANOVA (Minitab 13). When necessary, data were transformed to meet statistical assumptions. Not all variables satisfied the required assumptions, even after transformation, and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to test N effect, S effect and treatment effect (N+S) as it does not test the N×S interaction. Comparison of means for the individual treatments was done at the 5% probability level based on the Tukey test or on the Mood median test to determine which means differed significantly.

### **III. Results**

#### A. Above-ground DM production

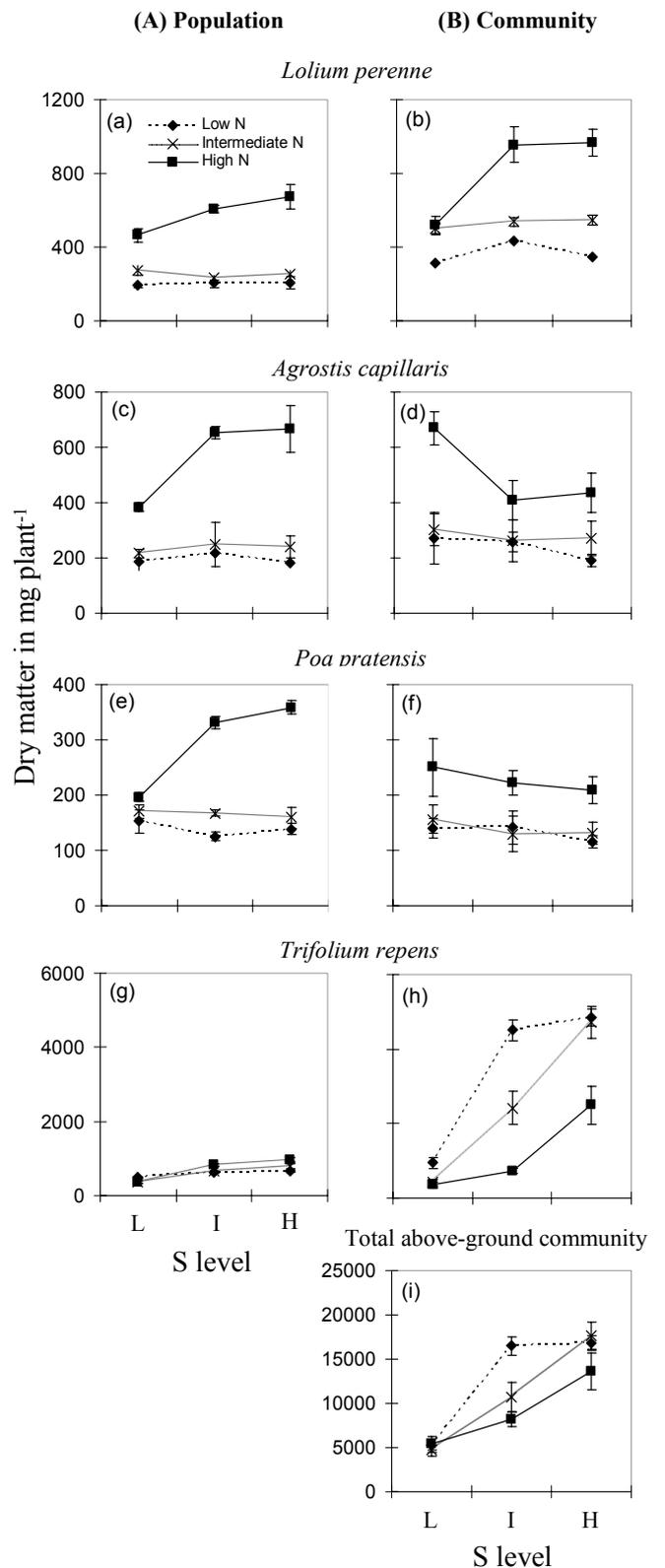
The four species differed considerably in their responses to nutrient availabilities (Table III-1; Figures III-1 and III-2).

### Establishment



**Figure III-1** : Above-ground dry matter per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in (A) population and (B) in community, at establishment, under low, intermediate and high N level along the S gradient. Note the changed scales for the y axis.

### Regrowth

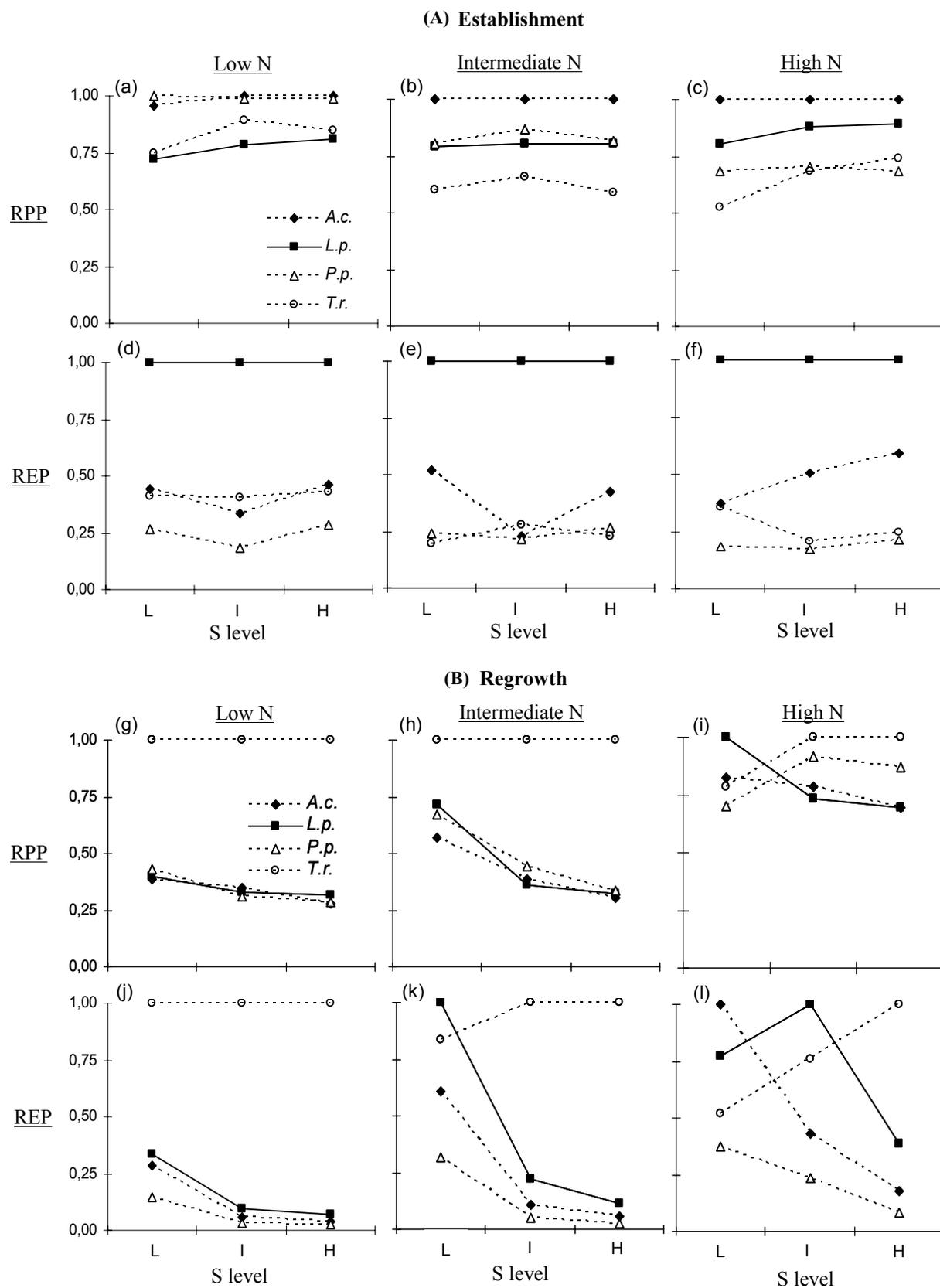


**Figure III-2** : Above-ground dry matter per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in (A) population and (B) in community, at regrowth, under low, intermediate and high N level along the S gradient. Note the changed scales for the y axis.

Trends recorded at establishment phase (up to cut 1; **Figure III-1**) strongly contrasted with those at regrowth phase (up to cut 2; **Figure III-2**).

At establishment phase, N significantly increased grasses DM production in both population (**Figure III-1A**) and community (**Figure III-1B**) whereas the effect of S depended on species, and was higher in community. Intermediate S enhanced *L. perenne* DM production compared to low and high S, especially at low N in community (**Figures III-1a, b**;  $P \leq 0.05$ ). Increasing S significantly increased *A. capillaris* DM production at high N only in community (**Figure III-1c versus Figure III-1d**;  $P \leq 0.05$ ), and had no effect on *P. pratensis* whatever the culture type (**Figures III-1e, f**). *T. repens* response to N and S differed between population and community. In population, its DM production was significantly higher in high N - S supplied pots than in all other treatments (**Figure III-1g**). In community, high N increased *T. repens* DM production at low S only (**Figure III-1h**). S effect differed along the N gradient: at high N, it decreased its DM ( $P \leq 0.01$ ) whereas at low and intermediate N, it increased it (**Figure III-1h**). As a result of individual species responses, community DM production significantly increased with N (+ 55% between low and high N; **Figure III-1i**), intermediate S enhancing it at low N.

At regrowth phase, N gradient still significantly increased grasses DM in both population (**Figure III-2A**) and community (**Figure III-2B**). S gradient promoted more contrasting effects. Their production was lower than at cut 1 (**Figures III-1 versus Figure III-2**). At high N, S enhanced *L. perenne* DM production in both culture types (**Table III-1 and Figures III-2a, b**), whereas in contrast to trends noticed in population (**Figure III-2c**), it decreased significantly that of *A. capillaris* grown in community (**Figure III-2d**). The only S effect detected on *P. pratensis* was an enhancement of its DM production in high N population (**Figure III-2e**). Increasing N decreased *T. repens* DM whatever S level, while S increased it very significantly in both population (**Figure III-2g**) and community (**Figure III-2h**). Community DM much increased with S (+ 200% between low and high S; **Figure III-2i**) while in contrast to cut 1, N decreased it (- 20% between low and high N). These trends were largely due to the response of *T. repens*, this species being almost the dominant one, particularly at highest S and lowest N levels.



**Figure III-3 :** Relative physiological performance (RPP, in population) and Relative ecological performance (REP, in community) of four species at **(A)** establishment at (a, d) low, (b, e) intermediate and (c, f) high N level along the S gradient and at **(B)** regrowth at (g, j) low, (h, k) intermediate and (i, l) high N level along the S gradient. (■), *Lolium perenne*; (◆), *Agrostis capillaris*; (Δ), *Poa pratensis* and (○), *Trifolium repens*.

## B. Relative physiological performance and relative ecological performance

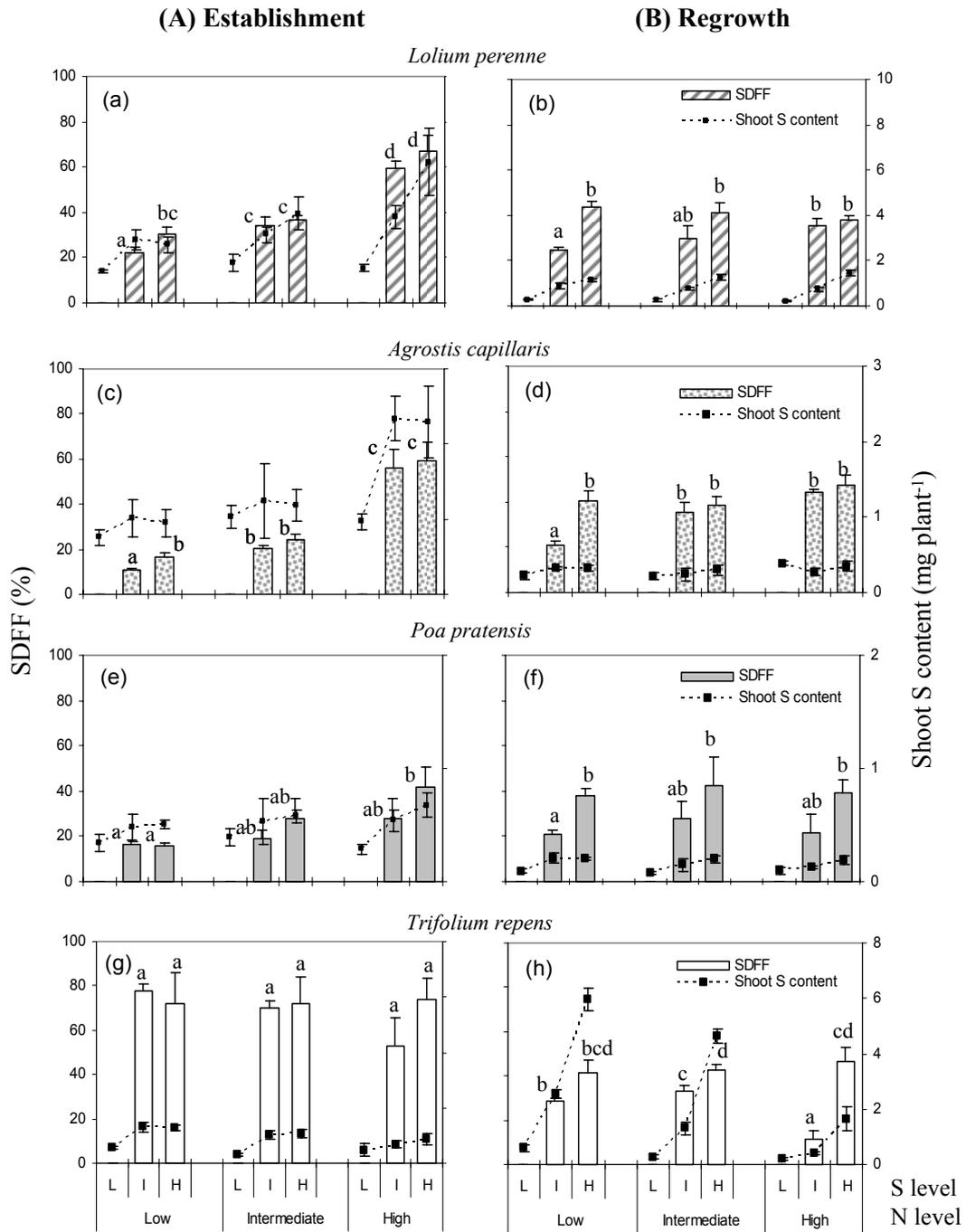
RPP and REP profiles strongly differed between cuts 1 and 2 (**Figure III-3A versus Figure III-3B**).

At establishment phase, grasses showed higher RPP than *T. repens* especially at intermediate and high N (**Figures III-3a, b, c**). *A. capillaris* generally kept the highest RPP in all treatments. Under low N (**Figure III-3a**), *P. pratensis* RPP were close to that of *A. capillaris*. Its performance decreased along the N gradient, and at high N (**Figure III-3c**), *P. pratensis* appeared as the poorest physiological grass performer. *L. perenne* RPP, the lowest species among grasses at low N (**Figure III-3a**), was slightly enhanced by high N only when S increased (**Figure III-3c**). Contrasting with grasses, N significantly decreased *T. repens* performance, especially at low S at high N (**Figures III-3a, b, c**). RPP values projected *T. repens* as the worst performer at intermediate and high N.

When grown in community, *L. perenne* always had the highest REP (**Figures III-3d, e, f**). It supplanted *A. capillaris*, the best physiological performer, and emerged as the best competitor, dominating the community whatever N and S levels. In most treatments, the REP of other species was half to those of *L. perenne*. At high N (**Figure III-3f**), S strongly increased *A. capillaris* REP, and projected this species as a better competitor than *T. repens* and *P. pratensis*. At intermediate N and low or high S levels (**Figure III-3e**), *A. capillaris* also emerged as the second best competitor, but intermediate S sharply depressed its relative performance. In all treatments (**Figures III-3d, e, f**), even low N, *P. pratensis* had the lowest REP and emerged as the subordinate species.

At regrowth phase, *T. repens* had much higher RPP than grasses at low and intermediate N (**Figures III-3g, h**). At high N (**Figures III-3i**), RPP of the four species were closer. *T. repens* still had the highest values at intermediate and high S, but *L. perenne* clearly supplanted it at low S. At low and intermediate N (**Figures III-3g, h**), RPP of the three grasses were very closer and had the same pattern: N increased their RPP whereas S decreased it. At high N (**Figure III-3i**), *L. perenne* and *A. capillaris* RPP still followed this pattern, whereas *P. pratensis* was the best performer of the three grasses.

At low and intermediate N (**Figures III-3j, k**), *T. repens* dominated the community, except at low S - intermediate N, characterized by the enhancement of all grass species performance and the dominance of *L. perenne* (**Figure III-3k**), while their REP decreased



**Figure III-4 :** Shoot S content and S derived from fertilizer (SDFF) in (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in community at **(A)** establishment and at **(B)** regrowth along N and S gradients. Lines: Shoot S content (right vertical axis; note the changed scales for this axis); Histograms: SDFF (S derived from fertilizer expressed as percentage of shoot S content; left vertical axis). Bars are mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Two different letters indicate a significant difference within each species and phase;  $*P \leq 0.05$ .

with S. At high N-low S (**Figure III-3I**), *A. capillaris* was the best ecological performer, followed by *L. perenne* then *T. repens* and *P. pratensis*. At high N-intermediate S (**Figure III-3I**), *L. perenne* and *T. repens* performances were clearly enhanced, whereas those of other species were decreased; *L. perenne* dominated. High S still enhanced *T. repens* performance, projecting it as the dominant species, but decreased that of *L. perenne* as well as those of *A. capillaris* and *P. pratensis* (**Figure III-3I**). As a result, S promoted the transition from a *L. perenne* and *A. capillaris* dominated community to a *L. perenne* and *T. repens* dominated one (intermediate S) then a *T. repens* and *L. perenne* dominated one (high S).

### C. S yield (Shoot S content, S% DM) and uptake (SDFF, RSUE)

S increased the shoot S content of all species in both cuts (**Figure III-4** and **Table III-1**). N gradient modulated the significance of this increase, in a different way according to both species and growth phases (**Figure III-4A versus Figure III-4B**). *T. repens* shoot S content was higher at regrowth than at establishment (**Figure III-4h versus Figure III-4g**), whereas those of grasses were lower (**Figures III-4b, d, f versus Figures III-4a, c, e**).

At establishment phase (**Figure III-4A**), *L. perenne* was, in most treatments, richer in S than other species, followed by *A. capillaris*, then *T. repens* and *P. pratensis*. S effect on shoot S content was higher at high N for grasses (**Figures III-4a, c, e**) and at low N for *T. repens* (**Figure III-4g**). N had no effect on grasses at low S, but it significantly increased the shoot S content of *L. perenne* at high S (**Figure III-4a**) and that of *A. capillaris* at intermediate and high S (**Figure III-4c**). No N effect was detected on *P. pratensis*. Contrary to the responses of the grasses, *T. repens* shoot S content decreased along the N gradient (**Figure III-4g**). Accordingly, S% DM in the shoot of all species increased along the S gradient, while N input generally decreased it (left side of **Table III-2**).

The amount of S derived from fertilizer (SDFF; **Figure III-4A**) progressively increased along the N gradient in grasses from 20% at low N up to 60% at high N, but was unaffected by S level. *T. repens* derived most of its S shoot content from S fertilizer, between 60 and 80%, whatever the N level. The relative S use efficiency (RSUE; **Table III-3**) at establishment phase, calculated per plant, increased for all grass species along the N gradient, but decreased along the S gradient. *T. repens* behave differently as RSUE decreased along the N gradient. As a result, applied S was recovered by plant community (based on RSUE

**Table III-2 :** N and S effect on the mean S% DM per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in community.

Statistic test revealed very significant N and S effect on S% DM for each species and phase (see Table V-1).

			S% DM					
			Establishment phase			Regrowth phase		
		S level	Low	Intermediate	High	Low	Intermediate	High
<i>Lolium perenne</i>	N level	Low	0,14	0,19	0,22	0,08	0,20	0,32
		Intermediate	0,11	0,16	0,22	0,05	0,14	0,23
		High	0,07	0,14	0,22	0,04	0,08	0,15
<i>Agrostis capillaris</i>		Low	0,17	0,17	0,18	0,09	0,13	0,17
		Intermediate	0,13	0,14	0,16	0,07	0,09	0,11
		High	0,11	0,17	0,17	0,06	0,07	0,09
<i>Poa pratensis</i>		Low	0,13	0,15	0,15	0,06	0,14	0,17
		Intermediate	0,10	0,13	0,12	0,05	0,11	0,15
		High	0,06	0,12	0,14	0,04	0,06	0,09
<i>Trifolium repens</i>		Low	0,14	0,19	0,24	0,06	0,06	0,12
		Intermediate	0,10	0,20	0,21	0,07	0,05	0,10
		High	0,07	0,12	0,16	0,06	0,06	0,06

**Table III-3 :** N and S effect on the mean RSUE (real S use efficiency as % of <sup>34</sup>S-fertilizer applied) per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in community.

Two different letters indicate a significant difference between treatment within each species and phase; \* $P \leq 0.05$ .

			Establishment phase		Regrowth phase	
		S level	Intermediate	High	Intermediate	High
<i>Lolium perenne</i>	N level	Low	1,61 <sup>ab</sup>	1,01 <sup>a</sup>	0,56 <sup>NS</sup>	0,64 <sup>NS</sup>
		Intermediate	2,66 <sup>bc</sup>	1,91 <sup>a</sup>	0,61 <sup>NS</sup>	0,71 <sup>NS</sup>
		High	5,93 <sup>c</sup>	5,24 <sup>c</sup>	0,65 <sup>NS</sup>	0,73 <sup>NS</sup>
<i>Agrostis capillaris</i>		Low	0,29 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,17 <sup>NS</sup>	0,17 <sup>NS</sup>
		Intermediate	0,67 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,23 <sup>NS</sup>	0,16 <sup>NS</sup>
		High	3,34 <sup>b</sup>	1,66 <sup>b</sup>	0,31 <sup>NS</sup>	0,21 <sup>NS</sup>
<i>Poa pratensis</i>		Low	0,22 <sup>ab</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,12 <sup>NS</sup>	0,10 <sup>NS</sup>
		Intermediate	0,26 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,10 <sup>NS</sup>	0,11 <sup>NS</sup>
		High	0,38 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,07 <sup>NS</sup>	0,10 <sup>NS</sup>
<i>Trifolium repens</i>		Low	2,60 <sup>c</sup>	1,18 <sup>ab</sup>	1,91 <sup>c</sup>	3,20 <sup>d</sup>
		Intermediate	1,87 <sup>bc</sup>	1,83 <sup>ab</sup>	1,14 <sup>b</sup>	2,61 <sup>cd</sup>
		High	0,98 <sup>ab</sup>	0,81 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>

**Table III-4 :** N and S effect on the mean N% DM per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in community.

Statistic test revealed very significant N and S effect on N% DM for each species and phase (see Table V-1).

			N% DM					
			Establishment phase			Regrowth phase		
		S level	Low	Intermediate	High	Low	Intermediate	High
<i>Lolium perenne</i>	N level	Low	1,71	1,40	1,48	0,97	1,30	1,32
		Intermediate	1,81	1,51	1,60	0,87	1,05	1,30
		High	3,33	2,05	2,29	2,23	1,65	1,76
<i>Agrostis capillaris</i>		Low	2,01	1,78	1,90	1,06	1,47	1,80
		Intermediate	1,97	1,71	1,71	1,02	1,14	1,52
		High	2,41	2,52	2,41	1,07	1,06	1,19
<i>Poa pratensis</i>		Low	1,28	1,13	1,16	0,89	1,20	1,32
		Intermediate	1,45	1,25	1,19	0,89	1,03	1,24
		High	1,88	1,69	1,84	1,02	0,83	1,06
<i>Trifolium repens</i>		Low	3,20	3,37	3,58	1,77	2,01	2,98
		Intermediate	2,55	3,71	3,59	1,97	2,02	2,71
		High	2,30	2,77	2,89	1,64	1,82	1,97

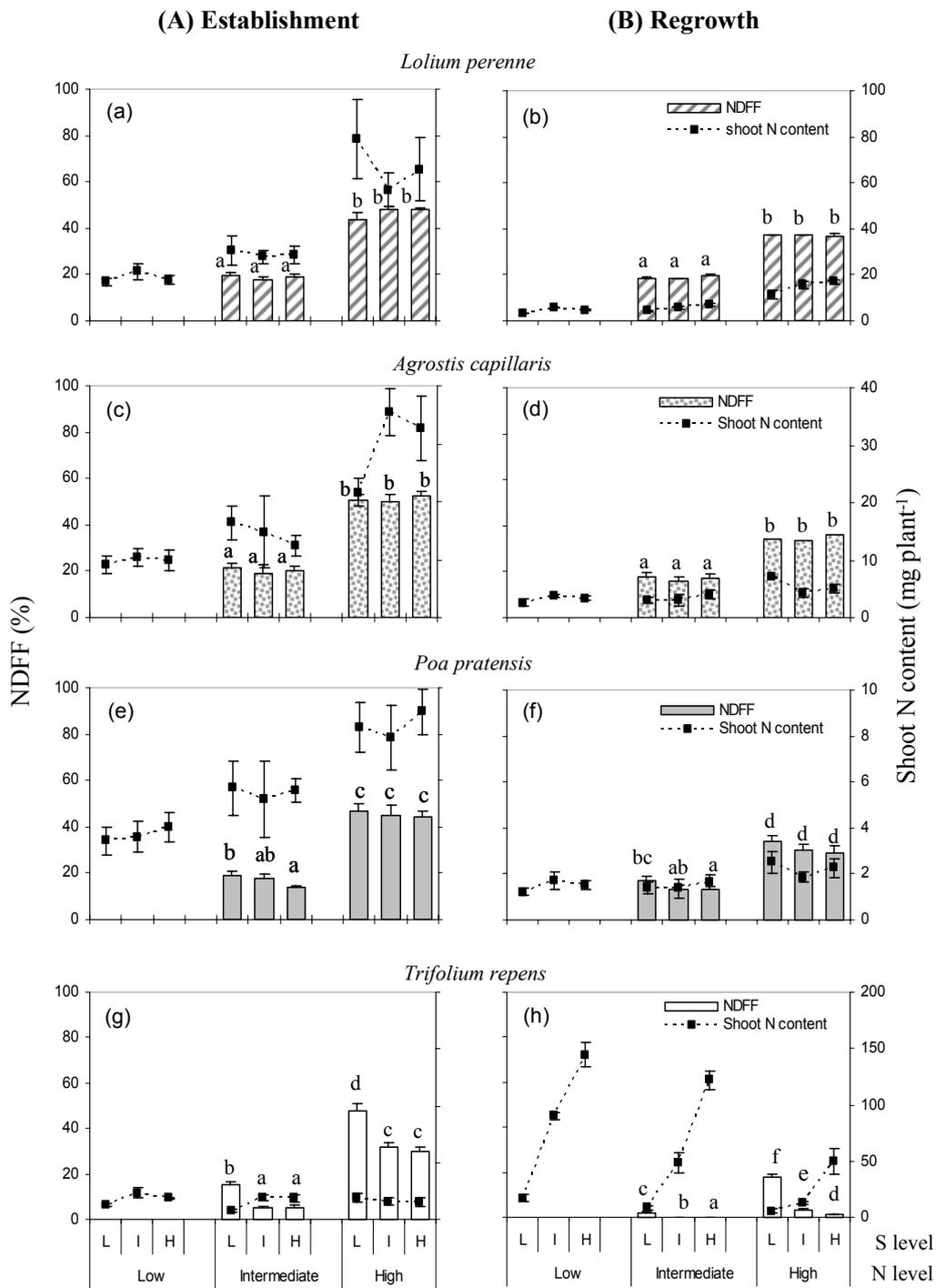
calculated for 5 plants of *L. perenne* + 2 of *A. capillaris* + 2 of *P. pratensis* + 3 of *T. repens*), from 10% to 40% at high N.

At regrowth phase (**Figure III-4B**), for which a decrease of N availability was expected, some general patterns can be obtained for shoot S content and S derived from fertilizer. For grasses, shoot S content remained similar along the N gradient and increased along the S gradient (**Figures III-4b, d, f**), except for *A. capillaris* (**Figure III-4d**). On the contrary, increasing N availability affected negatively shoot S content of *T. repens* (**Figure III-4h**), whereas a clear positive S effect emerged on that variable. In general terms, species which reacted the more intensively to S gradient were in the following order, *T. repens* and *L. perenne*, followed by *P. pratensis* while *A. capillaris* was less affected. Considering S% DM (right side of **Table III-2**), the same trend as at establishment phase was observed: S increased it for all species whereas N decreased it, this only at high S level for *T. repens*.

The amount of S derived from  $^{34}\text{S}$ -fertilizer (SDFF) was in the range of 20 - 40% in grass species (**Figures III-4b, d, f**) with a positive significant effect of S gradient at low N and of N gradient at intermediate S (**Table III-1**). For *T. repens*, SDFF increased along the S gradient whatever N level. The real S use efficiency (**Table III-3**), calculated from  $^{34}\text{S}$  content in the shoot, was the highest for *T. repens* and *L. perenne*, followed by *A. capillaris* and *P. pratensis*. N and S levels did not affect RSUE of grasses, but they respectively decreased and increased that of *T. repens* as previously found at establishment phase. In such cases, *T. repens* behave as the best competitor for S fertilizer uptake, mainly under low and intermediate N availability.

#### D. N yield (Shoot N content, N% DM) and uptake (NDFF, RNUE)

At establishment phase, *L. perenne* (**Figure III-5a**) always had the highest shoot N content, followed by both *T. repens* (**Figure III-5g**) and *A. capillaris* (**Figure III-5c**), while *P. pratensis* remained low (**Figure III-5e**). N increased very significantly the shoot N content of grasses, but had no effect on *T. repens* (**Table III-1**). S only increased shoot N content of *T. repens* and that of *A. capillaris*, at high N level only for the latter (**Figure III-5c** and **Table III-1**), meaning that most grass species had a shoot N content independent of S level. Variation in N% DM of grasses (left side of **Table III-4**) partly supported the previous result, as it strongly increased along the N gradient while it generally decreased along the S gradient.



**Figure III-5** : Shoot N content and N derived from fertilizer (NDF) in (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in community at **(A)** establishment and at **(B)** regrowth along N and S gradients.

Lines: Shoot N content (right vertical axis; note the changed scales for this axis); Histograms: NDF (N derived from fertilizer expressed as percentage of shoot N content; left vertical axis). Bars are mean  $\pm$  SE (n = 4). Two different letters indicate a significant difference within each species and phase; \* $P \leq 0.05$ .

Both gradients had an opposite effect on *T. repens*, S increasing and N depressing its N% DM.

The amount of N in the shoot derived from  $^{15}\text{N}$ -fertilizer, increased along the N gradient for all species, grasses and *T. repens* (NDFP; **Figure III-5B**). NDFP of grasses was unaffected by S input, whereas that of *T. repens* was decreased, suggesting that S input promoted  $\text{N}_2$  fixation process. The N use efficiency (RNUE; **Table III-5**), calculated per plant, showed that *L. perenne* then *A. capillaris* were the best performer while *T. repens* was able to take up more N than *P. pratensis*. No general trend of N and S gradients effect on RNUE was revealed, apart a slight improvement of RNUE along the N gradient for all species. Considering the whole community, most of  $^{15}\text{N}$  was recovered at establishment phase, from 30% to 50% of applied fertilizer (calculated from 5 plants of *L. perenne* + 2 of *A. capillaris* + 2 of *P. pratensis* + 3 of *T. repens*).

At regrowth phase (**Figure III-5B**), for which a decrease of N availability was expected, a general trend similar to that found at establishment phase can be drawn. Only the highest N availability increased shoot N content of grasses (**Figures III-5b, d, f**), this more slightly than at establishment phase, and especially that of *L. perenne*, suggesting that this species was the best competitor for N capture. An opposite trend was found for *T. repens* (**Figure III-5h**), as N gradient negatively affected its shoot N content. S input increased the shoot N content of *L. perenne* under all N availabilities (**Figure III-5b**) and had no clear effect on that of the two others grasses (**Figures III-5d, f**). The effect of S was even clearer at regrowth phase for *T. repens* than at establishment, in still increasing its shoot N content. The variation of N% DM in the shoot of *L. perenne* (right side of **Table III-4**) further supported the previous results, as it increased along the N gradient while those of the two other grass species decreased, especially in S treatments. Contrasting with establishment phase, S input increased N% DM of the 3 grasses (**Table III-4**). Concerning *T. repens*, shoot N% DM followed the same trend as at establishment phase, S and N inputs, respectively increasing and decreasing it.

For grasses, the N derived from  $^{15}\text{N}$ -fertilizer (NDFP) was unaffected by S while it increased along the N gradient (**Figures III-5b, d, f**). On the contrary, NDFP of *T. repens*, also increased by N input, strongly decreased with increasing S availability (**Figure III-5h**). The highest values of N use efficiency (RNUE; **Table III-5**) were those of *L. perenne* and *A. capillaris* again, followed by *P. pratensis*. RNUE of *L. perenne* even increased along the S

**Table III-5 :** N and S effect on the mean RNUE (real N use efficiency as % of <sup>15</sup>N-fertilizer applied) per plant of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in community.

Two different letters indicate a significant difference between treatment within each species and phase; \**P* ≤ 0.05.

			Establishment phase			Regrowth phase		
		S level	Low	Intermediate	High	Low	Intermediate	High
<i>Lolium perenne</i>	N level	Intermediate	4,60 <sup>ab</sup>	3,88 <sup>a</sup>	4,29 <sup>ab</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,81 <sup>ab</sup>	1,10 <sup>bc</sup>
		High	5,92 <sup>b</sup>	5,96 <sup>b</sup>	6,83 <sup>b</sup>	0,93 <sup>ab</sup>	1,27 <sup>c</sup>	1,34 <sup>c</sup>
<i>Agrostis capillaris</i>		Intermediate	2,78 <sup>ab</sup>	1,97 <sup>ab</sup>	1,99 <sup>a</sup>	0,43 <sup>NS</sup>	0,37 <sup>NS</sup>	0,54 <sup>NS</sup>
		High	2,40 <sup>a</sup>	3,82 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	0,52 <sup>NS</sup>	0,32 <sup>NS</sup>	0,40 <sup>NS</sup>
<i>Poa pratensis</i>		Intermediate	0,82 <sup>NS</sup>	0,73 <sup>NS</sup>	0,60 <sup>NS</sup>	0,18 <sup>NS</sup>	0,15 <sup>NS</sup>	0,17 <sup>NS</sup>
		High	0,84 <sup>NS</sup>	0,77 <sup>NS</sup>	0,86 <sup>NS</sup>	0,19 <sup>NS</sup>	0,12 <sup>NS</sup>	0,14 <sup>NS</sup>
<i>Trifolium repens</i>		Intermediate	0,97 <sup>ab</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	0,12 <sup>abc</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,14 <sup>bc</sup>
		High	2,01 <sup>b</sup>	1,08 <sup>ab</sup>	1,02 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>c</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>ab</sup>

**Table III-6 :** N and S effect on the mean N : S ratio of *Lolium perenne*, *Agrostis capillaris*, *Poa pratensis* and *Trifolium repens* grown in community.

Statistic test revealed very significant N and S effect on N : S ratio for each species and phase (see Table V-1).

			N : S ratio					
		S level	Establishment phase			Regrowth phase		
			Low	Intermediate	High	Low	Intermediate	High
<i>Lolium perenne</i>	N level	Low	12	8	7	12	6	4
		Intermediate	17	9	7	17	7	6
		High	45	15	11	56	22	11
<i>Agrostis capillaris</i>		Low	12	10	10	12	11	10
		Intermediate	16	12	11	15	13	13
		High	22	15	14	19	16	14
<i>Poa pratensis</i>		Low	10	8	8	14	8	8
		Intermediate	14	10	10	19	9	8
		High	29	14	13	23	14	12
<i>Trifolium repens</i>		Low	23	18	15	29	35	24
		Intermediate	27	18	17	30	37	27
		High	34	23	18	28	32	31

and N gradients while that of *T. repens* decreased with increasing S availability at high N only.

#### E. N : S ratio

The N : S ratio (**Table III-6**), strongly varied among treatments, especially for grass species. For the latter, in both establishment and regrowth phases, N : S ratio increased with N supply (from 12 to 45 at low S for *L. perenne*) and decreased with S supply (from 45 to 11 at high N for *L. perenne*). N : S ratio of *T. repens* was less altered by both N and S gradients suggesting that this species was more able to maintain its internal N : S equilibrium. At regrowth phase (right side of **Table III-6**), *T. repens* showed much higher N : S ratios than those of grasses except at high N - low S.

### **IV. Discussion**

#### A. Effect of N and S availabilities on species performance at establishment phase

At establishment phase, as expected (*e.g.* Jones *et al.* 1973; Marschner 1986; Harris & Clark 1996; McKenzie 1996; Zemenchick & Albrecht 2002), grasses yields in community strongly increased with increasing N availability. RPP and REP profiles of species indicated that their physiological performance assessed in population did not fully reflect their ability to compete with other species and then was not the only factor explaining their success or subordination in community. Interspecific competition for both soil nutrients, then light, mostly modulated species hierarchy and their relative performance in community.

*L. perenne* performance, that means shoot S content, S use efficiency (RSUE) and N allocation to growth (shoot N content per plant remained stable whereas N% DM decreased), was increased by intermediate S level in community, especially at low N. That suggests that S limitation may constrain *L. perenne* growth in unfertilized grassland. However, whatever N and S levels, its dominance persisted, and it emerged as the best ecological performer. This dominance was not based on absolute physiological performance - it could even be the worst physiological performer (see RPP at low N treatments) - but on its competitiveness against

other species. That confirms Aguiar *et al.* (2001) findings who showed this species to be more affected by intraspecific competition than by interspecific competition. This competitiveness has been explained by its larger root system, described as deeper and more prospective (Boot & Mensink 1990) in community than in population (Marriott & Zuazua 1996). These authors suggested that this allowed *L. perenne* to exploit soil more efficiently than others and to supplant them, even at low N. Indeed, we proved that *L. perenne* possessed the highest RNUE and RSUE per plant, projecting this species as the best soil forager and exploiter. Accordingly, *L. perenne* possessed the highest capacity to allocate N to aboveground growth and grew faster. This allowed it to exert a negative pressure on all adjacent species by altering the quality and quantity of light that infiltrates through the canopy as showed by Laidlaw & Withers (1998). Our results also agree with those of Hodge *et al.* (1999, 2000) on *L. perenne* - *P. pratensis* mixture, who showed that the first, although less performing than *P. pratensis* in monoculture, produced much higher root length and density, taking up more soil N in mixture. Indeed, we proved that *P. pratensis*, with the lowest RNUE and RSUE whatever treatment in community, had the lowest capacity to exploit soil. It appeared as the poorest ecological performer and was the subordinate species whatever the N and S conditions.

*A. capillaris* was the best physiological performer, confirming the results of Crush *et al.* (2005), who, comparing eleven temperate forage grass species in a single growth phase experiment, found that this species benefited from the highest nitrate uptake per unit root weight. However, when grown in a community it was out-competed by *L. perenne*. In grassland, such subordination of this species is well known, and has been attributed to its lower canopy height than other grass species (especially *L. perenne*) resulting in shading (Barthram *et al.* 2005). However, at high N, S clearly enhanced its biomass production and its ecological performance close to that of *L. perenne* in community. In contrary to other species its shoot N content increased, projecting this species as a strong competitor for nutrient uptake. This emphasizes the conclusions of Newbery & Wolfenden (1996) suggesting that to perform in high N soils, *A. capillaris* needs a high availability of other major nutrients. Our results explain this fact by the enhancement of N use efficiency (RNUE) with an increasing S availability. Accordingly, S increased *A. capillaris* competitiveness, and putted it as a strong soil surface exploiter, closed to *L. perenne*, which exploited the deeper soil. At variance with the theory of Grime (1979), high nutrient availability reduced competition between these two species, both *P. pratensis* and *T. repens* suffering from the higher competitive abilities of the latter for nutrient uptake.

If N clearly enhanced dry matter production of grasses whatever the S level, this effect was restricted to low S for *T. repens* grown in community. N had sharper effect on its N budget. At low S, along the N gradient, we observed a decrease in N% DM and an increase in N derived from <sup>15</sup>N-fertilizer (NDFF) applied at experiment start. These findings underline that N<sub>2</sub> fixation was altered by N, as suggested by Macduff *et al.* (1996) and Soussana *et al.* (2002). Moreover, at high N, S gradient altered its dry matter production. This can be explained by a lowering of its relative competitive ability to capture S in N-rich soil community, as N decreased both its shoot S content and S use efficiency (RSUE). In perennials grasses – clover community, this finding enlarges results of Gilbert & Robson (1984a) on annual *Trifolium subterraneum/Lolium rigidum* mixture, which showed that grass absorbs more S at the expense of the legume especially under high N availability. In both population and community, the negative N effect, especially at low S, resulted in a decrease in relative physiological and ecological performances of *T. repens*, in agreement with numerous studies in grasslands (Simon *et al.* 1997).

## B. Effect of N and S availabilities on species performance at regrowth phase

As for the establishment phase, N clearly enhanced DM production of grasses and their physiological and ecological performances (RPP and REP), this especially at low S. *L. perenne* and *A. capillaris* physiological and ecological performances followed almost the same pattern at low and intermediate N: relative ecological performances are governed by their specific aptitude to take up N and S at these N levels. Accordingly, *L. perenne* performed better than other grasses as it did at establishment phase. However at high N, REP reflected RPP only at high S. That means that competitive ability for S or relative S requirement dominated physiological ability to exploit the environment.

At high N – low S, both *L. perenne* and *A. capillaris* dominated the community, the latter being the best competitor. Such pattern could be attributed, according to Crush *et al.* (2005), to a higher nitrate interception ability of *A. capillaris*, this being crucial in a poorer N soil than at establishment. But our results also suggest others mechanisms implying that S requirement is different according to species. *L. perenne*, the most N and S demanding grass, as proved by its highest shoot N and S contents, N and S use efficiency, was in such condition probably S-limited. This species was indeed characterized by a very high N% DM, more than twofold higher than at other S availabilities, indicating that N was not diluted into biomass but

accumulated without contributing to growth. This emphasized Freney *et al.* (1978) and Gilbert *et al.* (1997) findings on wheat and barley that growth rate was reduced and amides accumulated when a lack of S for protein synthesis occurs. In contrast *A. capillaris*, which requires less S (lower shoot S % DM and RSUE) than *L. perenne* in poorer N soil, performed better. This shows that the metabolism of S and N are also closely co-ordinated in grassland species and that grass species relative performance clearly depends on both absolute N and S availabilities and their ratio. This also implies that internal N : S ratio greatly varied, as when one nutrient was deficient, the other accumulated without being use for growth.

At high N - intermediate S, *L. perenne* and *T. repens* replaced *A. capillaris*. The increase in S availability benefited to *L. perenne*, which, in a less deficient S soil condition, emerged as the best competitor. As discussed for establishment phase, this probably lays on a more optimal root foraging than other species in community, allowing it to mobilize nutrients more efficiently than other species, whereas in population each *L. perenne* individual clearly suffered from intraspecific competition.

As observed at establishment phase, *P. pratensis* was the subordinate species and appeared to be a poor competitor even at high N - high S supply where it however showed a high physiological performance (RPP). This result illustrated that of Bender *et al.* (2006) who showed that in community *P. pratensis* produced 44% less dry matter than in population, other species being stronger competitors. As in the establishment phase, the gap between the potential performance suggested by its RPP and the realized performance in community may be explain by the repression of root development in the presence of other grass species such as *L. perenne* (Hodge *et al.* 1999, 2000). Indeed, in community, *P. pratensis* was characterized by the worst N and S use efficiencies, indicating that it was the worst competitor for nutrient capture.

*T. repens* was generally the best physiological performer and the best competitor in most treatments. Under low N availability, *T. repens* showed the highest physiological and ecological performances. In these oligotrophic soils, atmospheric N<sub>2</sub> fixation was not altered by high soil N availability and it performed well, whereas grass species did not meet their optimal N requirement. At intermediate N, *T. repens* still dominated even if REP of grasses increased, especially at low S. At both these N levels, the dominance of *T. repens* was amplified along the S gradient. At high N - low S, *T. repens* had lower physiological and ecological performances than *L. perenne* and *A. capillaris*. As previously discussed for establishment phase, in such condition grasses dominated because (i) N<sub>2</sub> fixation was altered and (ii) grasses competed better for soil N. Indeed, even if *T. repens* showed a high shoot N

content, high N - low S treatment was characterized by the highest absolute NDFF and RNUE proving that the contribution of N<sub>2</sub> to N nutrition decreased. The most relevant result is that at the same high N level, high S availability allowed *T. repens* to suppress grasses. Indeed, its DM production strongly increased, as its shoot N% DM, shoot S % DM, S derived from <sup>34</sup>S-fertilizer (SDFF) and S use efficiency (RSUE) whereas N derived from <sup>15</sup>N-fertilizer (NDFF) and N use efficiency (RNUE) significantly decreased, proving that *T. repens* exploited more efficiently another N source. As soil was almost depleted in native mineral N at the beginning of the experiment, as poor organic N mineralization occurred (data not shown) and as *T. repens* poorly competed with grasses for soil N, this other source should be considered as mainly N derived from N<sub>2</sub> fixation processes. Therefore a higher S availability enhanced N<sub>2</sub> fixation or suppressed inhibition caused by high soil N availability. This strong relationship between S nutrition and N acquisition by *T. repens* was emphasized by the parallel dynamics of RSUE values and shoot N content. DeBoer & Duke (1982), dealing with *Medicago sativa* L. and Habtemichial *et al.* (2007) with *Viscia faba* L., have already shown that S supply increased N<sub>2</sub> fixation in N-rich environment and that subsequent effects of S deficiency may be due to loss of fixed N. Our study suggests that a similar mechanism may occurred in plant communities integrating *T. repens*, giving the latter a competitive advantage, and allowing its persistence in high N fertilized conditions.

In general terms, even if nutrient capture fell for grasses at regrowth phase, increasing S availability generally resulted in an increase in N% DM, especially at low and intermediate N availabilities (right side of **Table V-4**), and even in a significant increase in shoot N content for *L. perenne*. In that case, S effect may be indirect and linked with the high performance of *T. repens* which could benefit to grass species from higher N transfer from *T. repens*.

## **V. Conclusion**

Our results show that S gradient clearly alters both physiological and ecological performances of species, their competitive abilities and plant community structure. It modulates N gradient effects at both population and community scales. S effects emerged at establishment phase, but strongly increased at regrowth after cutting of mature plants, when competition for nutrient increased. These effects depended both on the relative N : S requirements of species and on their competitive ability to take up N and S along the two

combined gradients in community. It was also based on the enhancement of N use efficiency by S availability. Indeed, along the S gradient grasses N use efficiency was promoted while *T. repens* N<sub>2</sub> fixation strongly increased, or remained high in high N soils. This conferred to the latter a strong competitive advantage in high S compared to low S soils, this being essential in high N environment in allowing it to compete and avoid competitive exclusion. Based on positive effect on dominant species *L. perenne* and *T. repens*, increasing S availability promoted the increase of whole plant community DM whatever N availability. As a result, S depletion of soils appeared to affect both plant community structure and productivity. Conversely, S fertilisation of grasslands, especially in high N fertilized grasslands, emerged as a tool of plant diversity modulation and potentially of leguminous species management.

### **Acknowledgments**

We wish to thank R Ségura and AF Ameline for assistance in the maintenance of the experiment. We also thank P Beauclair and J Bonnefoy for help during harvests, and T Gordon for linguistics corrections and for commenting on the manuscript.

**RÉSULTATS**

-

**CHAPITRE IV**

*Effets d'une fertilisation azote/soufre sur la production et la diversité  
des prairies  
(article 4)*

## Plan du Chapitre IV des résultats

***Préambule***

**Abstract**

**I. Introduction**

**II. Methods**

- A. Study site
- B. Experimental design
- C. Vegetation data
- D. Data analysis

**III. Results**

- A. Sown *Lolium – Trifolium* grassland
- B. Natural grassland

**IV. Discussion**

**V. Conclusion**

## CHAPITRE IV

-

**The effect of sulphur / nitrogen fertilization on grassland production and diversity**

**(Article 4)**

---

---

Tiphaine Tallec<sup>1</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1</sup>, Servane Lemauiel - Lavenant<sup>1</sup>, Virginie Séguin<sup>1</sup>, Alain Ourry<sup>1</sup>

*Article soumis à Agriculture, Ecosystems & Environment.*

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale Agronomie & nutritions N, C, S (EVA), Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

**Key words:** N fertilization, S fertilization, plant community dynamics, grassland

## Préambule

Dans les chapitres précédents, la co-disponibilité en S et en N a été montrée comme facteur de structuration de communautés végétales modèles. Nous avons explicité les conséquences d'un double gradient de fertilité initiale  $N \times S$  sur leur production et composition et décrit les mécanismes impliqués. En cela nous avons validé les principales hypothèses émises au terme de l'analyse bibliographique. Notre objectif est maintenant de confirmer ces résultats *in situ*, afin d'établir de manière certaine (i) si la disponibilité en S est bien le facteur de structuration envisagé, (ii) si son action est bien fonction de la co-disponibilité en N et (iii) **l'impact à court terme d'un double gradient N : S sur la structure et le fonctionnement de communautés végétales de prairies bas-normandes.**

Pour cela, nous avons mis en place deux dispositifs expérimentaux, l'un dans une prairie temporaire *L. Perenne/T. repens* implantée à cette fin, l'autre dans une prairie naturelle mésophile - mésotrophe. Élargissant les modalités testées en mésocosme, un double gradient  $N \times S$ , correspondant cette fois au croisement de 3 niveaux d'N (0, 60 et 180 kg ha<sup>-1</sup>) et de 4 niveaux de S (0, 15, 30 et 60 kg ha<sup>-1</sup>), est appliqué selon les dispositifs décrits dans la partie matériels et méthodes. Les dynamiques, induites par la manipulation du niveau de fertilité des communautés, sont envisagées en termes de production globale saisonnière et annuelle ainsi qu'en termes de production relative (et donc d'abondance) des différentes espèces au printemps. Les résultats présentés correspondent aux 2 premières années (2005 et 2006) de récolte.

Nos résultats montrent, pour l'instant, un effet discret du gradient de S appliqué sur la production des prairies. Par contre, ils confirment clairement le rôle du S dans le déterminisme de la structuration des communautés, en permettant notamment le maintien de *T. repens* en situation de fertilisation azotée élevée et en permettant, en prairie naturelle, à des espèces dominées initialement au sein de la matrice végétale d'augmenter leur contribution à la communauté. Ces résultats permettent de valider l'hypothèse **(8)** proposant un effet positif du S sur le maintien voire l'augmentation de la diversité végétale et fonctionnelle.

Cette expérimentation a permis la rédaction d'une publication soumise en mars 2008 à *Agriculture Ecosystems & Environment*.

## Abstract

Sulphur (S) deficiency has been shown to be widespread throughout many regions of Europe. The objectives of our study were to examine (1) the effect of various levels of S fertilizer (0, 15, 3 × 20, 30 and 60 kg ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>), at various levels of nitrogen (N; 0, 3 × 20 and 3 × 60 kg ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>) fertilizer, on herbage yield and (2) the combined effect of both fertilizers on floristic composition. The results are presented from two field experiments, a natural grassland and a sown *Lolium perenne* - *Trifolium repens* grassland located in Normandy, where three annual cuts of herbage were carried out in 2005 and in 2006. The cutting trial showed that N fertilization promoted a better annual herbage production in both grasslands. A high level of N application also enhanced the dominance of *Lolium perenne* in sown grassland only. S fertilization increased autumn herbage production of sown grassland in the first year of the experiment, but only at the high level of N application. S fertilizer also allowed *Trifolium repens* to maintain its growth in both grasslands when moderate N levels were applied. When N was applied at 180 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> in the absence of S, *Trifolium repens* completely disappeared. S fertilizer had no effect on herbage yield from natural grassland but enhanced the abundance of certain species. This suggests that the application of S fertilizer combined with the application of N fertilizer constitutes an important factor to increase herbage production and moreover to modulate floristic and functional diversity.

## **I. Introduction**

For two decades, SO<sub>2</sub> emissions from industrial gaseous pollution has greatly declined (Murphy & Boggan 1988), inducing a dramatic decrease in atmospheric deposition of S on most northern Europe natural ecosystems and farmlands. This results in S deficiency in croplands and grasslands, especially when S export in farm products are not replaced by S fertilization (Blair *et al.* 1978). This phenomenon has been documented by Donald *et al.* (1999) who stated that 2/3 of Scotland grasslands soils may be S deficient. S deficiency is known to reduce yields and quality of crops, such as oilseed rape (McGrath & Zhao 1995), wheat (Withers *et al.* 1995) and barley (Adiputra & Anderson 1995). In addition, reduced atmospheric S return, leading to a low S availability for plants, has been proved to lower productivity and to affect grassland species composition, occurring firstly in naturally poor S soils (Walker *et al.* 1956). Therefore, S fertilization appeared to be a tool to maintain or increase grassland productivity (Walker & Adams 1958; Sinclair *et al.* 1996; Morton *et al.* 1999; Brown *et al.* 2000). It may also be used as a tool to modify species balance, as species may differ in their nutrient requirements (Jones *et al.* 1973; Scherer 2001). For example, Walker *et al.* (1956) showed that the level of applied gypsum (CaSO<sub>4</sub>) can alter the balance between grasses and legumes. Others demonstrated that the S effect depends on the availability of other macronutrients like N (Gilbert & Robson 1984a, b; Brown *et al.* 2000), P (Cullen 1971) or on soil type (Morton *et al.* 1999; Brown *et al.* 2000). However, most studies have dealt with ryegrass/clover mixtures, grown in mesocosms (Gilbert & Robson 1984a, b) or sown in hay fields (Morton *et al.* 1998), or with grasse populations and low diversity mixtures (Murphy & Boggan 1988; Murphy & Quirke 1997; Murphy *et al.* 2002; Lamond *et al.* 1995). Studies dealing with sown pluri-species or natural plant communities (Walker *et al.* 1956; Walker & Adams 1958; Cullen 1971) did not often consider species balance but only relative performances of grasses *versus* other species (Ceccotti & Messick 1997).

Until now, there has been little published data and few conclusions on the impacts of S availability and/or fertilization on grassland diversity and plant community structure at species scale. In contrast to other countries like New-Zealand (Walker *et al.* 1956) or southwest and southeast USA (Martin 1958; Williams *et al.* 1954; Kalmbascher *et al.* 2005), which are subject to high sulfate leaching, S deficiency appeared later in grasslands of Northern Europe (Scott *et al.* 1983; Schnug & Haneklaus 1992; Scherer 2001), and studies seldom took S availability into account. The objectives of the current study were to

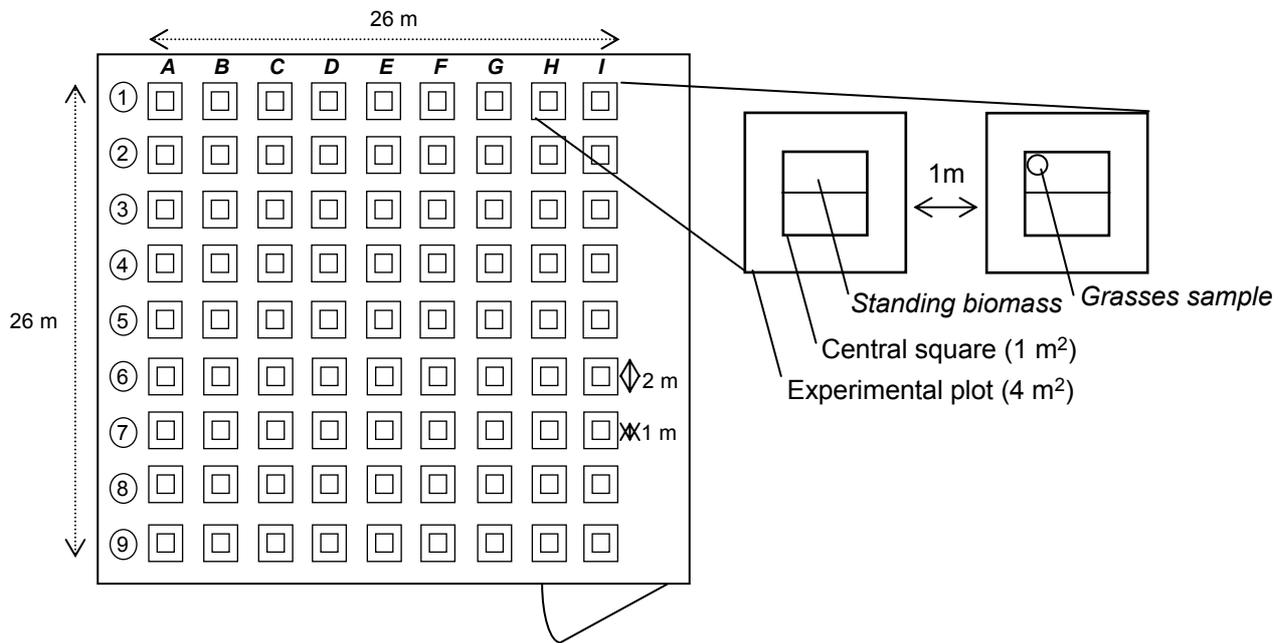
investigate changes in grassland plant communities, representative of Western European farmlands, induced by the application of combinations of S and N fertilizer levels. Observations were made on a natural multi-species grassland and a sown *Lolium perenne* - *Trifolium repens* grassland over two growing seasons; 2005 and 2006.

## II. Methods

### A. Study site

The study site was located at the INRA experimental station “Le Vieux Pin”, Le Pin au Haras, France (54°19'N, 0°14'W, elevation 205 m). The climate is oceanic, with cool mean air temperature (5.5°C in winter, 17°C in summer) and rainfall almost evenly distributed through year (760 mm / year). The two years of experiment (2006 and especially 2005) were characterized by warmer and dryer than normal summer (June - September) months. Parent rock consists in Cretaceous silex-clay. The soil is silty-clay (36.7% clay, 41.3% silt, containing 4.2% of organic matter, 3.18‰ of total N and 1‰ of total S; pH 6,1), showing hydromorphy marks under 20 cm. The landscape is characterized by a dense hedgerow network enclosing mostly natural grasslands devoted to pasture and hay production. This area has been dominated by grasslands for 3 centuries ago, when a national stud farm was built at this site.

The experiment was carried out in two fields: a natural grassland and a newly established *Lolium perenne* (cv Pastoral and Barmilka; 90%) and *Trifolium repens* (cv Alice; 10%) grassland. The natural grassland corresponded to an anthropogenic meso-hygrophilous pastured *Lolium perenne*-*Cynosuretum cristati* (Br. Bl. and de Leeuw 37) Tüxen 37 grassland. At the start of the experiment, the sward was dominated by *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Alopecurus geniculatus* then *Agrostis capillaris*. The most frequent interstitial species were *Poa pratensis* and *P. trivialis*, *Phleum pratense*, *Trifolium repens* and *Ranunculus repens*. This grassland had not been fertilized or ploughed for at least 50 years. One year before the start of experiment a 900 m<sup>2</sup> subplot was enclosed to exclude cattle and to settle experimental plots. The second grassland was established in October 2004 in a field included in a rotation consisting of five years grassland followed by two years maize. The cultivars of *L. perenne* and *T. repens* used in this grassland were those most often sown locally.



**Figure IV-1 :** Experimental plots design in the natural grassland.

## B. Experimental design

The experiment was arranged in a Latin square (**Figure IV-1**). For both grasslands, 3 N levels were tested in combination with 4 S levels. N was applied as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  at 0, 60 (conventional fertilization level of local natural grasslands:  $(3 \times 20)$ ,  $\text{N}_{60}$ ) and  $180 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$  (fertilization level of local intensive hay fields:  $(3 \times 60)$ ,  $\text{N}_{180}$ ), in three applications (the first in April; the second and third one week after the first and second cuts). S was applied as  $\text{CaSO}_4$  at 0, 15, 30 or  $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$  in April (treatments  $\text{S}_0$ ,  $\text{S}_{15}$ ,  $\text{S}_{30}$ ,  $\text{S}_{60}$ ) or on three occasions ( $\text{S}_{3 \times 20}$ ), as described for N above. This resulted in 15 treatments. For the natural grassland, a 16<sup>th</sup> was tested, and consisted in  $180 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$  combined with  $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ S}$ , applied as elemental S. Each treatment was replicated 5 times. In addition to N and S application, each plot received a basal fertilization of Potassium ( $150 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ ) and Phosphorus ( $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ ), to avoid potential depletion effect of these two macronutrients. The experiment started in April 2005.

Each treatment plot was  $4 \text{ m}^2$  in size and separated from each other by a 1 m path (**Figure IV-1**). The 0.5 m edges of plots were considered as buffer areas, so that only the central  $1 \text{ m}^2$  was sampled. Three cuts were taken each year, in mid June, late July and early October. Cutting height was fixed at 5 cm.

## C. Vegetation data

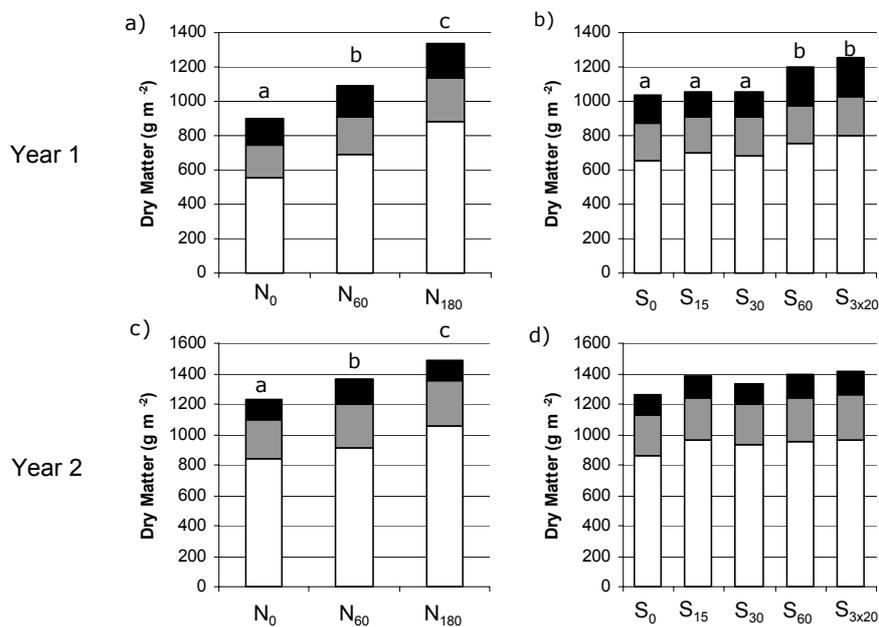
One half of each central  $1 \text{ m}^2$  was sampled to estimate biomass. It was divided into grasses and forbs, each forb species being separated at the first cut (mid June). Samples were dried at  $65^\circ\text{C}$  until constant mass. Each year, at mid June, in order to determine the relative contribution of each grass species to standing biomass, a sample corresponding to a 20 cm diameter ring (De Vries & Kruijne 1960), was harvested in one corner of the central  $1 \text{ m}^2$  (**Figure IV-1**). This represented plot vegetation at the start of the experiment. Samples were sorted by species, which then were dried to establish their relative abundance.

Two years of data are considered here. Effects on grassland production encompassed two entire growth periods (year 1 and year 2), but effects on species composition were assessed 3 and 15 months after the start of fertilization.

**Table IV-1** : N and S effects on grassland dry matter production and on *L. perenne* and *T. repens* spring yield in sown grassland.

Results of F (ANOVA): \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.5$ ; +  $p \leq 0.1$ ; NS, not significant.

		Year 1						Year 2						
		N		S		N/S		N		S		N/S		Transf
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	
<i>Sown grassland</i>	<b>Spring cut</b>	21.65	***	0.51	NS	1.51	NS	9.98	***	1.11	NS	0.7	NS	
	<b>Summer cut</b>	6.34	**	0.27	NS	0.84	NS	3.34	*	0.54	NS	0.54	NS	
	<b>Autumn cut</b>	1.24	NS	3.17	*	0.26	NS	4.49	*	0.73	NS	0.66	NS	
	<b>Total yield</b>	31.27	***	2.12	+	1.49	NS	10.47	***	1.43	NS	0.75	NS	
	<i>L. perenne</i>	19.43	***	0.63	NS	1.56	NS	37.95	***	0.29	NS	1.08	NS	
	<i>T. repens</i>	2.38	+	0.49		1.83	+	62.60	***	3.12	*	0.83	NS	√x
<i>Natural grassland</i>	<b>Spring cut</b>	2.41	+	0.61	NS	1.55	NS	14.77	***	0.22	NS	0.58	NS	
	<b>Summer cut</b>	4.49	**	0.49	NS	0.79	NS	12.34	***	0.91	NS	1.40	NS	
	<b>Autumn cut</b>	12.23	***	1.32	NS	1.14	NS	29.35	***	0.38	NS	1.47	NS	
	<b>Total yield</b>	8.09	**	0.59	NS	1.22	NS	31.65	***	0.22	NS	0.45	NS	



**Figure IV-2** : Total dry matter yield in the **sown grassland** for the different N and S treatments investigated at spring (white), summer (grey) and autumn (black) cuts.

Means of: a), N treatments year 1; b), S treatments year 1; c) N treatments year 2; d), S treatments year 2.

Two different uppercase letters indicate a significant difference between treatments (Tuckey test,  $P \leq 0.05$ )

## D. Data analysis

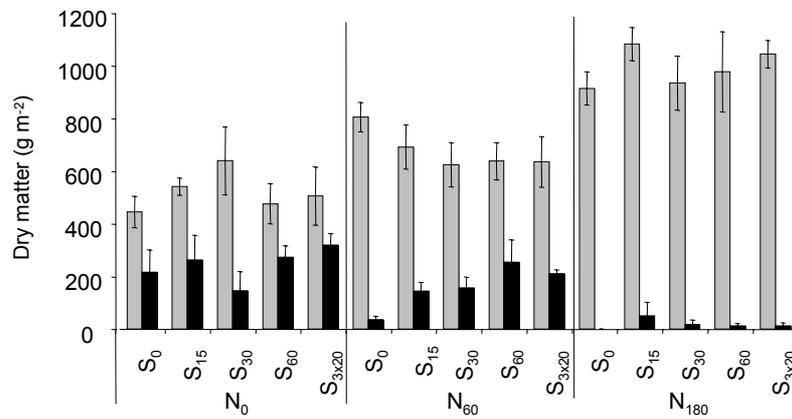
For the sown grassland, treatment effects on both species and standing biomass were assessed by ANOVA, using Minitab 13. When necessary, data were transformed to meet statistical assumptions. Differences among treatments were determined, at the 5% probability level, using the Tukey HSD test. Because of weed invasion, 6 plots should be excluded at field margin in rows A and B. The treatment effects on natural grassland standing biomass were also evaluated by ANOVA. The contribution of fertilization on species relative composition (biomass %) differences between plots was evaluated by Canonical Correspondence Analysis (CCA; Ter Braak 1986), using ADE-4 software (Thioulouse *et al.* 2001). Because of their scarcity, some congeneric species were pooled for CCA: *Poa ssp* regrouped *P. pratensis* and *P. trivialis*, *Rumex ssp* regrouped *R. conglomeratus* and *R. obtusifolius*.

## III. Results

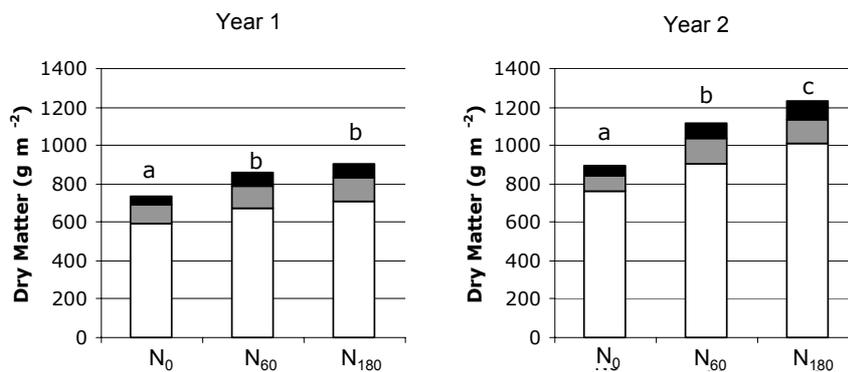
### A. Sown *Lolium* – *Trifolium* grassland

Annual dry matter production was significantly enhanced by N application, respectively by 1.22 (N<sub>60</sub>) and 1.48 (N<sub>180</sub>) times more in year 1 and by 1.12 (N<sub>60</sub>: ns) and 1.22 (N<sub>180</sub>) times in year 2 (**Table IV-1** and **Figure IV-2**). The N effect was more important year 1. In both years, N fertilization effect was greatest at the spring cut, then declined and became non-significant at the autumn cut (**Table IV-1**). Increasing S inputs also tended to enhance grassland production, especially in year 1 ( $P \leq 0.1$ ; **Table IV-1**). Compared to the S<sub>0</sub> treatment, S<sub>60</sub> increased yield by 1.15 times in year 1 (**Figure IV-2b**) and 1.11 times in year 2 (**Figure IV-2d**). The significance of the S effect depended on season, being dominant at the autumn cut in year 1. The S<sub>60</sub> treatment significantly enhanced autumn dry matter production ( $P \leq 0.05$ ; **Table IV-1**), promoting a 1.37 times higher yield than the S<sub>0</sub> treatment.

At the spring cut, fertilizations altered species balance. In the first year, *L. perenne* clearly dominated sward even in N<sub>0</sub> treatments, accounting for more than 90% of standing biomass (data not shown). Its dominance declined by the second year mostly in N<sub>0</sub> and to a lesser extent in N<sub>60</sub> treatment, contributing 65.4% (N<sub>0</sub>S<sub>60</sub>) to 87% (N<sub>60</sub>S<sub>0</sub>) of the standing biomass (**Figure IV-3**). In N<sub>180</sub> treatment, *T. repens* was excluded from the S<sub>0</sub> plots and



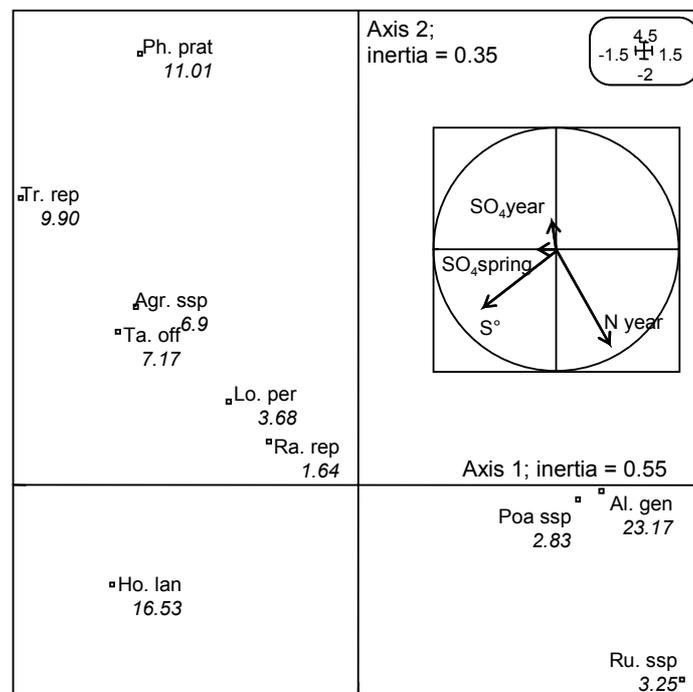
**Figure IV-3 :** Dry matter yield of *Lolium perenne* (grey; N effect;  $P \leq 0.001$ ) and *Trifolium repens* (black; N effect ;  $P \leq 0.001$ ) in the **sown grassland** for the different levels of N and S fertilization, at spring cut year 2 (means  $\pm 1$  SE, n = 5 plots for all but  $N_{60}$  treatments: n=4).



**Figure IV-4 :** Total dry matter yield in the **natural grassland** for the different N treatments investigated at spring (white), summer (grey) and autumn (black) cuts.

Means of: a), N treatments year 1; b), N treatments year 2.

Two different uppercase letters indicate a significant difference between treatments (Tuckey test,  $P \leq 0.05$ )



**Figure IV-5 :** Canonical Correspondence Analysis (CCA) ordination diagram showing the correlation between species [square], and fertilization variables (arrows) in the **natural grassland** year 2.

$SO_4$ year: total S applied in year;  $SO_4$ spring: S applied in spring;  $S^\circ$ : elemental S; N year: total N applied in year. Number in italic represent the amount of the total variation in species distribution explained by fertilization variation. Agr. ssp: *Agrostis ssp*; Al. gen: *Alopecurus geniculatus*; Ho. lan: *Holcus lanatus*; Lo. pe: *Lolium perenne*; Ph. prat: *Phleum pratense*; Poa. ssp: *Poa ssp*; Ra. rep: *Ranunculus repens*; Ru. ssp: *Rumex ssp*; Ta. off: *Taraxacum officinale*; Tr. rep: *Trifolium repens*.

represented only a small proportion in S fertilized plots. In both years, compared to control (N<sub>0</sub>), increasing N significantly enhanced *L. perenne* biomass (**Table IV-1**), by 1.3 (N<sub>60</sub>) and 1.67 (N<sub>180</sub>) in year 1 and by 1.43 (N<sub>60</sub>) and 1.84 (N<sub>180</sub>) in year 2. S fertilization had no significant effect on the latter and only tended to increase its abundance at N<sub>60</sub> in year 1 (by 1.15). Concurrently, compared to N<sub>0</sub>, increasing N resulted in a significant decrease in *T. repens* biomass in year 2 (**Table IV-1; Figure IV-3**), by a factor 2 (N<sub>60</sub>) and 14 (N<sub>180</sub>). In the first year, a N×S interaction emerged ( $P \leq 0.1$ ; **Table IV-1**): at intermediate spring S fertilizations (S<sub>30</sub> and S<sub>3x20</sub>), increasing N inputs tended to increase *T. repens* biomass whereas it decreased it at other S fertilization levels. In year 2, S inputs tended to increase *T. repens* abundance ( $P \leq 0.05$ ; **Figure IV-3**), especially in N<sub>0</sub> and N<sub>60</sub> plots.

## B. Natural grassland

Annual dry matter production in the natural grassland was also significantly enhanced by N application (**Figure IV-4**), by 1.16 times at N<sub>60</sub> and 1.23 times at N<sub>180</sub> in year 1, and by 1.25 times and 1.38 times in year 2 compared to N<sub>0</sub>. The N effects were significant at each of the 3 annual cuts although it was greatest at the autumn cut (**Table IV-1**). No S effect was detected on standing biomass.

In year 1, no effect of N or S fertilizations emerged on species composition. In year 2, at the spring cut (15 months after experiment start), CCA revealed that 10.7% of species distribution among plots were explained by N and S fertilizations. Plan 1-2 of the CCA demonstrated opposite effects of N and S inputs (**Figure IV-5**). Application of elemental S in N<sub>180</sub> plots induced a distinct change in dynamics compared with those induced by the same amount of SO<sub>4</sub>-S (S<sub>60</sub>). Four species were more sensitive than others to fertilization: *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Phleum pratense* and *Trifolium repens*. Fertilization accounted for 23.1%, 16.5%, 11% and 9.9% of their respective distribution variation. The first two are matrix species and the two others interstitial species. The abundance of *A. geniculatus* was significantly enhanced by N ( $P \leq 0.001$ ): by 1.87 and 2.16 times respectively for N<sub>60</sub> and N<sub>180</sub>. At N<sub>180</sub>, elemental S application doubled the dry matter production of *H. lanatus* whereas the same amount of S applied as SO<sub>4</sub>, had no effect. *P. pratense*, a sparse species, was significantly noticeable in some S fertilized plots, however N tended to decrease its dry matter production (by a factor 5 between N<sub>0</sub> and N<sub>180</sub>) and its contribution to standing biomass. The abundance of *T. repens* was reduced 10 fold by N fertilization (N<sub>180</sub>) ( $P \leq 0.01$ ). S slightly increased dry matter production of *T. repens* and its contribution to the standing

biomass. Fertilization impact on the distribution of other species was weaker. The highest biomasses of *Agrostis capillaris* and *Taraxacum officinale* (with respectively 7.7% and 6.9% of their distribution explained by fertilization) were obtained in S fertilized plots where S inputs enhanced their abundance. However, their scarcity altered the significance of this trend. *Poa ssp*, *Lolium perenne*, *Ranunculus repens* and *Rumex ssp* appeared to be poorly influenced by fertilization. Differences in N and S inputs accounted for less than 3% of the variation in their abundance.

#### **IV. Discussion**

Production in both grasslands essentially depended on N fertilization. As expected (e.g. Jones *et al.* 1973; Marschner 1986; Harris and Clark 1996; McKenzie 1996; Zemenchick & Albrecht 2002), yields significantly increased with N inputs. S fertilization marginally improved the standing biomass of the sown *Lolium – Trifolium* grassland in year 1, especially at autumn cut, but had no effect on that of natural grassland. Poor effects of S fertilizers in grassland considered deficient in S was also reported by (Murphy & Boggan 1988), but this contrasts with most studies which indicated an improvement of hay yields when S was applied (Walker & Adams 1958; Lamond *et al.* 1995; Ceccotti & Messick 1997). Such lack of response to S application had been attributed to sufficient S in the soil for plant growth, or to a deficiency in another nutrient, which lowered or suppressed the impact of fertilization (Cullen 1971). Clay dominated soil, which enhanced the adsorption of sulfate, had also been pointed out (Brown *et al.* 2000). However, we selected a silty-clay soil, poor in S, and N fertilization strongly increased standing biomass production, proving that the soil could not be considered deficient in other nutrients. Moreover, S increased yield in the sown grassland by the autumn of year 1. Morton *et al.* (1999) showed that drought or low rainfalls induced a lack of S uptake by plants and suppressed the S effect on dry matter production. This suppression was overcome in irrigated grasslands. The two years of our field trial experiment were characterized by much dryer than average climatic conditions during the summer growth period. This climatic anomaly may explain this lack of significance, as experiments performed with the same soil under glasshouse and well-irrigated conditions demonstrated that S inputs increased dry matter production (data not shown). Similar positive effects of S at the autumn cut, compared with other seasons, had already been reported in Scotland (Scott *et al.* 1983) and Ireland (Murphy & Boggan 1988, Murphy & Quirke 1997; Murphy *et al.* 2002).

According to Nziguheba *et al.* (2005), this delay in S effect, compared to N effect, should not be attributed to a temporary immobilization of the sulfate applied. Indeed, they showed that the application of S fertilizer increased S mobilization.

N and S fertilizations altered plant community composition in both grasslands. N decreased *T. repens* performance and drastically reduced its abundance, especially in the sown grassland. Such alteration is well known and had been attributed to the parallel repression of N<sub>2</sub> fixation by a high soil N availability (Macduff *et al.* 1996; Soussana *et al.* 2002) and the inferior competitiveness of *T. repens* to that of grasses in such conditions (Simon *et al.* 1997). S inputs moderated and even suppressed the N effect. In the sown grassland, when an intermediate S fertilization was applied, N inputs increased *T. repens* dry matter production in year 1. In year 2, increasing S enhanced *T. repens* dry matter production in N<sub>0</sub> and especially in N<sub>60</sub> plots, and allowed *T. repens* to maintain in some N<sub>180</sub> plots. These results enlarge the positive effects of S fertilization described by Gilbert and Robson (1984a, b) on annual *Trifolium subterraneum*, even under high N, to perennial species. In the natural grassland, we also found that S tended to moderate the negative effect of N on the abundance of *T. repens* (similar to Walker *et al.* (1956) working on a *Trifolium* overseeded grassland, but not on natural populations). This general positive effect of S supply may be analyzed as a derepression or increase in *Trifolium* species N<sub>2</sub> fixation in rich N soils as shown with *Medicago sativa* by DeBoer and Duke (1982). These results clearly establish S fertiliser as a tool to control *T. repens* persistence in grassland systems. It may indirectly favour the N budget of the whole crop as leguminous species transfer N resulting from N<sub>2</sub> fixation to grasses by root exudation (Høgh-Jensen & Schjoerring 1997; Elgersma *et al.* 2000; Paynel *et al.* 2001) and decomposition of dead roots (Høgh-Jensen & Schjoerring 2000). As noted above, *L. perenne* largely benefited from N fertilization in the sown grassland. However, as noted by Sinclair *et al.* (1996), only small responses of S inputs occurred with *L. perenne*. This contradicted other experiments dealing with *L. perenne* dominated grasslands, which suggested a positive effect of S supply on yields regardless of N fertilization level (Murphy & Quirke 1997).

In the natural grassland, species balance was not altered in year 1. In year 2, the most responsive species to fertilization in the natural grassland was *A. geniculatus*: its biomass production significantly increased with N input. This genus is known to be nutrient requiring, *A. geniculatus* being found in mesotrophic to eutrophic soil conditions. Studies dealing with alluvial meadows dominated by *Alopecurus pratensis* also demonstrated a significant increase

in dominance of this species when a NPK fertilization was applied (Honsova *et al.* 2007). However, the significant increase of its biomass, in a dryer than average year, moreover in a meso-hygrophilous soil which is not optimum for this drought sensitive species, is surprising. Other grasses were not favored by N inputs. *A. geniculatus* emerged as a stronger competitor for N than the two other co-dominant species, *L. perenne* and *H. lanatus*. *P. pratense* was not favored by N inputs. This could be because of its scarcity in the grassland matrix, or because of the greater competitive ability of other species to take up this nutrient, as this species does benefit from N application when grown in monoculture (Hall *et al.* 2003; Malhi *et al.* 2004). S inputs appeared to increase its dry matter production and contribution to standing biomass. This trend has been noted previously by Mahli *et al.* (2004), in some of their experimental monospecific hay fields, but never in natural pluri-species grassland communities. Elemental S input enhanced the biomass production of *H. lanatus* and its contribution to standing biomass. This was not due to an increase in S availability, as the same amount of applied SO<sub>4</sub>-S had no effect. This phenomenon could be attributed to a slight soil acidification, due to elemental S oxidation by *Thiobacillus*, as observed by Gilbert *et al.* (2003). Such increase in this short rhizomatous species may induce at mid term a lowering of botanical diversity and of hay quality. So Elemental S inputs should be avoided when this species is noticed in the grassland matrix.

## V. Conclusion

Over the short term, S fertilization emerged as a potential tool to enhance autumn yield and to increase or maintain the abundance of *T. repens* in sown grasslands, especially when high levels of N fertilizer are applied. S may also enhance natural grassland diversity by favoring some interstitial or initially dominated species such as *P. pratense* and *A. capillaris*. The significance of these effects may have been partly hidden by drought. However, the nature of the S fertilizer used should be carefully considered as elemental S could enhance *H. lanatus* abundance, and so lower the nutritive value and species diversity of hay. Taking these considerations into account, S fertilization clearly appeared as a tool to manage and drive grassland plant communities.

## **Acknowledgments**

We wish to thank all technical staff, from the INRA experimental station “Le Vieux Pin”, for their assistance in the establishment and maintenance of the experiment. We also thank P Beauclair, D Ballois, M Coustenoble, R Ségura, AF Ameline and J Bonnefoy for help during harvest and sorting of species. T. Gordon (IGER) improved the manuscript through helpful comments.

***DISCUSSION GÉNÉRALE***

## Plan de la discussion générale

### **I. Les effets d'une déficience en soufre sur la dynamique des prairies**

### **II. Les effets d'un apport en soufre sur la dynamique des prairies**

A. L'effet soufre est fonction de l'espèce et de la situation de voisinage

*A.1 Les Poacées*

*A.2 La Fabacée*

B. Les effets du soufre sur la structure des communautés

C. Pourquoi moins d'effets sur la productivité *in situ*

### **III. Intérêts agronomiques et agro-écologiques**

### **IV. Synthèse**

---

## DISCUSSION GÉNÉRALE

---

La double approche mésocosme - terrain que nous avons menée, a permis de valider l'effectivité du rôle de la disponibilité en S sur la productivité (*hypothèse 1*) - celle-ci est plus forte lorsque la quantité de S mise à disposition de la plante augmente - et de montrer son influence sur la structure et la diversité de communautés végétales modèles de prairie. À l'échelle de l'individu, les effets du S sont dépendants de l'espèce (*hypothèse 2*), de la disponibilité en N (*hypothèse 3*) et du voisinage (*hypothèse 4*; Chapitres I, II & III). À l'échelle de la communauté modèle, l'abondance relative des espèces est dépendante des disponibilités absolues et relatives en S et en N (*hypothèse 6*; Chapitres I & III). Le rôle de la disponibilité en S sur le maintien d'une diversité floristique et fonctionnelle (*hypothèse 8*) en situation de forte disponibilité en N a été souligné. La persistance de *T. repens* dans la matrice prairiale est notamment dépendante d'une disponibilité élevée en S (*hypothèse 7*). L'efficacité d'acquisition des ressources azotées et soufrées est l'une des clés du résultat des interactions entre espèces (*hypothèse 5*). L'aptitude physiologique à mobiliser ces ressources (évaluée en population) n'est pas la seule caractéristique déterminante; la capacité à entrer en compétition pour celles-ci, notamment grâce à une vitesse de croissance ou une capacité de prospection supérieure, est fondamentale à cette échelle (Chapitre III). Le rôle du S dans l'efficacité d'utilisation de l'N a également été montré (Chapitres II & III). Les résultats obtenus en mésocosme sur la structuration des communautés végétales ont été confirmés à court terme, à l'échelle de l'écosystème, sur des systèmes pluri-spécifiques complexes (Chapitre IV). L'objet de ce chapitre est de discuter des implications agronomiques et écologiques de ces résultats. Dans un premier temps, les conséquences d'une déficience en S, au sein de prairies gérées de manière conventionnelle, c'est-à-dire fertilisées en N, seront considérées. Dans un deuxième temps, les effets d'un apport de S, par exemple sous forme de fertilisants minéraux comme nous l'avons pratiqué, seront discutés. Parallèlement, nous envisagerons les mécanismes à l'origine de cet "effet S".

### **I. Les effets d'une déficience en soufre sur la dynamique des prairies**

Les effets d'une faible disponibilité en S (niveau  $S_0$ ) se manifestent essentiellement en situation de forte disponibilité en N, c'est-à-dire dans une situation correspondant à celle des

prairies fertilisées de manière conventionnelle en N-P-K. Dans ce contexte, la stimulation de la productivité globale par la fertilisation azotée est toujours sensible et correspond à l'effet N escompté (Reid 1966 ; Plantureux 1983 ; Willems *et al.* 1993 ; Keating et O'Kiely 2000 ; Laws *et al.* 2000 ; Olde Venterink *et al.* 2001 ; Fridley 2002 ; Trott *et al.* 2004 ; Aydin & Uzun 2005). La production des Poacées est fortement stimulée, alors que celle du trèfle est altérée. Par exemple, pour les associations ray-grass/trèfle blanc que nous avons considérées, une fertilisation élevée en N ( $N_{180}$ ) entraîne un accroissement de la production globale d'environ 40%, avec cependant une réduction de celle du trèfle d'environ 20 % en mésocosme et jusqu'à sa disparition totale *in situ*. L'utilisation d'engrais marqué  $^{15}\text{NO}_3^{15}\text{NH}_4$  en mésocosme, nous a permis d'expliquer ces résultats et de confirmer les observations de Macduff *et al.* (1996) et Soussana *et al.* (2002), qui sont celle d'une restriction de la fixation de l' $\text{N}_2$  par la fertilisation azotée. Dans ces conditions, le trèfle est amené à privilégier l'absorption de l'N minéral du sol comme principale source d'alimentation azotée. Cela est sans incidence sur sa production en culture pure, nos résultats corroborant ceux de Davidson & Robson (1990). Cependant, en situation de compétition avec les Poacées, sa production ainsi que l'absorption de l'N minéral sont réduites, et la réduction de la fixation de l' $\text{N}_2$  n'est plus compensée. Simon *et al.* (1997) expliquent cette faible aptitude à la compétition de *T. repens* par une vitesse de croissance aérienne et souterraine plus lente que celles des Poacées, notamment en phase d'établissement. Collins *et al.* (2003) proposent que l'avantage compétitif des Poacées dans ces milieux riches en N, est dû à une meilleure valorisation des produits issus de l'assimilation de l'N *via* l'allocation préférentielle de ces derniers vers le développement ou l'élaboration de nouveaux tissus photosynthétiques aériens. L'élongation et l'élargissement des feuilles de Poacées altèrent alors l'accessibilité de *T. repens* à la lumière qui voit ses performances diminuées.

En l'absence de S, l'effet bénéfique d'une fertilisation azotée élevée sur le niveau de production des prairies doit donc être mis en balance avec son impact négatif sur l'abondance, voire le maintien du trèfle. En cas de déficience en S, nos résultats suggèrent une plus faible pérennité des associations Poacées/Fabacées et une réduction de la diversité spécifique des prairies naturelles en milieu riche en N. Dans cette situation, l'impact de l'augmentation de la disponibilité en azote sur les communautés prairiales correspond au "humped back model" (Grime 1979 ; Tilman 1982). Celui-ci prévoit que le long d'un gradient trophique, si la biomasse augmente de manière progressive, la richesse spécifique augmente tout d'abord jusqu'à un niveau moyen de fertilité, puis décroît ensuite, la richesse maximale correspondant à un niveau de fertilité moyen et une production de biomasse intermédiaire. En accord avec ce

modèle, la comparaison entre les traitements N<sub>0</sub>, N<sub>50</sub>-N<sub>60</sub> et N<sub>180</sub> de notre étude, présente une évolution similaire de la diversité spécifique, voire de la richesse spécifique, le trèfle étant exclu de certaines placettes *in situ* fortement fertilisées en N (N<sub>180</sub>). Pour un niveau d'N disponible élevé, les espèces très compétitives comme *L. perenne* deviennent dominantes et supplantent les autres espèces.

## **II. Les effets d'un apport en soufre sur la dynamique des prairies**

### A. L'effet soufre est fonction de l'espèce et de la situation de voisinage

#### A.1 Les Poacées

Concernant les Poacées, **les effets d'un apport en S sont dépendants de la disponibilité en N du sol et se manifestent uniquement en situation de forte disponibilité en N**, c'est-à-dire dans une situation correspondant à celle des prairies très fertilisées en N. Ces résultats, obtenus en mésocosme, sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour le ray-grass, cultivé en hydroponie (Piquery 2000) ou *in situ* (Murphy & Quirke 1997 ; Brown *et al.* 2000). Les résultats concernant *A. capillaris* et *P. pratensis* sont par contre originaux. Il n'avait encore jamais été montré que le S pouvait stimuler spécifiquement leur productivité. Ces deux espèces fréquentes dans les prairies naturelles d'Europe de l'Ouest peuvent former un tapis dense en sous strate. Par son action stimulante sur leur production, le S pourrait favoriser la "fermeture" de la prairie. Cependant, en communauté modèle (mésocosme), le S stimule davantage la production de *L. perenne* que celle de ces deux espèces. *A. capillaris* voit bien sa production stimulée lors de la phase d'établissement, mais cet effet disparaît en phase de repousse. *P. pratensis*, qui répond positivement au S en population, ne présente aucune réponse en communauté. *L. perenne*, espèce à stratégie exploitatrice et à vitesse de croissance plus rapide, supprime ces deux dernières probablement par son système racinaire plus prospectif et par un effet ombrage. Ce phénomène serait sans doute moins prononcé ou systématique en prairie, et particulièrement en prairie pâturée, que dans nos mésocosmes.

Notre étude, *via* l'utilisation d'isotope <sup>15</sup>N et <sup>34</sup>S, précise les mécanismes impliqués dans ces réponses au S. Nous avons montré que **l'apport de S augmente les capacités d'*A. capillaris* et de *L. perenne* à absorber l'N minéral**. Nos résultats confirment ceux obtenus

par Piquery (2000) sur *L. perenne* cultivé en hydroponie en démontrant que cet effet est retrouvé sur sol, dans des conditions proches de celles *in situ*. Brown *et al.* (2000) travaillant sur des prairies à ray-grass anglais, enregistraient une augmentation du ratio N exporté dans la biomasse / N apporté par les fertilisants en réponse à la fertilisation soufrée. Nos résultats démontrent que c'est bien l'efficacité d'absorption et de valorisation des engrais qui est directement impliquée dans ce phénomène. En situation d'N fortement disponible, l'apport de S est ainsi favorable dans un premier temps à la synthèse protéique, et dans un deuxième temps à la production. En effet, quand la disponibilité en N est élevée, une déficience en S conduit à l'accumulation d'amides, faute de S pour la synthèse de protéines (Gilbert *et al.* 1997). **L'apport de S permet donc à la plante de restaurer sa croissance. D'autre part, les analyses isotopiques ( $^{34}\text{S}$ ) ont révélé qu'un apport élevé d'N stimule les capacités des 3 Poacées, *L. perenne*, *A. capillaris* et *P. pratensis*, à capturer le S du sol.** En effet, quand la disponibilité en S est élevée, une déficience relative en N conduit à l'accumulation de S (sous forme de sulfate) dans la plante, faute d'N pour la synthèse protéique. L'apport d'N permet alors de restaurer la croissance. Ceci nous montre clairement qu'il existe au sein de ces Poacées prairiales une véritable co-régulation entre métabolisme soufré et métabolisme azoté, co-régulation dont nous discuterons des incidences dans le chapitre suivant.

**L'ensemble de ces résultats implique (1) que le S module les effets positifs de l'N sur la production de chaque Poacée, en les amplifiant, (2) qu'en son absence, il peut être limitant pour leur croissance probablement en raison d'un déséquilibre du ratio N : S interne des Poacées et (3) qu'il y a chez ces espèces prairiales une étroite dépendance entre nutriments azoté et soufré.**

#### A.2 La Fabacée

**Nos résultats montrent tout d'abord que l'apport de S favorise la reproduction végétative de *T. repens*** (nombre et biomasse des stolons). Ce sont des résultats importants, car le maintien du trèfle au sein des prairies dépend en grande partie de ses capacités à la multiplication végétative (Chapman 1987). Une déficience en S apparaît donc nettement comme un facteur limitant sa croissance. **Nos travaux mettent en évidence que le S intervient aussi sur la quantité et potentiellement la qualité des protéines solubles stockées au niveau des organes de réserves spécifiquement, les stolons.** Ces réserves azotées constituent un pool qui peut être mobilisé lors de période suivant la suppression

partielle des tissus photosynthétiques (fauche, pâturage), où les besoins en N sont élevés pour la reprise de croissance. **La relation positive entre l'accumulation de protéines solubles et la disponibilité en S du sol fait de ce dernier un facteur clé dans les processus de repousse de *T. repens*.** Nos résultats montrent ainsi, qu'en l'absence de S, la reprise de croissance de *T. repens* après fauche est beaucoup moins forte (jusqu'à 10 fois moins) qu'en présence de S. Ces résultats démontrent que **la disponibilité initiale en S conditionne bien la production de biomasse lors des cycles fauche - repousse. Plus la disponibilité en S est élevée, plus la production est importante.**

Outre l'utilisation de ces réserves, les analyses isotopiques  $^{15}\text{N}$  que nous avons pratiquées nous donnent une autre explication, fort intéressante d'un point de vue éco-physiologique. Elles montrent que **l'apport de S stimule nettement la fixation de l' $\text{N}_2$  chez *T. repens*, voire réprime l'effet négatif de l'N sur ce processus.** En effet si aux faibles disponibilités en S, comme discuté dans le chapitre précédent, une disponibilité croissante en N augmente la proportion d'N issu de l'engrais et diminue parallèlement le contenu en N de *T. repens*, l'apport simultané de S contrecarre ces effets. Il diminue la proportion d'N issu de l'engrais et augmente parallèlement, très fortement, le contenu en N de *T. repens* via la stimulation de la fixation de l' $\text{N}_2$ . Nos résultats confirment en cela les hypothèses de Sinclair *et al* (1996a) et de Gilbert & Robson (1984a) d'un effet bénéfique sur la fixation, hypothèses qui n'avaient pas à notre connaissance été validées pour cette espèce. Selon Scherer & Lange (1996) qui enregistrent des effets similaires sur d'autres Fabacées, *Medicago sativa* (déjà étudiée par Aulakh *et al.* 1976 et DeBoer & Duke 1982) *Trifolium pratense*, *Vicia faba* et *Pisum sativum*, ceci est lié à une stimulation de la nodulation et de l'activité nitrogénase. **Ces observations faites sur d'autres Fabacées, et la nôtre, nous permettent d'élargir le rôle du S et les dangers des déficiences en S à tout le groupe fonctionnel qu'elles constituent.**

L'ensemble des résultats sur l'absorption conjointe de l'N et du S, obtenus grâce à l'utilisation de leurs isotopes stables montrent qu'il existe aussi chez les espèces prairiales, à l'image de ce qui était connu jusqu'à présent chez les espèces de grandes cultures (Koprivova *et al.* 2000 ; Prosser *et al.* 2001), des **interactions entre les deux métabolismes azoté et soufré à travers une co-régulation entre l'absorption du S et celle de l'N, ou la fixation de l' $\text{N}_2$ .** Dans ce dernier processus, la nutrition soufrée semblerait jouer un rôle primordial compte tenu du contenu en S élevé du complexe enzymatique Nitrogénase (Mortenson & Thornley 1979) et des acides aminés de la ferredoxine impliqués dans le transfert d'électrons

(Yoch 1979). En cas de déficience en S, l'efficacité d'utilisation de l'N minéral est plus faible chez les Poacées, alors que chez *T. repens* c'est la fixation de l'N<sub>2</sub> qui est affectée. Cela signifie notamment, qu'en l'absence d'un des 2 éléments, l'assimilation et/ou la valorisation du second, par exemple son affectation à la croissance du végétal, est minorée. Si nous reprenons l'exemple d'une déficience en S, l'action d'un gradient d'azote sera totalement différente de celle observable en l'absence de déficience. Les croissances des Poacées et des Fabacées seront toutes deux restreintes, de manière différente selon les espèces et, comme nous venons de le préciser, par des mécanismes physiologiques différents selon les groupes fonctionnels (pour ce qui nous concerne, graminoides *versus* Fabacées).

## B. Les effets du soufre sur la structure des communautés

En mésocosme, les espèces répondent différemment au niveau de S disponible dans le sol, en fonction de la disponibilité en N du sol, de la situation de voisinage et de la phase de croissance (phase d'établissement/phase de repousse). Il en résulte une modification de la structure des communautés modèles, en termes de proportion relative des espèces. *In situ*, si les deux prairies du dispositif expérimental ne présentent pas de réponses au S aussi marquées que celles observées en mésocosme, les fertilisations azotée et soufrée initient néanmoins, dès la deuxième année d'expérimentation, des dynamiques de végétation tranchées.

En mésocosme, durant la phase d'établissement, quel que soit le niveau d'N, *L. perenne*, espèce à croissance rapide, domine ou co-domine les communautés. Ayant une capacité plus élevée que celle des autres Poacées modèles à capturer les ressources du sol (Marriott & Zuazua 1996 ; Hodge *et al.* 2000), il possède un avantage compétitif sur ces dernières. Même si l'apport d'N bénéficie également aux autres Poacées, il favorise davantage *L. perenne*. En revanche, nous avons montré que **lorsque le sol est très riche en N, une disponibilité modérée à forte en S élève la compétitivité ainsi que la production d'*A. capillaris* à un niveau voisin de celui de *L. perenne***, lors de la phase d'établissement. L'apport de S peut ainsi permettre de maintenir une diversité plus élevée en stimulant la production et l'abondance relative d'espèces moins compétitives pour l'N en milieu pauvre en S.

L'analyse des indices de compétitivité dans les expérimentations en mésocosme indique que *T. repens* subit moins fortement la compétition des autres espèces en phase de

repousse qu'en phase d'implantation. Cela peut être interprété comme le résultat du développement progressif de ses capacités à fixer l' $N_2$ , permettant une séparation de niche écologique, comme le sous-entend Woledge (1988). En accord avec ce dernier, nos résultats montrent que cet avantage du trèfle est plus net en présence d'une faible disponibilité en N. **Lorsque la disponibilité en N est élevée, l'apport initial de S, même modéré, contrebalance l'effet négatif de l'N sur sa production, en réprimant, comme nous l'avons discuté, la restriction de la fixation de l' $N_2$ . L'apport de S favorise ainsi la ségrégation de la niche écologique de *T. repens*.** Non seulement il lève ainsi la compétition pour l'N du sol mais stimule aussi l'acquisition de l'N, son allocation et celle du S vers la croissance, notamment des organes aériens. Ceci favorise la mise en réserve de l'N dans les organes de réserve que sont les stolons, dont la croissance est synonyme d'une meilleure multiplication végétative. Tout cela concourt à une augmentation significative de l'abondance de *T. repens*. *In situ*, une fertilisation légère à forte en S permet ainsi l'augmentation de l'abondance relative de *T. repens* et notamment son maintien au sein du couvert végétal quand le sol est très enrichi en N, où en l'absence de S il disparaît complètement. **En situation de fertilisation azotée élevée, l'application d'une fertilisation soufrée permettrait donc à *T. repens* de se maintenir au sein de la communauté.**

### C. Pourquoi moins d'effets sur la productivité *in situ*

Les effets bénéfiques du S sur la production de MS dans les expérimentations en mésocosme n'ont pas été retrouvés de manière significative dans celles *in situ* (Chapitre IV). En 2006, après deux cycles de fertilisation, si l'impact de la fertilisation azotée est net, celui du S sur la productivité des deux prairies, semée et permanente, est quasiment inexistant. La plupart des études focalisées sur les effets du S en cultures fourragères ont pourtant enregistré une nette amélioration de leur productivité (Murphy & Boggan 1988 ; Lamond *et al.* 1995 ; Murphy & Quirke 1997). Une des explications pourrait être que les sols des prairies de Basse-Normandie de notre site étude ne sont pas encore en situation de carence importante. Pourtant un effet du S sur la prairie semée est enregistré en 1<sup>ère</sup> année sur son regain d'automne lors de la 3<sup>ème</sup> récolte. Ce pourrait être le résultat d'une variabilité interannuelle et intersaison des effets du S, ou tout au moins d'un effet " stade de développement ", la prairie semée voyant sa production augmentée lors de sa première année d'exploitation. Cette variabilité peut être attribuée **(1) soit à une absence de carence en S, due à une minéralisation importante au printemps** qui probablement répond aux besoins soufrés des espèces présentes en libérant les

quantités de S requises à ce moment de l'année; **(2) soit à une réduction de l'absorption du S minéral par les plantes due à un des conditions climatiques plus sèches provoquant la diminution de l'humidité des sols** (Morton *et al.* 1999) ; **(3) soit au type de sol qui, limono-argileux, est susceptible d'adsorber le S minéral appliqué.** Néanmoins, les effets du S sur la proportion relative de certaines espèces sont manifestes. Ceci souligne l'existence d'un seuil de réponse au S, propre à chaque espèce. En prairie naturelle, la fertilisation soufrée favorise l'abondance relative de *Phleum pratense*. En prairie semée très fertilisée en N, elle assure le maintien de *T. repens* au sein de la communauté. *L. perenne* quant à lui, à l'inverse des résultats obtenus en mésocosme, semble non limité et bénéficier de la quantité requise en S.

La différence d'amplitude de réponse au S entre l'expérimentation *in situ* et celle en mésocosme peut être également la résultante d'une différence de régimes de fauche. **Une perturbation, comme la fauche, permet la réalisation de niches plus diversifiées via l'amélioration temporaire de la disponibilité de certaines ressources, telles que la lumière.** Collins *et al.* (1995) montrent que l'augmentation ou la diminution d'une fréquence de perturbation "intermédiaire" entraîne une diminution de la richesse spécifique. Nos résultats laissent supposer que le régime de fauche appliqué *in situ* n'a peut-être pas été suffisamment rapide pour permettre aux espèces de dimension plus réduite que les Poacées dominantes, comme *T. repens*, *Agrostis capillaris*, *Poa spp* en prairie naturelle, d'avoir un accès suffisant à la lumière. Leur production, restreinte, n'a pas été modifiée par l'apport de S (et d'N pour certaines d'entre elles). La pratique d'un rythme de défoliation plus court, correspondant à un pâturage tournant, pourrait accentuer les effets de la fertilisation soufrée sur la production relative des différentes espèces et par conséquent sur la diversité. Une fréquence de défoliation plus élevée permettrait par exemple au trèfle de moins subir la compétition pour la lumière et de "profiter" *in situ* de l'effet S observé en mésocosme lors de la phase de repousse.

### **III. Intérêts agronomiques et agro-écologiques**

De notre étude ressortent des intérêts agronomiques et agro-écologiques forts de la fertilisation soufrée.

(1) Nos résultats soulignent que **la fertilisation soufrée peut permettre en prairie semée, une meilleure production**. Cette augmentation de la production est plus particulièrement sensible dans les systèmes fortement fertilisés en N. D'après les résultats issus de nos mésocosmes, en conditions climatiques favorables, elle pourrait atteindre 40 %. En prairie semée, nous avons constaté que cet effet était plus prononcé à l'automne, période où la production d'herbe est souvent plus restreinte. Ceci nous conduit à envisager, grâce à la fertilisation soufrée, le maintien d'une production plus homogène au cours du cycle de végétation avec un meilleur rendement automnal qui pourrait permettre notamment un maintien plus tardif des herbivores au champ.

(2) **La fertilisation soufrée favorise simultanément la contribution relative du trèfle, en augmentant sa production de biomasse, en améliorant son potentiel de repousse et en favorisant sa multiplication végétative. Ceci est source d'augmentation de la pérennité des associations fourragères Poacées/Fabacées et permet l'allongement des cycles de re-semis des prairies**, source d'économie à l'échelle de l'exploitation. Nos travaux soulignent l'importance de mettre en place la fertilisation soufrée dans les prairies très fertilisées en N dès le début du cycle d'une culture afin que l'implantation et le développement du trèfle soient une réussite. En outre, l'augmentation et la pérennisation de la contribution du trèfle à la communauté végétale se répercutent sur les points suivants.

(3) **La fertilisation soufrée améliore la qualité fourragère globale des prairies** (il est considéré qu'une proportion de 10% à 30% de trèfle améliore la qualité fourragère des prairies) mais également celle des différentes espèces composant la matrice végétale. L'apport de S conduit à des teneurs en N et en S des plantes et notamment à des teneurs en protéines plus élevées. Par conséquent, **le S améliorerait l'appétence et la valeur alimentaire**, ceci se répercutant sur la qualité et la quantité des produits dérivés. Par exemple, MacCaskill & Blair (1988) montrent que la fertilisation soufrée présente un impact positif non négligeable sur la quantité et la qualité de la viande et de la laine produites par des moutons.

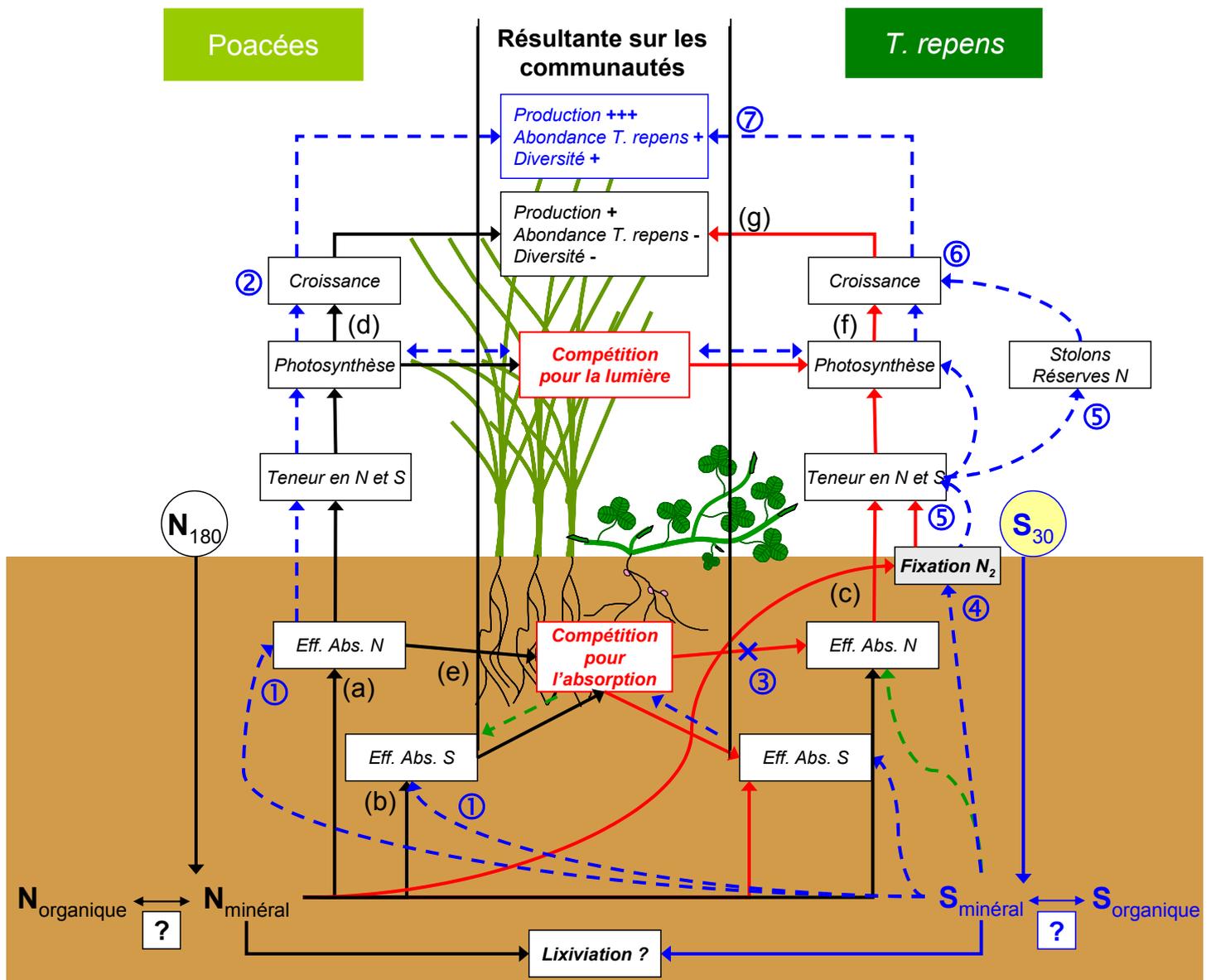
(4) **La fertilisation soufrée permet le maintien de la diversité fonctionnelle des prairies et une meilleure économie de l'azote à l'échelle de la parcelle**. Par le maintien, voire l'augmentation de l'abondance, d'espèces exprimant l'aptitude à fixer l' $N_2$ , la fertilisation soufrée permet **une entrée majeure d'N dans l'écosystème**, estimée à  $90 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$  dans des systèmes prairiaux analogues aux nôtres (Vertès *et al.* 1997). Cet N bénéficie

directement à l'ensemble de la communauté végétale, soit par transfert direct vers les Poacées compagnes, ou indirect lors du recyclage de la litière des Fabacées (Paynel *et al.* 2001). **La pratique d'une fertilisation soufrée conduisant ainsi à l'enrichissement des écosystèmes en N, pourrait réduire l'utilisation d'engrais azoté.**

**(5) La fertilisation S permet de limiter les impacts environnementaux négatifs de la fertilisation N.** Elle permet en effet aux plantes, de mieux valoriser l'engrais N apporté. L'efficacité d'utilisation de l'engrais est augmentée et la proportion d'engrais restant dans le sol limitée, ce qui permet la diminution de la proportion d'engrais susceptible d'être lixiviée, comme l'ont suggéré Brown *et al.* (2000).

**(6) La fertilisation soufrée permet de maintenir, voire d'augmenter la diversité floristique.** En mésocosme, l'abondance relative de *T. repens*, mais aussi d'*Agrostis capillaris* peuvent être augmentées par l'apport de S. En prairie naturelle, nos résultats montrent également que certaines espèces dominées au sein de la matrice végétale, comme *Phleum pratense*, mais aussi *T. repens*, *A. capillaris* et *Taraxacum officinale* voient leur abondance relative augmenter. Ceci nous permet d'espérer à terme une diversification des prairies fortement fertilisées en S, par le développement d'espèces dominées, ou présentes dans la banque de graines ou dans le proche environnement. Ceci pourrait à terme être source d'une augmentation de l'appétence des fourrages et de la qualité des produits dérivés (Coulon 1997 ; Guichard *et al.* 2006).

**La fertilisation soufrée constitue ainsi un outil permettant de moduler la diversité des écosystèmes prairiaux.** Il peut être employé tant dans un objectif de production et de "qualité agronomique" des prairies que dans **un objectif d'ingénierie écologique** de maintien, voire d'augmentation de la diversité, notamment des prairies soumises à une fertilisation azotée importante, dans un contexte de gestion agricole. **Il est adaptable en jouant à la fois sur les quantités apportées**, les différentes espèces ne présentant pas les mêmes exigences, **et sur la forme appliquée.** Si des engrais soufrés sulfatés, comme le gypse, présentent l'avantage d'être rapidement mis à disposition pour la végétation et de nettement favoriser la productivité, mais aussi comme nous l'avons souligné la diversité des prairies, ils présentent aussi l'inconvénient d'être facilement lixiviés pouvant potentiellement conduire à des sols carencés en S au cours de l'année (Chaitep *et al.* 1994). Cependant, le choix d'un apport à chaque coupe, ou après chaque cycle de pâturage, combiné à la



**Figure 36 :** Synthèse des mécanismes déterminant le résultat des interactions spécifiques entre Poacées et *T. repens* en situation de disponibilité forte en azote et faible en soufre (flèches continues) et en situation de co-disponibilité forte en azote et soufre (flèches en pointillés).

**En cas de disponibilité élevée en azote (fertilisation N),** l'efficacité d'utilisation de l'N (a) et du S (b) des Poacées, et par conséquent leur production (d) sont nettement stimulées. Ceci favorise leur compétitivité pour l'absorption des nutriments (e) et pour l'accès à la lumière, cela au détriment de *T. repens*. La capacité à fixer l' $N_2$  de ce dernier est réprimée (c). De ce fait, *T. repens*, moins productif (f), voit sa contribution relative chuter (g). Même si l'apport élevé et unique d'N augmente la production de la communauté, il ne favorise cependant pas le maintien de sa diversité (g).

**En cas de co-disponibilité élevée en azote et en soufre (fertilisation combinée N/S),** les effets positifs de l'N sur l'efficacité d'utilisation de l'N et du S ① des Poacées sont amplifiés, conduisant à une meilleure production ②. De plus, l'apport de S diminue la pression de compétition, pour les ressources du sol ③, exercée par les Poacées sur *T. repens*, en stimulant la fixation de l' $N_2$  ④. Par conséquent, l'acquisition et la mise en réserve de l'N par *T. repens* sont supérieures ⑤, ce qui induit une meilleure production aérienne ⑥, et permet à sa contribution relative d'augmenter ⑦. Non seulement une meilleure co-disponibilité en S permet une meilleure production de la communauté, mais elle permet aussi de conserver sa diversité ⑦.

Effets N (flèches continues)

—→ : induction ou effet positif

—→ : répression ou effet négatif

Effets S (flèches en pointillés)

- -> : induction ou effet positif

- -> : répression ou effet négatif

fertilisation azotée, permet de lever cet inconvénient en répartissant les apports sur l'année, réduisant les risques de lixiviation et maximisant la co-disponibilité N : S. Il faut cependant garder en mémoire que le gypse a parallèlement un effet de rehaussement du pH, ce qui peut être, selon les cas, un avantage ou un inconvénient (pour une flore typiquement silicicole). À l'inverse, le S élément ( $S^{\circ}$ ) présente l'avantage d'être lentement mis à disposition de la végétation, ceci tout au long de l'année. À court terme, son effet est donc plus faible que celui des formes sulfatées, mais à moyen terme les effets sont analogues (Mahli 2000 ; cf. analyse bibliographique). L'effet de ce type d'engrais et sa rapidité d'action restent en partie dépendants de la taille des particules de  $S^{\circ}$ . Plus leur taille est importante, plus elles sont difficilement oxydées et lentement mis à disposition pour les plantes. Le  $S^{\circ}$  présente par contre la particularité d'acidifier les sols. Ceci en fait un outil de génie écologique, déjà utilisé, notamment pour la restauration des landes et milieux oligotrophes acides associés (Roem *et al.* 2002). En prairie naturelle, nous avons constaté des effets analogues avec le développement d'*Holcus lanatus* qui suggère l'oligotrophisation et l'acidification conjointe du milieu. D'un point de vue agronomique, ce résultat souligne un obstacle important pour son utilisation dans les parcelles où cette espèce traçante, dotée d'une faible valeur alimentaire et d'une faible appétence, est présente. D'un point de vue écologique, il montre que le  $S^{\circ}$  apparaît aussi comme un outil d'oligotrophisation et d'acidification de prairies améliorées, permettant leur retour à un état antérieur. Il convient néanmoins de raisonner son utilisation, toujours afin d'éviter la prolifération d'*H. lanatus* qui, si elle devient trop abondante, affecte la biodiversité en la réduisant.

#### IV. Synthèse

Quand une prairie n'est pas ou est modérément fertilisée en N, la fertilisation soufrée ne favorise pas la production des Poacées alors que celle de *T. repens* augmente, lui conférant un avantage compétitif. Lorsqu'une prairie est uniquement très fertilisée en N, les Poacées voient leur efficacité d'utilisation de l'N (**Figure 36-a**) et du S (**Figure 36-b**) augmenter, alors que la fixation de l' $N_2$  chez *T. repens* est inhibée (**Figure 36-c**). La productivité et la compétitivité des Poacées sont accrues (**Figure 36-d, e**), alors que celles de *T. repens*, et par conséquent sa contribution relative à la communauté, chutent (**Figure 36-f, g**). En revanche, lorsque qu'une prairie est très fertilisée en N, une fertilisation, même modérée, en S permet à *L. perenne* d'augmenter de manière plus conséquente son efficacité d'utilisation de l'N

(**Figure 36-①**), sa production (**Figure 36-②**) et potentiellement d'accroître sa domination des autres Poacées. Elle permet aussi à *T. repens* de ne plus subir aussi fortement la compétition interspécifique (**Figure 36-③**), grâce à une meilleure ségrégation de sa niche écologique impulsée par la dé-répression de la fixation de l' $N_2$  (**Figure 36-④**). Il devient ainsi plus productif que lorsque l' $N$  est appliqué seul (**Figure 36-⑤**), et son abondance est maintenue voire augmentée (**Figure 36-⑥**). Cet effet S sur le trèfle rejoint la théorie de Huston & DeAngelis (1994) qui postulent qu'un décalage dans la balance des ressources peut conduire à la limitation d'une ressource par la limitation d'une autre ressource. Dans notre cas, la déficience en S limite la fixation de l' $N_2$ . Une fertilisation soufrée plus élevée engendre la co-dominance de *T. repens* avec l'ensemble des Poacées en mésocosme et son maintien *in situ* au sein du couvert végétal.

L'application combinée de S et d' $N$  entraîne ainsi un glissement de l'équilibre compétitif et permet d'éviter la réduction de la diversité spécifique observée quand l' $N$  est appliqué seul. Cela se traduit de manière théorique par un déplacement de la courbe du "Humped back model" traduisant les effets d'un gradient de fertilité (ici  $N$ ) pour un niveau constant des autres ressources. En cela, nos résultats sont en accord avec la théorie de la balance des ressources qui intègre la valeur de plusieurs ressources (Tilman 1982 ; Braakhekke & Hooftman 1999). Cette théorie prédit que les espèces peuvent coexister selon un équilibre compétitif dans un environnement homogène où le ratio des ressources, optimum, est maintenu constant. Lorsque de l' $N$  est apporté seul, l'équilibre est rompu et la diversité chute. Par contre, lorsque les 2 éléments sont apportés de manière combinée, l'équilibre  $N : S$  est maintenu et le niveau de diversité conservé, voire augmenté pour les sols initialement carencés en S. Conformément à cette théorie, plusieurs études s'étaient penchées sur les effets d'apports isolés ou combinés d' $N$  et de P. Elles avaient souligné que l'apport combiné permettait d'éviter la réduction de l'abondance des Fabacées au sein du couvert végétal en compensant l'effet négatif de l' $N$  (Baylor 1974 ; Braakhekke & Hooftman 1999 ; Aydin & Uzun 2005). Notre étude montre que l'apport de P n'est pas toujours suffisant pour obtenir cette compensation. Elle souligne clairement la nécessité d'un équilibre global des ressources intégrant la prise en compte du S. L'équilibre  $N : S$  est en effet très important comme nous l'avons discuté pour une synthèse protéique optimale chez les Poacées et espèces non fixatrices, et pour la fixation chez les Fabacées.

Compte tenu de ces effets, nous avons souligné les implications agronomiques de la fertilisation soufrée, qui pourrait amener à sa prise en compte dans les protocoles de fertilisation des prairies, au même titre que le P ou le K. Élargissant ces aspects purement

agronomiques, l'apport de S émerge également comme un outil de génie écologique, de préservation de la diversité dite ordinaire en permettant une diversification tant de la matrice graminéenne et de Fabacées prairiales que potentiellement des espèces interstitielles.

***CONCLUSION GÉNÉRALE  
&  
PERSPECTIVES DE RECHERCHE***

## CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES DE RECHERCHE

---

---

Au cours de cette étude, nous avons mis en exergue le rôle de la disponibilité en S dans la nutrition minérale, notamment azotée et soufrée, dans la croissance des végétaux, dans leur aptitude à constituer des réserves et à restaurer la croissance après défoliation, voire dans leur aptitude à la multiplication végétative (stolons, talles, ...). Nous avons également souligné la profonde interdépendance des métabolismes azoté et soufré. Ceci nous a permis d'envisager les conséquences du développement de carences en S tant à l'échelle de l'espèce qu'à l'échelle des communautés végétales et écosystèmes, et de démontrer les bénéfices d'une fertilisation soufrée dans les prairies améliorées, fortement fertilisées en N.

L'approche écologique et écophysiological que nous avons menée, associant expérimentations de terrain et expérimentations en mésocosme, et développant une approche conjointe de l'efficacité d'utilisation et du devenir de l'N et du S apportés au sein des communautés, cela grâce à l'utilisation simultanée d'isotopes stables de l'N et du S, s'est avérée particulièrement fructueuse. Les conclusions que nous en tirons permettent de préciser de manière formelle les mécanismes sous-tendant les dynamiques observées et de confirmer des hypothèses ou lois d'actions jusqu'à présent non validées, en particulier pour les espèces et communautés végétales de prairies. A l'échelle des prairies et des mésocosmes, plusieurs perspectives de recherche peuvent être proposées :

i) Ce travail de thèse a notamment consisté à mettre en place un observatoire de terrain, à long terme, des effets de la fertilisation N/S sur deux systèmes caractéristiques des prairies normandes et, à rechercher parallèlement les mécanismes généraux d'action d'un double gradient N/S sur la performance de 4 espèces communes des prairies mésophiles, ainsi que sur la dynamique de communautés modèles constituées de celles-ci. Dans le cadre de cette thèse, seules les conséquences à court terme de la modification de co-disponibilité N : S ont été testées. **L'étude *in situ* nous permettra, à plus long terme, de suivre la dynamique des communautés suivies jusqu'à l'établissement de nouveaux équilibres correspondant aux différents niveaux de fertilisation apportés.** Elle permettra de quantifier l'effet de

l'apport de S sur cette dynamique, d'en préciser l'action et d'en **évaluer la variabilité saisonnière, voire annuelle** pour ainsi valider les hypothèses que nous avons émises sur la faiblesse relative de l'effet S *in situ*, telles que la faible pluviosité printanière et estivale des deux années de notre suivi. A terme, moyennant éventuellement une extension de l'étude à des sites établis sur d'autres types de sols, notamment caractérisés par une plus faible teneur en argile, ou caractérisés par des communautés végétales plus diversifiées (notamment en dicotylédones), le dispositif expérimental *in situ* pourra nous donner des indicateurs de **préconisation de fertilisation dans un objectif de productivité et/ou de diversité**.

ii) Le dispositif expérimental *in situ* pourra par ailleurs être valorisé en intégrant, au suivi de végétation réalisé jusqu'à présent, un suivi du sol. Ceci permettra **l'évaluation de la dynamique du S et de l'N dans le sol, de leur mise à disposition de la végétation, notamment au travers d'un suivi des taux de minéralisation, d'immobilisation et de lixiviation des composés appliqués**, ou déjà présents dans le sol. Ceci pourrait être facilité par l'utilisation d'un double marquage aux  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  pour préciser les flux entre les différents pools. D'autre part, il apparaît nécessaire de **tester un autre rythme de défoliation, plus rapide**, afin de s'approcher de celui d'un pâturage tournant, ce qui pourrait alors accentuer l'effet S sur les espèces à canopée plus basse.

iii) En mésocosme, nos expérimentations ont été basées sur une manipulation d'un niveau de fertilité initial, induisant une première période de croissance en situation de bonne disponibilité en nutriments et des phases de repousse en situation de disponibilité plus réduite. Ce dispositif ne permet pas de retranscrire les mécanismes opérant au champ en situation de fertilisation conventionnelle, comme pratiqué pour la fertilisation azotée, c'est à dire fractionnée en plusieurs apports, un de début de saison, puis un apport consécutif à chacune des coupes. De plus, l'apport de  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  dès la mise en place des mésocosmes, ne permet pas de connaître l'influence du double gradient de fertilité analysé sur la contribution relative des réserves accumulées et l'acquisition *de novo* d'N et de S à la repousse. Il serait ainsi intéressant de concevoir **une nouvelle série de mésocosmes fertilisés de manière fractionnée à l'implantation et après chaque fauche. L'apport de  $^{15}\text{N}$  et  $^{34}\text{S}$  à l'issue de la première fauche permettrait en outre d'estimer la contribution du N et du S issus de la fertilisation à la repousse et d'appréhender indirectement celle des réserves**. D'autre part, **l'analyse du compartiment racinaire de ces mésocosmes en termes de morphologie (longueur, surface, ramification) et de répartition spatiale (par classe de profondeur)**

**permettrait** d'apporter des précisions sur les mécanismes à l'origine des dynamiques observées : compétition racinaire pour les ressources, stratégie exploitatrice *versus* conservative, ...

Les mécanismes écophysologiques que nous avons identifiés, comme impliqués dans les réponses d'espèces et les dynamiques de communauté que nous observons, ouvrent également des **pistes de recherches dans le domaine de la physiologie de la plante entière**. Ces recherches permettraient de mieux comprendre les fondements des phénomènes observés en particulier sur les thèmes suivants :

i) Nos résultats mettent en évidence le rôle prépondérant du S dans les capacités de *T. repens* à fixer l' $N_2$ . Il serait pertinent d'approfondir l'analyse de son rôle dans le processus de la fixation symbiotique en déterminant son **impact au niveau de la nodulation des racines** (nombre, masse et fonctionnalité des nodules) ainsi que **sur la nitrogénase** (activité et ou dosage immunologique de la protéine) et la concentration en leghémoglobine au sein des nodules. Ceci nous permettra de préciser les lois d'actions en fonction de la co-disponibilité N : S et du voisinage de *T. repens* (composition des communautés), ce type d'analyses ayant jusqu'à présent été effectué essentiellement sur individus isolés.

ii) Nous avons observé que la fertilisation soufrée en situation de forte fertilisation azotée était bénéfique à la Fabacée mais aussi à la Poacée dont l'efficacité d'utilisation de l'azote augmente uniquement en situation de compétition (culture mixte). Certaines hypothèses explicatives mériteraient d'être testées : cette observation résulte-t-elle d'une moindre compétition entre espèces pour la capture de l'azote minéral, les besoins du trèfle étant par ailleurs intégralement satisfaits par la stimulation de la fixation de  $N_2$ ? Alternativement, une fixation d' $N_2$  accentuée pourrait accroître l'exsudation rhizosphérique de l'N, ensuite valorisée par la Poacée. Une approche quantitative à court terme par méthode isotopique permettrait d'expliquer ces observations.

iii) Nous avons également montré que le S, en plus d'intervenir dans la mise en réserve de l'N nécessaire à la reprise de croissance après défoliation, peut également modifier l'abondance de protéines solubles spécifiques que nous n'avons pas identifiées. Afin de déterminer l'implication réelle de la disponibilité en S sur la mise en réserve de l'N dans les organes végétatifs de *T. repens*, il paraît intéressant d'**identifier et de quantifier ces**

**protéines solubles** et de suivre l'évolution du statut azoté des stolons, au cours du cycle de *T. repens* (défoliation/repousse). L'**analyse de ces traits *in situ* dans des conditions naturelles** où le développement des stolons n'est limité ni par l'espace ni par les ressources du sol pourra également permettre de confirmer les résultats obtenus en mésocosme. **Cette identification du rôle du S sur la quantité et la qualité des réserves disponibles pour la repousse pourra être étendue aux Poacées.** En effet, il a été montré au laboratoire (Piquery 2000) une corrélation positive entre la teneur en glutathion des bases de feuille en croissance de *L. perenne* à basse température et une reprise de végétation accrue. Il faudra **analyser le rôle du glutathion** sur ce processus en condition de fauche.

*NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE*

# Plan du Nouveau Chapitre de Thèse

## *Préambule*

### **I. Cadre général et enjeux de ma thèse**

- A. Présentation de ma thèse
- B. Ma thèse dans son contexte

### **II. Déroulement, gestion et coût de mon projet**

- A. Préparation et cadrage du projet
- B. Réalisation technique
- C. Analyse et Valorisation des résultats
- D. Conduite du projet
- E. Coût de mon projet

### **III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles**

- A. Compétences scientifiques
- B. Compétences méthodologiques
- C. Compétences techniques
- D. Compétences managériale et relationnelle
- E. Compétences rédactionnelle et communicationnelle
- F. Capacité d'intégration dans un environnement professionnel

### **IV. Résultats, impact de mon projet de thèse**

*Valorisation des compétences*  
*“Un nouveau chapitre de la thèse ®”*

**Tiphaine Tallec**

*Ecole doctorale* : Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie (ED n° 96)

*Université et organisme de rattachement* : Université de Caen et INRA

*"Mentor"* : Laurence Varin

Importance du Soufre dans les engrais agricoles utilisés en prairies



*Sujet académique de la thèse* : " Effets d'un double gradient azote/soufre sur la structure de communautés végétales de prairie bas-normande: dynamique de l'acquisition des ressources nutritionnelles et des interactions compétitives ".

*Co-directeurs de thèse* : Sylvain Diquélou et Alain Ourry

## ***Préambule***

Dans le cadre de la formation proposée par l'Ecole Doctorale Normande Chimie Biologie, et en partenariat avec l'Association Bernard Grégory (ABG), j'ai eu l'opportunité d'effectuer le module intitulé "Valorisation des compétences : un Nouveau Chapitre de la Thèse" au printemps 2007.

J'ai réalisé ce travail avec l'aide d'un "mentor" exerçant dans le domaine du recrutement et des relations humaines.

Ce chapitre consiste à aborder la thèse de manière non scientifique, en s'intéressant à faire ressortir, et valoriser, les compétences acquises, développées ou renforcées durant la conduite du projet de thèse. Ce chapitre utilise un vocabulaire quelque peu différent, dans la mesure où il s'adresse à un public non averti des questions scientifiques présentées dans ce manuscrit. Il s'agit de pouvoir présenter le travail de thèse effectué à une personne non spécialiste du sujet, par exemple dans le cadre d'un entretien de recrutement.

## **I. Cadre général et enjeux de ma thèse**

Lors de mon stage de maîtrise effectué dans un laboratoire au Royaume-Uni, puis de mon stage de D.E.A. à Caen, j'ai constaté mon intérêt certain pour la gestion de projets de recherche. Ceci m'a totalement convaincue à poursuivre en thèse en me spécialisant notamment dans les domaines de l'écologie et de l'écophysiologie.

### **A. Présentation de ma thèse**

Les prairies naturelles et fourragères représentaient, en 2005, 45% de la surface agricole utile en France. Le soufre est un nutriment essentiel pour la croissance et la production des plantes. Or cet élément déjà limitant dans les grandes cultures comme celles du colza ou des céréales, le devient progressivement dans les prairies et peut en affecter la diversité et la productivité. Ce fait est la conséquence de 2 principaux facteurs : la diminution des pollutions atmosphériques industrielles soufrées (chute de 85% ces 20 dernières années) et la présence marginale de soufre dans les engrais agricoles.

Dans ce contexte, mon projet a pour objectif principal d'analyser l'évolution de la production et de la composition floristique des prairies en fonction des quantités en soufre et azote disponibles dans les sols. Mes travaux de recherche permettront ainsi de présager la dynamique potentielle des prairies sur le long terme, selon des scénarios d'appauvrissement ou d'enrichissement (engrais) en soufre. Il importe d'en mesurer les éventuels impacts face aux soucis actuels de protection de la biodiversité et dans l'optique des interrogations actuelles sur les relations entre diversité floristique des prairies et qualités des produits laitiers dérivés.

### **B. Ma thèse dans son contexte**

J'ai réalisé mon projet au sein de l'une des 3 équipes du laboratoire INRA Écophysiologie Végétale et Agronomie de l'Université de Caen, la jeune équipe « Écologie interaction plante-plante », constituée de 4 Maîtres de conférence et de 4 doctorants. Etant la 1<sup>ère</sup> doctorante recrutée à l'occasion de la constitution de cette équipe, mon projet a constitué une 1<sup>ère</sup> approche conceptuelle et expérimentale de cette thématique innovante.

Mon projet constitue un lien indispensable entre la physiologie de la plante entière et l'agro-écologie. J'ai réalisé des projets d'expérimentations en laboratoire qui permettent d'analyser les observations faites à l'échelle de la parcelle agricole. Aussi, j'ai mis en place des dispositifs expérimentaux sur la station expérimentale fourragère du Pin au haras (61) et recruté les compétences correspondantes de son personnel technique (2 agents techniques). Je me suis également appuyée sur les compétences et les moyens principaux du laboratoire (spectromètre de masse).

## **II. Déroulement, gestion et coût de mon projet**

Le sujet de thèse que le directeur du laboratoire m'a confiée lors de mon stage de D.E.A. faisait partie intégrante de la thématique poursuivie en thèse. J'ai donc bénéficié d'une réelle continuité entre le D.E.A. et la thèse.

### **A. Préparation et cadrage du projet**

Mon projet scientifique s'est décomposé en trois grandes étapes : la conception du projet, la réalisation technique et enfin, l'exploitation et la valorisation des résultats.

La conception a été élaborée dans le cadre de la mise en place d'une nouvelle équipe de l'Unité Mixte de Recherche INRA réunissant écologues et physiologistes, validée par l'expertise du laboratoire en 2003. Il s'agissait alors de formuler le questionnement scientifique sur lequel le projet s'appuyait. Mon directeur de thèse et moi-même, avons effectué une analyse et synthèse bibliographique. Après avoir défini les objectifs de mon projet, nous avons déterminé des axes et projets expérimentaux. Nous avons formalisé le projet que j'ai présenté devant les 3 équipes du laboratoire afin de le valider et le réajuster le cas échéant.

J'ai acquis au fil du temps la capacité à formuler mes propres hypothèses avec mon propre questionnement scientifique.

### **B. Réalisation technique**

J'ai mis en place différentes échelles d'expérimentation. L'expérimentation principale, menée sur trois ans, s'effectuait sur des prairies en conditions naturelles. Les prairies étaient localisées sur le site expérimental fourrager INRA du Pin au Haras dans l'Orne. Sur ces prairies, chaque année, j'y effectuais 3 fauches. Et selon la période de fauche, elle pouvait nécessiter 15 jours de mobilisation, induisant de nombreux déplacements à partir de Caen. Pour cette expérimentation, j'ai recruté et managé une équipe de 5 techniciens et 4 stagiaires, nécessitant la coordination de leur présence sur le terrain. En parallèle, j'ai mené deux projets d'expérimentation en serre au laboratoire de Caen (au total 9 mois sur 2 ans), pour lesquelles j'ai également managé une équipe constituée de 6 techniciens et 4 stagiaires. Ayant maîtrisé les phases de culture et de récolte des plantes et la phase d'analyse des plantes récoltées, j'ai à mon tour formé les techniciens et stagiaires (étudiants en BTS bioanalyses et contrôles, Licence et maîtrise de biologie) à ces techniques.

## C. Analyse et Valorisation des résultats

Le traitement des plantes récoltées débouche sur l'analyse et l'interprétation des données. Cette interprétation permet de confronter les résultats obtenus aux hypothèses de départ en prenant attention à rester objectif. J'ai pris conscience qu'il était aisé d'interpréter, à partir de ses attentes ou de ses objectifs propres, les résultats obtenus. Au cours de cette étape, j'ai vraiment pu m'approprier le projet dans ce dialogue entre questionnement initial et résultats obtenus. J'ai ainsi pu mesurer les écarts entre le souhaité et le réel.

L'interprétation des résultats terminée, j'ai co-rédigé 4 publications scientifiques en 1<sup>er</sup> auteur, en langue anglaise pour rendre compte de mes travaux à la communauté scientifique internationale. J'ai également présenté ces résultats lors de congrès nationaux (Journées d'Écologie Fonctionnelle et ECOVEG) en Auvergne, Aquitaine et Centre.

J'ai réalisé une soutenance de thèse à mi-parcours comprenant un rapport d'activités ainsi qu'une présentation orale devant un jury constitué d'écologistes et physiologistes, non spécialistes de mon domaine, afin d'évaluer la cohérence de mon projet.

## D. Conduite du projet

Tout au long du projet, nous avons eu avec mon directeur de thèse, 3 à 4 entretiens annuels pour faire le bilan sur l'avancement du projet et prendre des décisions sur l'organisation, l'orientation du projet et sur les stratégies de communication. Notre proximité au laboratoire a facilité nos interactions et la résolution de problèmes techniques ou analytiques. J'ai acquis, au terme de 3 mois, une autonomie dans l'avancement de mon projet et la gestion de mon temps.

D'autre part, une réunion mensuelle d'environ 1 heure et demi était organisée au sein de l'équipe afin d'informer, de confronter des résultats et d'apporter des solutions communes. Mon rôle consistait à informer et proposer des orientations nécessaires à mon projet.

## E. Coût de mon projet

Le montant total consolidé de mon projet s'élève à 180 979 euros. Le tableau ci-dessous présente l'évaluation du coût total consolidé du projet et de la répartition de la charge financière correspondante, selon différents postes de dépenses :

• **Ressources humaines**

Catégories	nombre	Heures effectuées	Coût total chargé en euros	% du coût total
4 stagiaires non rémunérés (environ 2 mois chacun)				
doctorant	1	4800	37000	20
directeur de thèse	1	1000	27647	15
Technicien	3	742	16226	9
agent contractuel	4	577.5	8709	5
Ajt	2	637.5	11212	6
Secrétaire	1	75	1501	0,8
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>6617</b>	<b>102295</b>	<b>57</b>

• **Coûts d'infrastructures et d'environnement**

	<b>38184</b>	<b>21</b>
Frais de siège (administration générale et recherche, école doctorale)	27522	
coûts d'environnement (UFR)	10662	

• **Coûts de fonctionnement**

	<b>40500</b>	<b>22</b>
achats consommables	3300	
prestations internes	35000	
déplacements, missions	1400	
Documentation	600	
Formations	200	

**Coût total du projet**

**180979 euros**

Les ressources humaines constituent le poste de dépenses le plus significatif du projet, soit 57% dont 20% pour mon salaire. Durant les deux premières années de ma thèse j'ai assuré moi-même mon salaire en travaillant au sein d'un établissement scolaire du secondaire. Ma rémunération a été assurée par le Ministère de l'Education Nationale au travers du rectorat de l'Académie de Caen. En troisième année mon salaire a été assuré par le laboratoire INRA Ecophysiologie Végétale et Agronomie.

Les coûts de fonctionnement s'élèvent à 40 500 euros, ce qui représente 22% du coût total et sont financés par le laboratoire INRA Ecophysiologie Végétale et Agronomie.

Les coût d'infrastructures et d'environnement s'élèvent à 38 184 euros, soit 21% du coût total. Il correspond à la participation de mon projet aux dépenses globales de l'activité de la Recherche à l'Université de Caen.

Les ressources humaines constitue le poste principal contributeur de mon projet, à hauteur de 57% du montant total, devant mon laboratoire (22%) et l'Université de Caen (21%). Ce bilan financier montre l'importance du choix dans le recrutement des compétences et de leur validation pour et pendant l'exécution du projet associé.

### **III. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles**

En gérant mon projet scientifique durant ces 3 années, j'ai renforcé et développé de nombreuses compétences tant sur le plan personnel que professionnel.

#### **A. Compétences scientifiques**

J'ai acquis une expertise scientifique dans différents domaines que sont l'écologie des prairies, l'écologie fonctionnelle des plantes, et l'écophysiologie végétale. Et je me suis notamment spécialisée dans :

- ❑ les nutriments minéraux azotés et soufrés des plantes fourragères (particulièrement trèfle, ray-grass, renoncule, agrostide et pâturin).
- ❑ les interactions entre les plantes (aux niveaux aérien et souterrain).
- ❑ Le fonctionnement des systèmes prairiaux.

Cette expérience de recherche en écophysiologie végétale m'a amenée à approfondir mes connaissances sur la physiologie de la plante mais également à élargir mon domaine de compétences à l'agronomie.

En consultant la littérature scientifique, en interrogeant les membres de mon laboratoire et en participant à des congrès nationaux, j'ai pu élargir le champ de mes connaissances à l'ensemble de la biologie et de l'écologie végétales.

#### **B. Compétences méthodologiques**

J'ai pris conscience de la nécessité d'un référentiel commun pour la mise en place de processus et pratiques professionnelles communes, tout ceci s'organisant au sein de 3 étapes clés.

- ⇒ la définition et la formulation du cadre stratégique du projet, ce qui comprend la définition de la problématique, le choix des priorités, l'évaluation des moyens humains, matériels et financiers nécessaires,
- ⇒ le pilotage et l'animation du projet, en mettant en place un calendrier fixant les étapes intermédiaires, les échéances et les objectifs à atteindre, et en cherchant à minimiser les risques,
- ⇒ la réalisation technique proprement dite du projet.

## C. Compétences techniques

L'étape d'expérimentation m'a permise d'acquérir un savoir-faire dans :

- ❑ les techniques spécifiques (relevés de végétations, utilisation d'isotopes stables...) à mon domaine de compétences (écologie et écophysiole des prairies),
- ❑ la maîtrise d'outils statistiques (Minitab 13, ADE-4) et principaux logiciels de bureautique.

Au travers de ce projet, j'ai pris conscience de mon goût pour le management de projet de terrain mais aussi pour l'analyse et la précision des expériences en laboratoire. Dans cette capacité à faire, j'ai pu mettre en pratique ma rigueur et mon sens de l'organisation.

## D. Compétences managériale et relationnelle

Outre le développement de mon savoir-faire technique, j'ai développé à cette occasion des capacités d'encadrement et de management. La phase d'expérimentation m'a amenée à développer des compétences pédagogiques afin de former mes collaborateurs aux techniques de récoltes et d'analyses. J'ai appris et acquis la gestion du temps (rapidité et efficacité), la coordination de différents acteurs dans une équipe et la planification (déplacement de l'équipe sur le terrain) afin que toute démarche soit opérationnelle et réaliste. Le management des équipes m'a également appris à déléguer des tâches, à transmettre des consignes, et à instaurer des conditions propices à une dynamique d'équipe favorisant les collaborations. J'ai aussi pris conscience de l'importance, tout d'abord de leur transmettre et de leur faire comprendre les enjeux du projet et ensuite de les encourager et de les soutenir en valorisant leur ouvrage.

## E. Compétences rédactionnelle et communicationnelle

Dans ce cadre, j'ai valorisé mes résultats en co-rédigeant 4 articles en langue anglaise soumis à des revues internationales. Cet exercice, a nécessité un projet bibliographique en faisant appel à mes compétences linguistiques, d'analyse et de synthèse.

J'ai présenté mes résultats à 4 reprises lors de séminaires internes au laboratoire et de congrès, auprès de spécialistes ou non spécialistes comme des physiologistes ou écologues. J'ai, à ces occasions, mobilisé des compétences professionnelles et personnelles dont « la maîtrise de soi ». Je me suis efforcée d'être compréhensible, didactique et pédagogique. A l'occasion de ces congrès, il ne m'a pas été possible de constituer un réseau mais que je sais aujourd'hui indispensable pour la réalisation d'un projet.

## F. Capacité d'intégration dans un environnement professionnel

La thèse m'a directement plongée au sein d'une structure professionnelle hiérarchisée, divisée en équipes où j'ai dû me positionner. J'ai vécu au quotidien, durant 3 ans, la vie du laboratoire INRA Basse-Normandie (regroupant une quarantaine de personnes), ce qui m'a donné une connaissance et une vision pratique. Je me suis intégrée à la vie de cette organisation, en apprenant à rendre des comptes et à informer les personnes avec lesquelles j'interagissais. Mon appartenance à une équipe m'a permise de me responsabiliser. J'ai pris conscience que mes résultats avaient des retombées sur mon équipe et sur son avenir scientifique, lors de la dernière expertise de l'INRA par exemple.

J'ai progressivement acquis mon autonomie. Je me suis rendue compte de mon adaptabilité, notamment dans mes relations professionnelles et dans la sollicitation de mes collègues pour l'utilisation d'un équipement ou une prise de décision.

## **IV. Résultats, impact de mon projet de thèse**

Les travaux réalisés pendant mon projet ont montré l'intérêt et l'importance d'une fertilisation soufrée en prairies, d'abord pour l'augmentation de sa production mais également pour la conservation de sa diversité biologique. Les enjeux plus appliqués de mon projet, aux niveaux écologique, agricole, et environnemental, dépassent le cadre de ma thèse et il est trop tôt pour en mesurer l'impact. Néanmoins, l'usage d'engrais soufré pourrait indirectement contribuer à une diminution de l'achat et de l'usage des engrais azotés par les agriculteurs et ainsi participer à une diminution des pollutions en nitrates des sols et des milieux aquatiques.

Les publications et communications apportent une reconnaissance du laboratoire par l'INRA et l'ensemble de la communauté scientifique internationale.

La commission d'évaluation du laboratoire a reconnu l'importance du travail réalisé et de son innovation. Ce projet de thèse va donc contribuer à définir, voire réorienter, les projets futurs de l'équipe écologie du laboratoire INRA de Caen.

Ce projet et sa réalisation constituent la base de ma 1<sup>ère</sup> véritable expérience professionnelle. J'ai maintenant conscience de l'intérêt de réfléchir par projet scientifique. Ces compétences acquises sont transférables et applicables quelque soit le secteur d'activité. J'envisage 2 projets pour ma carrière professionnelle:

- ingénieur dans le département recherche et développement d'une entreprise du secteur agri-environnemental (Agrial, Limagrain...).
- chargée d'études dans la gestion de patrimoine naturel (bureau d'études, association...).

Le Nouveau Chapitre de Thèse a répondu à mes attentes initiales. Il m'a incitée à prendre du recul par rapport à ma thèse durant laquelle on ne prend pas ce temps, nécessaire, pour réfléchir à « qui sommes nous, qui sommes nous devenus ». Ma thèse est alors devenue mon projet professionnel. Au-delà des compétences scientifiques et techniques, il m'a permis de découvrir des compétences que je ne soupçonnais pas clairement. Cela m'a également montré la transférabilité de mes compétences à d'autres domaines d'activités vers lesquels je pense maintenant à me tourner avec confiance.

***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abrol YP, Ahmad A (2003)** Sulphur in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherland
- Adiputra K, Anderson JW (1995)** Effect of sulphur nutrition on redistribution of sulphur in vegetative barley. *Physiol Plant* **95**:643-650
- Aerts R (1999)** Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks. *J Exp Bot* **50**:29-37
- Aerts R, Van der Peijl MJ (1993)** A simple model to explain the dominance of low-productive perennials in nutrient-poor habitats. *Oikos* **66**:144-147
- Aguiar MR, Lauenroth WK, Peters DP (2001)** Intensity of intra- and interspecific competition in coexisting shortgrass species. *J Ecol* **89**:40-47
- Ahmad A, Abdin MZ (2000a)** Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiol Plant* **110**:144-149
- Ahmad A, Abdin MZ (2000b)** Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein contents and on the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). *J Agron Crop Sci* **185**:49-54
- Anderson JW (1990)** Sulfur metabolism in plants. *In*: Mifflin BJ, Lea PJ (eds) The Biochemistry of Plants. Academic press. San Diego, pp 327-375
- Anderson JW (1993)** Selenium interactions in sulfur metabolism. *In*: Sulfur nutrition and assimilation in higher plants. The Hague: SPB Academic Publishing, pp 49-60
- Anderson JW, Fitzgerald MA (2003)** Sulphur distribution and redistribution in vegetative and generative plants. *In*: Sulphur in plants, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 113-134
- Aulakh MS (2003)** Sulphur nutrition to crops. *In*: Sulphur in plants, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 344-345
- Aulakh MS, Dev G, Arora BR (1976)** Effect of sulphur fertilization on the nitrogen-sulphur relationships in alfalfa (*Medicago sativa* L. Pers.). *Plant Soil* **45**:75:80
- Austin MP (1982)** Use of a relative physiological performance value in the prediction of performance in multispecies mixtures from monoculture performance. *J Ecol* **70**:559-570
- Austin MP, Groves RH, Fresco LMF, Kaye PE (1985)** Relative growth of six thistle species along a nutrient gradient with multispecies competition. *J Ecol* **73**:667-684
- Aydin I, Uzun F (2005)** Nitrogen and phosphorus fertilization of rangelands affects yield, forage quality and the botanical composition. *Eur J Agron* **23**:8-14

- Barney Jr PE, Bush LP (1985)** Interaction of nitrate and sulfate reduction in tobacco. 1. Influence of availability of nitrate and sulfate. *J Plant Nutr* **8**:507-515
- Barthram GT, Elston DA, Mullins CE (2005)** The physical resistance of grass patches to invasion. *Plant Ecol* **176**:79-85
- Bassirirad H (2000)** Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change. *New Phytol* **147**:155-169
- Baylor JE (1974)** Satisfying the nutritional requirements of grass-legume mixtures. In Mays DA (ed.) Forage fertilization. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp 171-188
- Bazot S (2005)** Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne (*Lolium perenne* L.). Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 174 pp
- Ben Zioni A, Vaadia Y, Lips SH (1971)** Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol Plant* **24**:288-290
- Bender J, Muntifering RB, Lin JC, Weigel HJ (2006)** Growth and nutritive quality of *Poa pratensis* as influenced by ozone and competition. *Environ Pollut* **142**:109-115
- Bertin C, Yang X, Weston LA (2003)** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* **256**:67-83
- Blair GJ, Mamaril CP, Momuat E (1978)** Sulphur nutrition of wetland rice. *IRRI Research Series* 21
- Blair GJ, Chinoim N, Lefroy RDB, Anderson GC, Crocker GJ (1991)** A soil test for pasture and crops. *Aust J Soil Res* **29**:619-626
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, Mac Grath SP (1998)** Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol* **118**:1337-1344
- Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP (2000)** Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* **225**:95-107
- Blake-Kalff MMA, Zhao F, McGrath SP (2002)** Sulphur deficiency diagnosis using plant tissue analysis. United Kingdom: The International Fertiliser Society. Proceeding 503, 23 p
- Blake-Kalff MMA, Zhao FJ, McGrath SP, Withers PJA (2004)** Development of the malate:sulphate ratio test for sulphur deficiency in winter wheat and oilseed rape. In: HGCA Project Report No. 327
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gel. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bobbink R (1998)** Impacts of tropospheric ozone and airborne nitrogenous pollutants on natural and semi-natural ecosystems: a commentary. *New Phytol* **139**:161-168
- Bobbink R, Hornung M, Roelofs JGM (1998)** The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *J Ecol* **86**:717-738

- Bohn HI, Barrow NS, Rajan SSS, Parfitt RL (1986)** Reaction of inorganic sulphur in soils. In: Tabatabai MA (eds) Sulphur in agriculture. Agronomy Monograph, ASA, CSSA and ISSA, Madison WI, pp 233–249
- Bonanomi G, Caporaso S, Allegrezza M (2006)** Short-term effects of nitrogen enrichment, litter removal and cutting on a Mediterranean grassland. *Acta Oecol* **30**:419-425
- Boot RGA, Mensink M (1990)** Size and morphology of root systems of perennial grasses from contrasting habitats as affected by nitrogen supply. *Plant Soil* **129**:305-307
- Boswell CC, Swanney B (1991)** Comparison of the long-term effects of different sulphur fertilisers on legume pasture production on a toposequence of North Otago soils, New Zealand. *New Zeal J Agr Res* **34**:95-104
- Bourgoin B (1995)** Les espèces de graminées à gazon. In: *Ressources génétiques des plantes fourragères à gazons*. Properi JM, Guy P, Balfourier F (eds) INRA and BRG France, pp 71-103
- Bourque PA (2004)** Université de Laval  
(<http://www.ggl.ulaval.ca/personnel/bourque/s3/cycle.soufre.html>)
- Braakhekke WG, Hooftman DAP (1999)** The resource balance hypothesis of plant species diversity in grassland. *J Veg Sci* **10**:187-200
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Brown L, Scholefield D, Jewkes EC, Preedy N, Wadge K, Butler M (2000)** The effect of sulphur application on the efficiency of nitrogen use in two contrasting grassland soils. *J Agr Sci* **135**:131-138
- Buchner P, Takahachi H, Hawkesford MJ (2004)** Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and longdistance transport. *J Exp Bot* **55**:1765-1773
- C**  
**Cahill JF (1999)** Fertilization effects on interactions between above- and below-ground competition in an old field. *Ecology* **80**:466-480
- Cahill JF (2002)** Interactions between root and shoot competition vary among species. *Oikos* **99**:101-112
- Campbell BD, Grime JP (1989)** A comparative study of plant responsiveness to the duration of episodes of mineral nutrient enrichment. *New Phytol* **112**:261-267
- Cartes P, Shene C, Mora MdIL (2006)** Selenium distribution in ryegrass and its antioxidant role as affected by sulfur fertilization. *Plant Soil* **285**:187-195
- Castellano SD, Dick RP (1991)** Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soil. *Soil Sci Soc Am J* **55**:114-121
- Ceccotti SP, Messick DL (1997)** A global review of crop requirements, supply, and environmental impact on nutrient sulphur balance. In: *Sulphur Metabolism in Higher Plants* Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, pp 155-163

- Chaitep W, Lefroy RDB, Blair GJ (1994)** Effect of placement and source of sulfur in flooded and non-flooded rice cropping systems. *Aust J Agr Res*, **45**:1547-56
- Chapman D (1987)** Natural re-seeding and *Trifolium repens* demography in grazed hill pastures. II. Seedlings appearance and survival. *J Appl Ecol* **24**:1037-1043
- Chessel D, Lebreton JD, Yoccoz N (1987)** Propriétés de l'analyse canonique des correspondances. Une utilisation en hydrobiologie. *Revue de Statistique Appliquée* **35**:55-72
- Chiy PC, Phillips CJC (1998)** Sodium fertilizer application to pasture. 6. Effects of combined applications with sulphur on herbage production and chemical composition in the season of application. *Grass Forage Sci* **53**:1-10
- Chiy PC, Avezinius JA, Phillips CJC (1999)** Sodium fertilizer application to pasture. 9. The effects of combined or separate applications of sodium and sulphur fertilizers on herbage composition and dairy cow production. *Grass Forage Sci* **54**:312-321
- Clarkson DT, Saker LR, Purves JV (1989)** Transport in barley plants with diminished sulphate status. Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *J Exp Bot* **40**: 953-963
- Clarkson DT, Diogo E, Amancio S (1999)** Uptake and assimilation of sulphate by sulphur deficient *Zea mays* cells: The role of O-acetyl-L-serine in the interaction between nitrogen and sulphur assimilatory pathways. *Plant Physiol Bioch* **37**:283-290
- Clement CR, Hopper MJ, Jones LHP, Leafe EL (1978)** The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II Effect of light, defoliation and relationship to CO<sub>2</sub> flux. *J Exp Bot* **29**:1173-1183
- Collins SL, Glenn SM, Gibson DJ (1995)** Experimental analysis of intermediate disturbance and initial floristic composition: decoupling cause and effect. *Ecology* **76**:486-492
- Collins RP, Fothergill M, Macduff JH, Puzio S (2003)** Morphological compatibility of white clover and perennial ryegrass cultivars grown under two nitrate levels in flowing solution culture. *Ann Bot-London* **92**:247-258
- Corre N, Bouchart V, Ourry A, Boucaud J (1996)** Mobilization of nitrogen reserves during regrowth of defoliated *Trifolium repens* L. and identification of potential vegetative storage proteins. *J Exp Bot* **47**:1111-1118
- Coulon JB (1997)** Effet de la nature des fourrages sur les caractéristiques physicochimiques et organoleptiques du fromage. *Fourrages* **152**:429-436
- Crosland AR, Zhao FJ, McGrath SP (2001)** Inter-laboratory comparison of sulphur and nitrogen analysis in plants and soils. *Commun Soil Sci Plan* **32**:685-695
- Crush R, Waller JE, Care DA (2005)** Root distribution and nitrate interception in eleven temperate forage grasses. *Grass Forage Sci* **60**:385-392
- Cruz P, Duru M, Therond O, Theau JP, Ducourtieux C, Jouany C, Al Haj Khaled R, Ansquer P (2002)** Une nouvelle approche pour caractériser les prairies naturelles et leur valeur d'usage. *Fourrages* **172**:335-354
- Cullen NA (1971)** Establishment of pasture on yellow-brown loams near the Anau, VI. Pasture response to rates of phosphorus, sulphur and molybdenum. *New Zeal J Agr Res* **14**:10-17

- Curtin D, Syers JK (1990)** Extractability and adsorption of sulphate in soils. *J Soil Sci* **41**: 305-312
- Curtin D, Beare MH, McCallum FM (2007)** Sulphur in soil and light fraction organic matter as influenced by long-term application of superphosphate. *J Biol Biochem* **39**:2547-2554
- D**amerval C, Devienne D, Zivy M, Tarroux P, Vincens P (1993) L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. *Biofutur* **123**:3-18
- Davidson IA, Robson MJ (1986)** Effect of temperature and nitrogen supply on the growth of perennial ryegrass and white clover. 2. A comparison of monocultures and mixed swards. *Ann Bot-London* **57**:709-719
- Davidson IA, Robson MJ (1990)** Short-term effects of nitrogen on the growth and nitrogen nutrition of small swards of white clover and perennial ryegrass in spring. *Grass Forage Sci* **45**:413-421
- De Foucault B (1980)** Les prairies du Bocage virois (Basse-Normandie - France). Typologie phytosociologique et essai de reconstitution des séries évolutives herbagères. *Doc Phytosoc* **5**:1-109
- De Kok LJ, Castro A, Durenkamp M, Koralewska A, Posthumus FS, Elisabeth C, Stuiver E, Yang L, Stulen I (2005)** Pathway of plant sulfur uptake and metabolism-an overview. *Laudbauforschung Völkenrode* **283**:5-13
- De Pascale S, Maggio A, Pernice R, Fogliano V, Barbieri G (2007)** Sulphur fertilization may improve the nutritional value of *Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris*. *Eur J Agron* **26**:418-424
- De Vries DM, Kruijne A, (1960)** The influence of nitrogen fertilization on the botanical composition of permanent grassland. Medeling I.B.S. 103 Wageningen.
- De Wit CT (1960)** On competition. Verslagen van landbouwkundige onderzoekingen **66**:1-82
- DeBoer DL, Duke SH (1982)** Effects of sulphur nutrition on nitrogen and carbon metabolism in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Physiol Plant* **54**:343-350
- Dedourge O, Vong PC, Lasserre-Joulin F, Benizri E, Guckert A (2003)** Immobilisation of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Bio Fertil Soils* **38**:181-185
- Dhont C, Castonguay Y, Avice JC, Chalifour FP (2006)** VSP accumulation and cold-inducible gene expression during autumn hardening and overwintering of alfalfa. *J Exp Bot* **57**: 2325-2337
- Dijkshoorn W, Van Wijk AL (1967)** The sulphur requirement of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter: A review of published data. *Plant Soil* **26**:129-157
- Diquélou S, Leconte D, Simon JC (2003)** Diversité floristique des prairies permanentes de Basse-Normandie (synthèse des travaux antérieurs). *Fourrages* **173**:3-22

**Donald D, Chapman SJ, Edwards AC, Atkinson D (1999)** Soil S availability in upland pastures of NE Scotland: relationship of extractable soil S and soil respiration to soil and site characteristics. *Soil Use Manage* **15**:213-220

**Droux M (2004)** Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth Res* **79**:331-348

**Duchaufour P (1997)** Abrégé de Pédologie. 5<sup>ème</sup> Edition. Paris: Masson, 291

**E****lgersma A, Schlepers H (1997)** Performance of white clover perennial ryegrass mixtures under cutting. *Grass Forage Sci* **52**:134-146

**Elgersma A, Schlepers H, Nassiri M (2000)** Interactions between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) under contrasting nitrogen availability: productivity, seasonal patterns of species composition, N<sub>2</sub> fixation, N transfer and N recovery. *Plant Soil* **221**:281-299

**Ensminger LE, Freney JR (1966)** Diagnostic techniques for determining sulfur deficiencies in crops and soils. *Soil Sci* **101**:283-290

**Eriksen J (1997a)** Sulphur cycling in Danish agricultural soils: Inorganic sulphate dynamics and plant uptake. *Soil Biol Biochem* **29**:1379-1385

**Eriksen J (1997b)** Sulphur cycling in Danish agricultural soils: turnover in organic S fractions. *Soil Biol Biochem* **29**:1371-1377

**Eriksen J (2005)** Gross sulphur mineralization-immobilisation turnover in soil amended with plant residues. *Soil Biol Biochem* **37**:2216-2224

**Eriksen J, Lefroy RDB, Blair GJ (1995)** Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biol Biochem* **27**:1011-1016

**Etienne P, Desclos M, Le Gou L, Gombert J, Bonnefoy J, Maurel K, Le Dily F, Ourry A, Avice JC (2007)** N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Funct Plant Biol* **34**:895-906

**F****ismes J, Vong PC, Guckert A, Frossard E (2000)** Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *Eur J Agron* **12**:127-141

**Fitzgerald JW (1976)** Sulfate ester formation and hydrolysis: a potentially important and often ignored aspect on the sulfur cycle of aerobic soils. *Bacteriol Rev* **40**:698-721

**Frame J (1991)** Herbage production and quality of a range of secondary grass species at five rate of fertilizer nitrogen application. *Grass Forage Sci* **46**:139-151

**Freney JR, Stevenson FJ (1966)** Organic sulfur transformations in soils. *Soil Sci* **101**:307-316

**Freney JR, Melville GE, Williams CH (1975)** Soil organic matter fractions as sources of plant-available sulphur. *Soil Biol Biochem* **7**:217-227

- Freney JR, Spencer K, Jones MB (1978)** The diagnosis of sulphur deficiency in wheat. *Aust J Agr Res* **29**:727-738
- Fridley JD (2002)** Resource availability dominates and alters the relationship between species diversity and ecosystem productivity in experimental plant communities. *Oecologia* **132**:271-277
- Friend JP (1973)** The global sulphur cycle. *In*: Rasool SI (eds) Chemistry of the lower atmosphere, Plenum Press, New York, pp 177-201
- Ghani A, McLaren RG, Swift RS (1992)** Sulphur mineralisation and transformations in soils as influenced by additions of carbon, nitrogen and sulphur. *Soil Biol Biochem* **24**:331-341
- Ghani A, McLaren RG, Swift RS (1993a)** Mobilization of recently-formed soil organic sulphur. *Soil Biol Biochem* **25**:1739-1744
- Ghani A, McLaren RG, Swift RS (1993b)** The incorporation and transformations of <sup>35</sup>S in soil: effects of soil conditioning and glucose or sulphate additions. *Soil Biol Biochem* **25**:327-335
- Giamoustaris A, Mithen R (1995)** The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *Oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann Appl Biol* **126**:347-363
- Gilbert MA, Robson AD (1984a)** The effect of sulfur supply on the root characteristics of subterranean clover and annual ryegrass. *Plant Soil* **77**:377-380
- Gilbert MA, Robson AD (1984b)** Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. I. Effect of nitrogen and sulfur supply. *Aust J Agr Res* **35**:53-64
- Gilbert MA, Robson AD (1984c)** Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. II. Interrelation of nitrogen supply and soil temperature. *Aust J Agr Res* **35**:65-73
- Gilbert MA, Robson AD (1984d)** Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. III. Effects of plant density and nitrogen supply. *Aust J Agr Res* **35**:75-83
- Gilbert SM, Clarkson DT, Cambridge M, Lambers H, Hawkesford MJ (1997)** SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiol* **115**(3):1231-1239
- Gilbert JC, Gowing DJG, Loveland P (2003)** Chemical amelioration of high phosphorus availability in soil to aid the restoration of species-rich grassland. *Ecol Eng* **19**:297-304
- Gough L, Osenberg CW, Gross KL, Collins SL (2000)** Fertilization effects on species density and primary productivity in herbaceous plant communities. *Oikos* **89**:428-439
- Goulas E, Ledily F, Teissedre L, Corbel G, Robin C, Ourry A (2001)** Vegetative storage proteins in white clover (*Trifolium repens* L.): quantitative and qualitative features. *Ann Bot* **88**:789-795

- Granvogl M, Wieser H, Koehler P, Tucher SV, Schieberle P (2007)** Influence of sulfur fertilization on the amounts of free amino acids in wheat. Correlation with baking properties as well as with 3-aminopropionamide and acrylamide generation during baking. *J Agr Food Chem* **55**:4271-4277
- Grime JP (1979)** **Plant strategies and vegetation processes.** *In*: Plant strategies and vegetation processes.
- Grime JP, Hodgson JG, Hunt R (1988)** Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. London: Unwin Hyman.
- Gross N, Suding KN, Lavorel S, Roumet C (2007)** Complementarity as a mechanism of coexistence between functional groups of grasses. *J Ecol* **95**:1296-1305
- Groves RH, Austin MP, Kaye PE (2003)** Competition between Australian native and introduced grasses along a nutrient gradient. *Austral Ecol* **28**:491-498
- Grubb PJ (1977)** The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biol Rev* **52**:107-145
- Güsewell S, Bollens U (2003)** Composition of plant species mixtures grown at various N:P ratios and levels of nutrient supply. *Basic Appl Ecol* **4**:453-466
- Guichard H, Leconte D, Picoche B, Pages J, Simon JC (2006)** Influence de la composition floristique des prairies permanentes normandes sur les caractéristiques des laits crus dérivés. *Fourrages* **188**:457-475
- Guiraud G (1984)** Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans le système sol-plantes. Thèse de Doctorat d'état, Université Pierre et Marie-Curie, Paris VI, 336 p

- H****abtemichial KH, Singh BR, Aune JB (2007)** Wheat response to N<sub>2</sub> fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulfur fertilization and rhizobial inoculation in semi-arid Northern Ethiopia. *J Plant Nutr Soil Sci* **170**:412-418
- Hall MH, Beegle DB, Bowersox RS, Stout RC (2003)** Optimum Nitrogen Fertilization of Cool-Season Grasses in the Northeast USA. *Agron J* **95**:1023-1027
- Harper JL (1977)** Population Biology of Plants. Academic Press Inc. London.
- Harris SL, Clark DA (1996)** Effect of high rates of nitrogen fertiliser on white clover growth, morphology, and nitrogen fixation activity in grazed dairy pasture in northern New Zealand. *New Zeal J Agr Res* **39**:149-158
- Haynes RJ (1980)** Competitive aspects of the grass-legume association. *Adv Agron* **33**:227-261
- Hell R, Kruse C (2007)** Sulfur in Biotic Interactions of Plants. *In*: Sulphur in plants, an Ecological Perspective, Hawkesford MJ & De Kok LJ (eds), pp 204-205

- Hodge A, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH (1999)** Why plants bother: root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete. *Plant Cell Environ* **22**:811-820
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH (2000)** Spatial and physical heterogeneity of N supply from soil does not influence N capture by two grass species. *Funct Ecol* **14**:645-653
- Hoffmann C, Stockfisch N, Koch H (2003)** Influence of sulphur supply on yield and quality of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)- Determination of a threshold value. *Eur J agron* **21**:69-80
- Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (1997)** Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N<sub>2</sub> fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant Soil* **197**:187-199
- Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2000)** Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by N-15 leaf feeding compared with indirect dilution of soil N-15. *Plant Soil* **1-2**:171-183
- Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2001)** Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biol Biochem* **33**:439-448
- Honsova D, Hejzman M, Klaudivsova M, Pavlu V, Kocourkova D, Haki J (2007)** Species composition of an alluvial meadow after 40 years of applying nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer. *Preslia* **79**:245-258
- Hu ZY, Zhao FJ, McGrath SP (2005)** Sulphur fractionation in calcareous soils and bioavailability to plants. *Plant Soil* **268**:103-109
- Huston MA, DeAngelis DL (1994)** Competition and coexistence: the effects of resource transport and supply rates. *Am Nat* **144**:954-977
- Jacquemyn H, Brys R, Hermy M (2003)** Short-term effects of different management regimes on the response of calcareous grassland vegetation to increased nitrogen. *Biol Conserv* **111**:137-147
- Janssen KA, Vitosh ML (1974)** Effect of lime, sulfur, and molybdenum on N<sub>2</sub> fixation and yield of dark red kidney beans. *Agron J* **56**:736-740
- Jones LHP, Jarvis SC, Cowling DW (1973)** Lead uptake from soils by perennial ryegrass and its relation to the supply of an essential element (sulphur). *Plant Soil* **38**:605-619
- Joyce JP, Rattray PV (1970)** Nutritive value of white clover and perennial ryegrass. II. Intake and assimilation of sulphur, potassium and sodium. *New Zeal J Agr Res* **13**:792-799
- Junk G, Svec HJ (1958)** The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gases from various sources. *Geochim Cosmochim Acta* **14**:234-243

- Kalmbacher RS, Ezenwa IV, Arthington JD, Martin FG (2005)** Sulfur Fertilization of Bahiagrass with Varying Levels of Nitrogen Fertilization on a Florida Spodosol. *Agron J* **97**:661-667
- Keating T, O’Kiely P (2000)** Comparison of old permanent grassland, *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* swards grown for silage. III. Effects on varying fertiliser nitrogen application rate. *Irish J Agr Food Res* **39**:35-53
- Kertesz MA, Mirleau P (2004)** The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *J Exp Bot* **55**:1939-1945
- Kessler W, Nösberger J (1994)** Factors limiting white clover growth in grass/clover systems. In: Grassland and society. Proceedings of the 15th General Meeting of the European Grassland Federation, 6-9 June, pp 525-538
- Kopriva S, Koprivova A (2004)** Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* **55**:1775-1783
- Kopriva S, Rennenberg H (2004)** Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis interaction with N and C metabolism. *J Exp Bot* **55**:1831-1842
- Kopriva A, Suter M, Op den Camp C, Brunold C, Koprivova S (2000)** Regulation of sulphate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**:737-746
- Laemli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Laidlaw AS, Withers JA (1998)** Changes in contribution of white clover to canopy structure in perennial ryegrass/white clover swards in response to N fertilizer. *Grass Forage Sci* **53**:287-291
- Lamond RE, Ray E (1997)** Sulphur in Kansas: Plant, soil, and fertilizer considerations. Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, rapport MF-2264, 4 p
- Lamond RE, Whitney DA, Marsh BH (1995)** Sulfur fertilization of smooth brome grass in Kansas. *Agron J* **87**:13-16
- Landers DH, David MB, Mitchell MJ (1983)** Analysis of organic and inorganic sulfur constituents in sediments, soils and water. *J Environ An Chem* **14**:245-256
- Lappartient AG, Touraine B (1996)** Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake in intact canola. *Plant Physiol* **111**:147-157
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B (1999)** Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulphurylase and sulphate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J* **18**:89-95
- Laws JA, Pain BF, Jarvis SC, Scholefield D (2000)** Comparison of grassland management systems for beef cattle using self-contained farmlets: effects of contrasting nitrogen inputs and management strategies on nitrogen budgets, and herbage and animal production. *Agr Ecosyst Environ* **80**:243-254

- Ledgard SF, Upsdell MP (1991)** Sulphur inputs from rainfall throughout New Zealand. *New Zeal J Agr Res* **34**:105-111
- Lee HS, Lee ID (2000)** Effect of N fertilizer levels on the dry matter yield, quality and botanical composition in 8-species mixtures. *Korean J Anim Sci* **42**:727-734
- Lee JA, Caporn SJM (1998)** Ecological effects of atmospheric reactive nitrogen deposition on semi-natural terrestrial ecosystems. *New Phytol* **139**:127-134
- Leustek T, Saito K (1999)** Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol* **120**:637-644
- Liu Q, Brakenhielm S (1996)** Variability of plant species diversity in Swedish natural forest and its relation to atmospheric deposition. *Vegetatio* **125**:63-72
- Lucero DW, Grieu P, Guckert A (1999)** Effects of water deficit and plant interaction on morphological growth parameters and yield of white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) mixtures. *Eur J Agron* **11**:167-177
- Lucero DW, Grieu P, Guckert A (2000)** Water deficit and plant competition effects on growth and water-use efficiency of white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Soil* **227**:1-15
- Lynch JM, Whipps JM (1990)** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**:1-10
- Mac Cardle NC, Campbell GW, Stedman JR (1995)** Wet deposition of non-sea-salt sulphate in the United Kingdom: The influence of natural sources. *Water Air Soil Poll* **85**:1941-1948
- MacCaskill MR, Blair GJ (1988)** Development of a simulation model of sulfur cycling in grazed pastures. *Biogeochemistry* **5**:165-181
- Macduff JH, Jarvis SC, Davidson IA (1996)** Inhibition of N<sub>2</sub> fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) at low concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in flowing solution culture. *Plant Soil* **180**:287-295
- MAFF (2000)** Fertiliser recommendations for agricultural and horticultural crops (RB 209) 17<sup>th</sup> Edition, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, UK.
- Malhi SS, Heier K, Solberg E (2000)** Effectiveness of elemental S fertiliser on forage grass. *Can J Grass Sci* **80**:105-112
- Malhi SS, Loeppky H, Coulman B, Gill KS, Curry P, Plews T (2004)** Fertilizer nitrogen, phosphorus, potassium, and sulphur effects on forage yield and quality of timothy hay in the Parkland region of Saskatchewan. *Canada J Plant Nutr* **27**:1341-1360
- Malinowski DP, Belesky DP, Fedders J (1998)** [Photosynthesis of white clover \(\*Trifolium repens\* L.\) germplasm with contrasting leaf size](#). *Photosynthetica* **35**:419-427
- Marriott CA, Zuazua MT (1996)** Tillering and partitioning of dry matter and nutrients in *Lolium perenne* growing with neighbours of different species: effects of nutrient supply and defoliation. *New Phytol* **132**:87-95
- Marschner H (1986)** Mineral nutrition of higher plant. London: Academic Press

- Marschner H, Yang CH, Lieberei R, Crowley DE (2001)** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **33**:1437-1445
- Martin WE (1958)** Sulfur deficiency widespread. *Calif Agric* **12**:10-12
- Matula J, Pechová M (2002)** Sulfur and sulfate concentrations in leaves of oilseed rape under field conditions. *Rostlinna Vyroba* **48**:433-440
- McAuliffe C, Chamblee DS, Uribe-Arango H, Woodhouse WW (1958)** Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by <sup>15</sup>N. *Agron J* **50**:334-337
- McGrath SP, Zhao FJ (1995)** A risk assessment of sulphur deficiency in cereals using soil and atmospheric deposition data. *Soil Use Manag* **11**:110-114
- McGrath SP, Zhao FJ (1996)** Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agr Sci* **126**:53-62
- McKenzie FR (1996)** The influence of applied nitrogen on herbage yield and quality of *Lolium perenne* L. pastures during the establishment year under subtropical conditions. *South Afric J Plant Soil* **13**:22-26
- McLaren RG, Keer JI, Swift RS (1985)** Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biol Biochem* **17**:73-79
- Mehlich A (1964)** Muence of sorbed hydroxyl and sulfate on liming efficiency, pH and conductivity. *Soil Sci Soc Am Proc* **28**:496-499
- Merrien A, Pouzet A, Grandin L, Maisonneuve C, Nesme D (1989)** Cahier technique Colza. Paris: CETIOM, 56 p
- Meuriot F, Avice JC, Decau ML, Simon JC, Lainé P, Volenec JJ, Ourry A (2003)** Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) is affected by mineral N availability. *Plant Sci* **165**(4):709-718
- Meuriot F, Avice JC, Lainé P, Simon JC, Decau ML, Ourry A (2004)** Influence of initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during post cutting regrowth. *Ann Bot* **94**:311-321.
- Mortenson LE, Thornley RNF (1979)** Structure and function of nitrogenase. *Ann Rev Biochem* **48**:387-418
- Morton JD, Sinclair AG, Morrison JD, Smith LC, Dodds KG (1998)** Balanced and adequate nutrition of phosphorus and sulphur in pasture. *New Zeal J Agr Res* **41**:487-496
- Morton JD, Smith LC, Metherell AK (1999)** Pasture yield responses to phosphorus, sulphur, and potassium applications on North Otago soils, New Zealand. *New Zeal J Agr Res* **42**:133-146
- Mountford JD, Lakhani KH, Kirkham FW (1993)** Experimental assessment of the effects of nitrogen addition under hay-cutting and aftermath grazing on the vegetation of meadows on a Somerset peat moor. *J Appl Ecol* **30**:321-332
- Murphy MD, Boggan JM (1988)** Sulphur deficiency in herbage in Ireland. *Irish J Agr Food Res* **27**:83-90

**Murphy MD, Quirke WA (1997)** The effect of sulphur/nitrogen/selenium interactions on herbage yield and quality. *Irish J of Agr Food Res* **36**:31-38

**Murphy MD, Coulter BS, Noonan DG, Connolly J (2002)** The effect of sulphur fertilisation on grass growth and animal performance. *Irish J Agr Food Res* **41**:1-15

**N**assiri M, Elgersma A (1998) Competition in perennial ryegrass white clover mixtures under cutting. 2. Leaf characteristics, light interception and dry-matter during regrowth. *Grass Forage Sci* **53**:367-379

**Navas ML, Garnier E, Austin MP, Gifford RM (1999)** Effect of competition on the responses of grasses and legumes to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> along a nitrogen gradient: differences between isolated plants, monocultures and multi-species mixtures. *New Phytol* **143**:323-331

**Navas ML, Garnier E, Austin MP, Viaud A, Gifford RM (2002)** Seeking a sound index of competitive intensity: application to the study of biomass production under elevated CO<sub>2</sub> along a nitrogen gradient. *Austr Ecol* **27**:463-473

**Neueschwander U, Suter M, Brunold C (1991)** Regulation by light and O-Acetyl-L-Serine in *Lemna minor* L. *Plant Physiol* **97**:253-258

**Newbery RM, Wolfenden J (1996)** Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrient supply on the seasonal growth and morphology of *Agrostis capillaris*. *New Phytol* **132**:403-411

**Noji M, Saito K (2003)** Sulphur amino acids: biosynthesis of cysteine and methionine. In: Sulphur in plants, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 135-144

**Noquet C, Meuriot F, Caillot S, Avice JC, Ourry A, Cunningham SM, Volenec JJ (2003)** Short-day photoperiod induces changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Funct Plant Biol* **30**:853-863

**Nziguheba G, Smolders E, Merckx R (2005)** Sulphur immobilization and availability in soils assessed using isotope dilution. *Soil Biol Bioch* **3**:635-644

**O**lde Venterink HO, Wassen MJ, Belgers JDM, Verhoeven JTA (2001) Control of environmental variables on species density in fens and meadows: importance of direct effects and effects through community biomass. *J Ecol* **89**:1033-1040

**Ourry A, Bigot J, Boucaud J (1989)** Protein mobilization from stubble and roots, and proteolytic activities during post-clipping re-growth of perennial ryegrass. *J Plant Physiol* **134**:298-303

**Ourry A, Kim TH, Boucaud J (1994)** Nitrogen reserve mobilization during regrowth of *Medicago sativa* L.: relationships between their ability and regrowth yield. *Plant Physiol* **105**:831-837

- Pasricha NS, Fox RL (1993)** Plant nutrient sulphur in the tropics and sub-tropics. *Adv Agron* **50**:209-269
- Pasricha NS, Abrol YP (2001)** Food production and plant nutrient sulphur. *In: Sulphur in plants*, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 36-37
- Paynel F, Murray PJ, Cliquet JB (2001)** Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant Soil* **229**:235-243
- Piquery L (2000)** Implication du cycle ascorbate-glutathion dans la croissance foliaire et dans la repousse après défoliation du ray-grass (*Lolium perenne* L.) : relations avec le métabolisme carboné et la nutrition soufrée. *Thèse de l'Université de Caen*, 155 p
- Pirela HJ, Tabatabai MA (1988)** Sulphur mineralization rates and potential of soil. *Bio Fertil Soils* **6**:26-32
- Plantureux S (1983)** Incidence des techniques agronomiques sur la composition floristique et la physionomie d'un échantillon de prairies du secteur ouest du département des Vosges. *Thèse, INPL-ENSAIA, Nancy*, 181 p
- Postma R, Van Erp PJ, Saanen R (1999)** Quantifying the sulphur supply to agricultural rops. *In: Sulphur in plants*, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 60-61
- Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT (2001)** Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *J Exp Bot* **52**:113-121

- Rausch T, Wachter A (2005)** Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* **10**:503-509
- Reid RL (1966)** The response of herbage yield and quality to nitrogen application rates. *Proceeding Xth International Grassland. Congress, Helsinki, Finlande*, pp 209-213
- Riffaldi R, Saviozzi A, Cardelli R, Cipolli S, Levi-Minzi R (2006)** Sulphur mineralization kinetics as influenced by soil properties. *Biol Fert Soils* **43**:209-214
- Roem WJ, Klees H, Berendse F (2002)** Effects of nutrient addition and acidification on plant species diversity and seed germination in heathland. *J Appl Ecol* **39**:937-948

- Saik R (1995)** Advancing sulphur fertilization. *Sulphur*, pp 31-37
- Scherer HW (2001)** Sulphur in crop production. *Eur J Agron* **14**:81-111
- Scherer HW, Lange A (1996)** N<sub>2</sub> fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biol Fert Soils* **23**:449-453
- Schlesinger WH (1997)** Biogeochemistry: An Analysis of Global Change. *In: Sulphur in plants*, Abrol YP & Ahmad A (eds), pp 46-47
- Schnug E (1991)** Sulphur nutritional status of European crops and consequences for agriculture. *Sulphur in Agriculture* **15**:7-12

- Schnug E (1993)** Physiological functions and environmental relevance of sulfur-containing secondary metabolites. *In: Sulfur nutrition and assimilation in higher plants*, The Hague: SPB Academic Publishing, pp 179-190
- Schnug E, Haneklaus S (1992)** Monitoring of the sulfur supply of agricultural crops in Northern Europe. *Phyton-Ann REI Bot* **32**:119-122
- Schröder P (1993)** Plants as sources of atmospheric sulfur. *In: Sulfur nutrition and assimilation in higher plants* The Hague: SPB Academic Publishing, pp 253-270
- Schwinnig S, Parsons AJ (1996)** Analysis of the co-existence mechanisms for grasses and legumes in grazing systems. *J Ecol* **84**:799-813
- Scott NM (1981)** Evaluation of sulphate status of soils by plant and soil tests. *J Sci Food Agr* **32**:193-199
- Scott NM, Watson ME, Caldwell KS, Inkson RHE (1983)** Response of grassland to the application of sulphur at two sites in north-east Scotland. *J Sci Food Agr* **34**:357-361
- Simon JC, Leconte D, Vertes F, Le Meur DI (1997)** Management of persistence of white clover in mixtures. *Fourrages* **152**:483-498
- Sinclair AG, Smith LC, Morrison JD, Dodds KG (1996a)** Effects and interactions of phosphorus and sulphur on a mown white clover/ryegrass sward. 1. Herbage dry matter production and balanced nutrition. *New Zeal J Agr Res* **39**:421-433
- Sinclair AG, Morrison JD, Smith LC, Dodds KG (1996b)** Effects and interactions of phosphorus and sulphur on a mown white clover/ryegrass sward. 2. Concentrations and ratios of phosphorus, sulphur, and nitrogen in clover herbage in relation to balanced plant nutrition. *New Zeal J Agr Res* **39**:435-445
- Sinclair AG, Morrison JD, Smith LC, Dodds KG (1997)** Effects and interactions of phosphorus and sulphur on a mown white clover/ryegrass sward. 3. Indices of nutrient adequacy. *New Zeal J Agr Res* **40**:297-307
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Vanden Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS (1997)** Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J* **12**(4):875-884
- Soussana JF, Arregui MC (1995)** Impact de l'association sur le niveau de nutrition azotée et la croissance du ray-grass anglais et du trèfle blanc. *Agronomie* **15**:81-96
- Soussana JF, Vertes F, Arregui MC (1995)** The regulation of clover shoot growing points density and morphology during short-term clover decline in mixed swards. *Eur J Agr* **4**:205-215
- Soussana JF, Minchin FR, Macduff JH, Raistrick N, Abberton MT, Michaelson-Yeates TPT (2002)** A simple model of feedback regulation for nitrate uptake and N<sub>2</sub> fixation in contrasting phenotypes of white clover. *Ann Bot-London* **90**:139-147
- Stevens CJ, Dise NB, Mountford JO, Gowing DJ (2004)** Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science (Washington)* **303**:1876-1879
- Stevenson FJ (1986)** Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulphur, Micronutrients. John Wiley & Sons, New York
- Stocklin J, Schweizer K, Korner C (1998)** Effects of elevated CO<sub>2</sub> and phosphorus addition on productivity and community composition of intact monoliths from calcareous grassland. *Oecologia* **116**:50-56

**Suter M, von Ballmoos P, Kopriva S, Op den Camp R, Schaller J, Kuhlemeier C, Schürmann P, Brunold C (2000)** Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J Biol Chem* **275**:930-936

**Suter M, Ramseier D, Gusewell S, Connolly J (2007)** Convergence pattern and multiple species interactions in a designed plant mixture of five species. *Oecologia* **151**:499-511

**T****abatabai MA, Bremner JM (1970)** Comparison of some methods for determination of total sulfur in soils. *Soil Sci Soc Am Pro* **34**:417-420

**Tabe L, Hagan N, Higgins TJV (2002)** Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Curr Opin Plant Biol* **5**:212-217

**Ter Braak CJF (1986)** Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**:1167-1179

**Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S (2001)** ADE-4 software v. 2001. Université de Lyon 1, France, <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4>

**Thomas H (1984)** Effects of drought on growth and competitive ability of perennial ryegrass and white clover. *J Appl Ecol* **21**:591-602

**Thompson L, Harper JL (1988)** The effect of grasses on the quality of transmitted radiation and its influence on the growth of white clover (*Trifolium repens*). *Oecologia* **75**:343-347

**Tilman D (1982)** Resource competition and community structure. *Princeton University Press*, Princeton, NJ

**Tilman D (1987)** On the meaning of competition and the mechanisms of competitive superiority. *Funct Ecol* **1**:304-315

**Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD (1985)** Soil Fertility and Fertilizers 4th edition. New-York: Macmillan Publ. Co., 510 p.

**Trott H, Wachendorf M, Ingwersen B, Taube F (2004)** Performance and environmental effects of forage production on sandy soils. I. Impact of defoliation system and nitrogen input on performance and N balance of grassland. *Grass Forage Sci* **59**:41-55

**V****an den Koornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW (2003)** Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Mol Ecol* **12**:3085-3095

**Vertès F, Simon JC, Le Corre L, Decau ML (1997)** Les flux d'azote au pâturage. II. Etude des flux et de leurs effets sur le lessivage. *Fourrages* **151**:263-280

**Vis H, Goujard O (2005)** Comprendre la place du soufre dans la fertilisation. 7<sup>èmes</sup> rencontres COMIFER/GEMAS, 15 novembre, Blois

**Volenc JJ, Ourry A, Joern BC (1996)** A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiol Plant* **97**:185-193

**Vong PC, Dedourge O, Lasserre-Jourdin F, Guckert A (2003)** Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulphatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biol Biochem* **35**:1651-1661

**Walker TW, Adams AFR (1958)** Competition for sulphur in a grass-clover association. *Plant Soil* **9**:353-366

**Walker TW, Adams AFR, Orchiston HD (1956)** The effect of levels of calcium sulphate on the yield and composition of a grass and clover pasture. *Plant Soil* **7**:290-300

**Weber M, Suter M, Brunold C, Kopriva S (2000)** Sulfate assimilation in higher plants: Characterization of a stable intermediate in the adenosine 5'-phosphosulfate reductase reaction. *Eur J Chem* **267**:3647-3653

**Wedin DA, Tilman D (1993)** Competition among Grasses Along a Nitrogen Gradient - Initial Conditions and Mechanisms of Competition. *Ecol Monogr* **63**:199-229

**Weigelt A, Schumacher J, Walther T, Bartelheimer M, Steinlein T, Beyschlag W (2007)** Identifying mechanisms of competition in multi-species communities. *J Ecol* **95**:53-64

**Wen G, Schoenau JJ, Mooleki SP, Inanaga S, Yamamoto T, Hamamura K, Inoue M, An P (2003)** Effectiveness of an Elemental Sulfur Fertilizer in an Oilseed-Cereal-Legume Rotation on the Canadian Prairies. *J Plant Nutr Soil Sci* **166**:54-60

**Wieser H, Gutser R, Von Tucher S (2004)** Influence of sulphur fertilisation on quantities and proportions of gluten protein types in wheat flour. *J Cer Sci* **40**:239-244

**Willems JH, Peet RK, Bik L (1993)** Changes in chalk-grassland structure and species richness resulting from selective nutrient additions. *J Veg Sci* **4**:203-212

**Williams WA, McKell CM, Reppert JN (1964)** Sulfur Fertilization of an Annual-Range Soil During Years of Below-Normal Rainfall. *J Range Manag* **17**:1-5

**Withers PJA, Tytherleigh ARJ, O'Donnell FM (1995)** Effect of sulphur fertilizers on the grain yield and sulphur content of cereals. *J Agr Sci* **125**:317-324

**Withers PJA, Zhao FJ, McGrath SP, Evans EJ, Sinclair AH (1997)** Sulphur inputs for optimum yields of cereals. In 'Aspects of Applied Biology 50, Optimising Cereal Inputs: Its Scientific Basis', (M J Gooding and P R Shewry, eds). The Association of Applied Biologists, Wellesbourne, U.K., pp 191-198

**Woledge J (1988)** Competition between grass and clover in spring as affected by nitrogen fertilizer. *Ann Appl Biol* **112**:175-186

**Wu J, O'Donnell AG, He ZL, Syers JK (1994)** Measurement of soil microbial biomass sulfur by fumigation-extraction method. *Soil Biol Biochem* **26**:117-125

**Yoch DC (1979)** Electron-transport systems coupled to nitrogenase. In: Hardy RWF et al. (eds) A treatise on dinitrogen fixation. John Wiley and Sons, New York, pp 605-652

- Zemenchik RA, Albrecht KA (2002)** Nitrogen use efficiency and apparent nitrogen recovery of Kentucky bluegrass, smooth bromegrass, and orchardgrass. *Agron J* **94**:421-428
- Zemmelink HJ (2003)** Dimethyl sulphide: measuring emissions from the ocean to the atmosphere. Groningen University, online Resources, 172 p
- Zhao F, McGrath SP (1994)** Extractable sulphate and organic sulphur in soils and their availability to plants. *Plant Soil* **164**:243-250
- Zhao FJ, Salmon SE, Withers PJA, Monaghan JM, Evans PR, Shewry PR, McGrath SP (1999a)** Variation in the Breadmaking Quality and Rheological Properties of Wheat in Relation to Sulphur Nutrition under Field Conditions. *J Cereal Sci* **30**:19-31
- Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP (1999b)** Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *J Cereal Sci* **30**:1-17
- Zhou W, Li ST, Wang H, Hé P, Lin B (1999)** Mineralization of organic sulfur and its importance as reservoir of plant available sulfur in upland soils of north China. *Biol Fert Soils* **30**:245-250
- Zy H, Haneklaus S, Wang SP, Xu CK, Cao ZH, Schnug E (2003)** Comparison of mineralization and distribution of soil sulfur fractions in the rhizosphere of oilseed rape and rice. *Comm Soil Sci Plant An* **34**:2243-2257

***TABLE DES ILLUSTRATIONS***

---



---

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**


---



---

Table des Figures :

- Figure 1 :** Exigence en soufre de 5 grandes cultures des Pays Bas durant une année. La demande en soufre est différente selon l'espèce et la saison (d'après Postma *et al.* 1999).....6
- Figure 2 :** Absorption (A), transport (B) et voies d'assimilation réductrice/non réductrice (C) du sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) dans la cellule végétale (d'après Leustek & Saito 1999 ; DeKok *et al.* 2005).....7
- Figure 3 :** Rôles multiples du soufre chez les végétaux supérieurs.....8
- Figure 4 :** Interaction et régulation des métabolismes de l'azote et du soufre chez les plantes supérieures en conditions de carence en soufre ; les flèches rouges indiquent les contrôles négatifs et les flèches vertes les contrôles positifs (d'après Smith *et al.* 1997 ; Kopriva & Rennenberg 2004).....9
- Figure 5 :** Effet de différents niveaux de fertilisation azotée et soufrée (en mg pot-1), sur l'accumulation d'N ( N total en g pot-1) et la proportion de  $\text{N}_2$  fixé (en %) à la 1<sup>ère</sup> fauche (57 jours) de 4 espèces en monoculture : (a), *Medicago sativa* ; (b), *Trifolium pratense* ; (c), *Vicia faba* ; (d), *Pisum sativum* (des moyennes présentant des lettres similaires ne sont significativement pas différentes ; d'après Scherer & Lange 1996).....10
- Figure 6 :** Décoloration caractéristique des feuilles de colza soumis à une carence en soufre (d'après Merrien *et al.* 1989).....10
- Figure 7 :** Contenu en rubisco en fonction du contenu en S dans les feuilles de *Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan (V1) et *Brassica juncea* cv. Pusa Gold (V2) fertilisées au S (symboles noirs) et non fertilisées au S (symboles blancs ; d'après Ahmad & Abdin 2000a).....10
- Figure 8 :** Activité photosynthétique en fonction du contenu en N des feuilles de *Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan (V1) et *Brassica juncea* cv. Pusa Gold (V2) fertilisées au S (symboles noirs) et non fertilisées au S (symboles blancs ; d'après Ahmad & Abdin 2000a).....10

<b>Figure 9</b> : Cycle global du soufre à l'échelle de la biosphère (d'après Bourque 2004).....	<b>13</b>
<b>Figure 10</b> : Cycle du Soufre dans le système plante-sol-microorganisme (d'après Kertesz & Mirleau 2004).....	<b>16</b>
<b>Figure 11</b> : Minéralisation et immobilisation après incorporation de différents types de matière organique dans le sol (d'après Scherer 2001).....	<b>18</b>
<b>Figure 12</b> : Minéralisation nette du S, 5 jours après l'incorporation dans le sol de litières issues des différentes espèces citées ci-dessus (d'après Eriksen 2005).....	<b>18</b>
<b>Figure 13</b> : (a) Répartition des émissions de dioxyde de soufre par secteur en 1980 et 2006 ; (b) évolution des émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère en France métropolitaine entre 1980 et 2007 (d'après le ministère de l'Industrie, Source : Citepa, Coralie, inventaire au format CEE-NU, février 2007).....	<b>21</b>
<b>Figure 14</b> : Tendence mondiale des quantités d'N et de S consommées dans les fertilisants (d'après Pasricha & Abrol 2001).....	<b>21</b>
<b>Figure 15</b> : Contribution des productions végétales (en %) aux exportations annuelles de S (source : données SCEES, INRA, LDAR Laon, estimations).....	<b>22</b>
<b>Figure 16</b> : Bilan apparent du S en prairie en France (en kg de S).....	<b>22</b>
<b>Figure 17</b> : Rendement en matières sèches totales des graminées traitées chaque année, au début du printemps, avec un engrais à base de sulfates ou de soufre élémentaire, à raison de 15 kg ha <sup>-1</sup> de S (d'après Malhi 2000).....	<b>24</b>
<b>Figure 18</b> : Effet de la fertilisation soufrée sur la qualité de la farine de blé (d'après Zhao <i>et al.</i> 1999b).....	<b>26</b>
<b>Figure 19</b> : Effet des applications de différents niveaux de fertilisants soufrés et phosphorés sur la production totale de matière sèche du trèfle en culture mixte, après 2 années de culture <i>in situ</i> (d'après Morton <i>et al.</i> 1998).....	<b>28</b>
<b>Figure 20</b> : Effet de la fertilisation soufrée sur la production annuelle de matière sèche d'une prairie de ray-grass en fonction de la fertilisation azotée (d'après Murphy & Quirke 1997).....	<b>28</b>
<b>Figure 21</b> : Effet de la température du sol et des apports azoté (0 (N <sub>0</sub> ) et 75 (N <sub>75</sub> ) mg pot <sup>-1</sup> ) et soufré (0 (S <sub>0</sub> ) et 21 (S <sub>21</sub> ) mg pot <sup>-1</sup> ) sur la production relative de <i>Trifolium subterraneum</i> et <i>Lolium rigidum</i> cultivés en association (exprimé en % de leur production en monoculture ; d'après Gilbert & Robson 1984c).....	<b>29</b>
<b>Figure 22</b> : Effet de l'application de différents niveaux de fertilisants soufrés et phosphorés sur la production totale de matière sèche (a) de <i>Trifolium repens</i> et (b) de <i>Lolium perenne</i> , sur 2 ans (d'après Sinclair <i>et al.</i> 1996a).....	<b>31</b>

<b>Figure 23</b> : Effet des formes et des niveaux de fertilisants soufrés sur l'accumulation de matière sèche (a) du trèfle et (b) de la luzerne (d'après Boswell & Swanney 1991).....	<b>31</b>
<b>Figure 24</b> : Situation Géographique du site d'étude.....	<b>34</b>
<b>Figure 25</b> : Émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère de chaque région en France métropolitaine (d'après le ministère de l'Industrie, données 2005).....	<b>34</b>
<b>Figure 26</b> : Données météorologiques mensuelles moyennes des années 2003 à 2006 du domaine expérimental fourrager INRA du Pin au Haras (Orne) : (a), température et (b), précipitations.....	<b>35</b>
<b>Figure 27</b> : Schémas et photographies des dispositifs expérimentaux <i>in situ</i> : (a), Bas des mares et (b), Fortières.....	<b>36</b>
<b>Figure 28</b> : Schéma du carré central de 1m <sup>2</sup> dans lequel, l'échantillon trié est prélevé puis, la biomasse totale récoltée. ....	<b>38</b>
<b>Figure 29</b> : Photographies de (a) la serre INRA à l'Université de Caen où a été mis en place (b) le dispositif expérimental en mésocosme.....	<b>38</b>
<b>Figure 30</b> : Présentation des 4 modèles biologiques étudiés.....	<b>39</b>
<b>Figure 31</b> : Présentation des types de cultures.....	<b>40</b>
<b>Figure 32</b> : Schéma de la disposition des plants des différentes espèces.....	<b>41</b>
<b>Figure 33</b> : Diagrammes conceptuels de série de remplacement basés sur la production de matière sèche moyenne d'une espèce par pot schématisant le type de compétition développée (d'après De Wit 1960).....	<b>44</b>
<b>Figure 34</b> : Schéma simplifié du spectromètre de masse utilisé pour l'analyse isotopique de l'azote et du soufre d'échantillons sous forme solide.....	<b>46</b>
<b>Figure 35</b> : Protocole d'extraction des protéines solubles des stolons du trèfle blanc (d'après Etienne <i>et al.</i> 2007).....	<b>50</b>
<b>Figure 36</b> : Synthèse des mécanismes déterminant le résultat des interactions spécifiques entre Poacées et <i>T. repens</i> en situation de disponibilité forte en azote et faible en soufre ( <i>flèches continues</i> ) et en situation de co-disponibilité forte en azote et soufre ( <i>flèches en pointillés</i> ).....	<b>124</b>
 <b>Figure I-1</b> : Replacement diagrams based on average above-ground DM per container of <i>Lolium perenne</i> ( <i>Lp</i> , dashed lines) and <i>Trifolium repens</i> ( <i>Tr</i> , solid lines) for different levels of N and S inputs at (A) cut 1 and (B) cut 2.....	 <b>61</b>

**Figure I-2 :** Leaf number of *Lolium perenne* at cut 2 in monoculture (a □) and in mixture (b ■) for different level of N and S inputs.....62

**Figure I-3 :** Morphological traits of *Trifolium repens* at cut 2 in monoculture (□) and in mixture (■) for different level of N and S inputs: Leaf number (a, b), and stolon number (c, d).....62

**Figure I-4 :** Replacement diagrams based on average below-ground DM per container of *Lolium perenne* (*Lp*, dashed lines) and *Trifolium repens* (*Tr*, solid lines) for different levels of N and S inputs.....62

**Figure II-1 :** Shoot N content and N derived from fertilizer (NDFP) in *Lolium perenne* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture and in *Trifolium repens* grown (e, g) in monoculture and (f, h) in monoculture, at cuts 1 and 2, along the N and S gradients.....76

**Figure II-2 :** Shoot S content of *Lolium perenne* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture and of *Trifolium repens* grown (e, g) in monoculture and (f, h) in monoculture at cuts 1 and 2 under low (dashed lines) and high (solid lines) S availability along the N gradient level.....77

**Figure II-3 :** Soluble protein concentration (in mg per gram of dry weight) and dry weight of stolon of *Trifolium repens* grown (a, c) in monoculture and (b, d) in mixture at cut 3 along the N and S gradients. Changes in SDS-PAGE profiles of soluble proteins, extracted from stolon of *Trifolium repens* grown (e) in monoculture and (f) in mixture along the N and S gradients.....78

**Figure III-1 :** Above-ground dry matter per plant of (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in (A) population and (B) in community, at establishment, under low, intermediate and high N level along the S gradient.....91

**Figure III-2 :** Above-ground dry matter per plant of (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in (A) population and (B) in community, at regrowth, under low, intermediate and high N level along the S gradient.....91

**Figure III-3 :** Relative physiological performance (RPP, in population) and Relative ecological performance (REP, in community) of four species at establishment at (a, d) low, (b, e) intermediate and (c, f) high N level along the S gradient and at regrowth at (g, j) low, (h, k) intermediate and (i, l) high N level along the S gradient.....92

**Figure III-4** : Shoot S content and S derived from fertilizer (SDFF) in (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in community at (A) establishment and at (B) regrowth along N and S gradients.....**93**

**Figure III-5** : Shoot N content and N derived from fertilizer (NDFF) in (a, b) *Lolium perenne*, (c, d) *Agrostis capillaris*, (e, f) *Poa pratensis* and (g, h) *Trifolium repens* grown in community at (A) establishment and at (B) regrowth along N and S gradients.....**95**

**Figure IV-1** : Experimental plots design in the natural grassland.....**107**

**Figure IV-2** : Total dry matter yield in the sown grassland for the different N and S treatments investigated at spring (white), summer (grey) and autumn (black) cuts.....**108**

**Figure IV-3** : Dry matter yield of *Lolium perenne* (grey) and *Trifolium repens* (black) in the sown grassland for the different levels of N and S fertilization, at spring cut year 2.....**109**

**Figure IV-4** : Total dry matter yield in the natural grassland for the different N treatments investigated at spring (white), summer (grey) and autumn (black) cuts.....**109**

**Figure IV-5** : Canonical Correspondence Analysis (CCA) ordination diagram showing the correlation between species [square], and fertilization variables (arrows) in the natural grassland year 2.....**109**

Table des Tableaux :

<b>Table 1 :</b> Les 5 groupes de transporteurs de sulfate mis en évidence chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Buchner <i>et al.</i> 2004a ; Abrol & Ahmad 2003).....	<b>6</b>
<b>Table 2 :</b> Effet de la fertilisation soufrée sur la teneur en sélénium des végétaux des prairies pâturées. (d’après Murphy & Quirke 1997).....	<b>11</b>
<b>Table 3 :</b> Principaux réservoirs du soufre (d’après Schlesinger 1997).....	<b>12</b>
<b>Table 4 :</b> Composition biochimique de la litière des espèces étudiées (d’après Eriksen 2005).....	<b>18</b>
<b>Table 5 :</b> Lixiviation du soufre en fonction du type de sol, des précipitations annuelles et du niveau d’engrais soufré apporté ( d’après J-C Muller et J-L Ballif 1991; données : Arvalis).....	<b>22</b>
<b>Table 6 :</b> Effet de la fertilisation soufrée sur le rendement de différent types de culture (d’après Aulakh 2003).....	<b>27</b>
<b>Table 7 :</b> Effet de l’application de sulfate de calcium sur la production de matière sèche totale et celles du trèfle et des Poacées individuellement (en tonne par hectare ; d’après Walker <i>et al.</i> 1956).....	<b>27</b>
<b>Table 8 :</b> Propriétés du sol du domaine expérimental fourrager INRA du Pin au Haras (Orne) et utilisé pour les 3 séries de culture.....	<b>34</b>
<b>Table 9 :</b> Récapitulatif des différentes quantités de S, N, K et P appliqués aux séries de culture.....	<b>43</b>
<b>Table 10 :</b> Composition du tampon Laemmli modifié concentré deux fois (d’après Laemmli 1970).....	<b>50</b>
<b>Table 11 :</b> Composition du gel de concentration à 5,5% d’acrylamide et du gel de séparation à 15% d’acrylamide pour l’électrophorèse en SDS-PAGE.....	<b>51</b>
<b>Table 12 :</b> Protocole de révélation des protéines séparées en SDS-PAGE par la coloration au nitrate d’argent (adapté de Blum <i>et al.</i> 1987).....	<b>51</b>
<b>Table I-1 :</b> Single and interaction effects of N supply, S supply and Neighbouring (Ng) on traits measured on <i>L. perenne</i> ( <i>L. p.</i> ) and <i>T. repens</i> ( <i>T. r.</i> ).....	<b>61</b>
<b>Table I-2 :</b> Effects of different levels of N and S supplies on % <i>T. repens</i> content in mixture.....	<b>63</b>
<b>Table II-1 :</b> Effect of different N and S levels on the mean N % in shoot DW per plant of <i>Lolium perenne</i> and <i>Trifolium repens</i> , at cuts 1 and 2.....	<b>76</b>

<b>Table II-2 :</b> Effect of different N and S levels on the mean RNUE (real N use efficiency as % of 15N-fertilizer applied) per plant of <i>Lolium perenne</i> and <i>Trifolium repens</i> , at cuts 1 and 2.....	77
<b>Table II-3 :</b> Effect of different N and S levels on the mean S% in shoot DW per plant of <i>Lolium perenne</i> and <i>Trifolium repens</i> , at cuts 1 and 2.....	77
<b>Table II-4 :</b> Effect of different levels of N on the mean ASUE (apparent S use efficiency as % of S-fertilizer applied) per plant of <i>Lolium perenne</i> and <i>Trifolium repens</i> , at cuts 1 and 2.....	78
<b>Table III-1 :</b> N and S effect on <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> dry mass, N, S shoot and derived from fertilizer contents and N, S use efficiencies, grown in community.....	90
<b>Table III-2 :</b> N and S effect on the mean S% DM per plant of <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> grown in community.....	94
<b>Table III-3 :</b> N and S effect on the mean RSUE (real S use efficiency as % of 34S-fertilizer applied) per plant of <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> grown in community.....	94
<b>Table III-4 :</b> N and S effect on the mean N% DM per plant of <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> grown in community.....	94
<b>Table III-5 :</b> N and S effect on the mean RNUE (real N use efficiency as % of 15N-fertilizer applied) per plant of <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> grown in community.....	96
<b>Table III-6 :</b> N and S effect on the mean N : S ratio of <i>Lolium perenne</i> , <i>Agrostis capillaris</i> , <i>Poa pratensis</i> and <i>Trifolium repens</i> grown in community.....	96
<b>Table IV-1 :</b> Results of F (ANOVA).....	108

**Annexe 1 :** Outils de diagnostic des déficiences en S et discussion de leur fiabilité.

**Annexe 2 :** Cartographie des deux parcelles dans le site expérimentale de l'INRA localisé au Vieux Pin.

***ANNEXES***

## Annexe 1

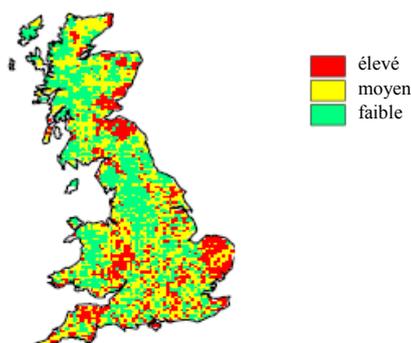
### Outils de diagnostic des déficiences en S et discussion de leur fiabilité

La plupart des indices permettant de prévenir ce risque ont à l'origine été développés pour les grandes cultures mais sont généralement applicables aux prairies temporaires.

#### a) Modèles informatiques

Différents modèles ont été développés pour estimer les exigences en S des cultures et par conséquent les risques de déficience. Ces modèles sont basés sur un bilan entre les entrées (dépôts atmosphériques de S, potentiel de minéralisation du S dans le sol à partir de la matière organique), et les sorties de S (prélèvement par les plantes, lixiviation des sulfates fonction des pluies, de la structure et du pH du sol) (McGrath & Zhao 1995). Ils sont essentiellement utilisés à grande échelle pour l'estimation de la situation des régions à hauts risques de carence en S, comme celles d'Angleterre. Les résultats sont souvent trop imprécis à grande échelle et ne permettent pas l'utilisation des modèles pour une parcelle par exemple. Pour que de tels modèles puissent être efficaces à petite échelle, une étude détaillée de chaque parcelle est requise, renseignant précisément sur les taux de minéralisation et d'immobilisation du S dans le sol, le drainage des sulfates, le rendement souhaité et les exigences en S des cultures envisagées ou prairies permanentes (Figure 1).

Risques de déficience en soufre de cultures de blé au Royaume-Uni en 2002



**Figure 1** : Cartographie des zones à risque en fonction des retombées atmosphériques. Cette carte sert de base à la préconisation locale de la fertilisation soufrée (source : IACR Rothamstead).

#### b) Analyses du sol

Plusieurs études montrent une bonne relation entre le S extractible du sol et le rendement final de la plante (Scott 1981 ; Zhao & McGrath 1994). Connaissant les besoins optimaux de celle-ci, il est ainsi possible de savoir si un sol peut y répondre. Les raisons de cette bonne corrélation sont que ces études ont été menées dans des systèmes clos (en pot) dans lesquels les teneurs et les disponibilités en nutriments sont semi-contrôlées. Or un écosystème naturel est un système dynamique où il est difficile de corréler le statut soufré du sol, mesure ponctuelle, au rendement final, résultat de plusieurs mois de croissance (Blake-Kalff *et al.* 2002) et notamment dans les régions à forte pluviosité (Zhao & McGrath 1994). Cependant, il est parfois possible d'utiliser des analyses de sol sans risquer un mauvais diagnostic dans les régions sèches où les pertes par lixiviation sont faibles (Blair *et al.* 1991) et pour les sols caractérisés par un taux de S extractible très bas (< 2 mg/kg) ou très élevé (> 15 mg/kg ; Blake-Kalff *et al.* 2002).

Cela dit, l'analyse des tissus végétaux est préférée à celle du sol car le statut soufré de la plante apparaît beaucoup plus proche du taux de S disponible dans le sol au moment de l'échantillonnage.

#### c) Analyses de tissus végétaux

##### (1) Indicateurs macroscopiques

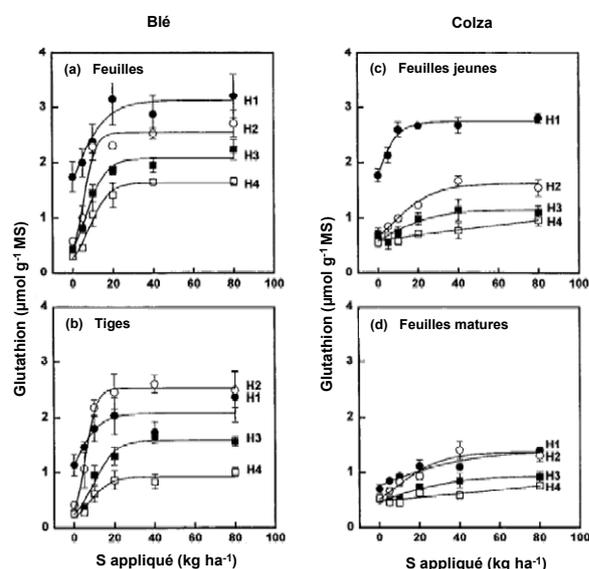
Le plus commun des symptômes visibles est le jaunissement des jeunes feuilles, conséquence de l'inhibition de la photosynthèse. En effet lorsque la nutrition soufrée est suffisante, le sulfate est stocké dans les vacuoles des cellules foliaires. Ce sulfate est principalement libéré au niveau des jeunes feuilles dans des conditions de stress soufré prolongé mais ce processus est trop lent pour pouvoir assurer une nouvelle croissance (Blake-Kalff *et al.* 1998). C'est pourquoi les feuilles en développement sont les premières à montrer les symptômes d'une carence en S.

Un des problèmes de l'utilisation de ce symptôme visible est, qu'*in situ*, il se confond avec celui d'une déficience azotée. De plus, les pertes de rendement peuvent apparaître avant ce symptôme qui ne se révèle qu'en cas de carence sévère.

### (2) Teneurs en éléments : intérêts et limites

L'utilisation de ces indicateurs est basée sur le fait que chaque élément essentiel doit être présent en quantité suffisante au sein de la plante afin de ne pas nuire à sa croissance (Ensminger & Freney 1966). Pour diagnostiquer une carence, plusieurs teneurs peuvent être considérées : teneur en S total, teneur en sulfate, teneur en glutathion (Blake-Kalff *et al.* 2000). La teneur mesurée est à comparer à une valeur critique en deçà ou au delà de laquelle une déficience est avérée.

Ces analyses peuvent permettre aux agriculteurs de tester leurs cultures et de constater si elles sont déficientes ou non en S. Mais une des restrictions majeures est la variabilité des teneurs en éléments de la plante (et des valeurs critiques correspondantes) en fonction des saisons, du stade phénologique, et même du taux de croissance qui varie selon les années (Blake-Klaff *et al.* 2000 ; Figure 2).



**Figure 2 :** Concentrations du glutathion dans (a) les feuilles et (b) les tiges du blé d'hiver (wheat), puis dans les feuilles (c) jeunes et (d) matures du colza de printemps (oilseed rape).

Le colza de printemps a été échantillonné aux stades de croissance de H1 (début de floraison) à H4 (60 à 80 % des bourgeons florifères épanouis). Le blé d'hiver a été échantillonné aux stades de croissance de H1 (2 à 5 thalles) à H4 (1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> nœuds des chaumes détectables). Les points de données représentent la moyenne d'échantillons de quatre plantes plus ou moins leur erreur standard (d'après Blake-Kalff *et al.* 2000).

Ces variations des teneurs peuvent induire une erreur dans l'interprétation des diagnostics si le stade phénologique est mal défini (Matula & Pechová 2002) ou

l'organe analysé mal choisi. Ainsi, d'après des études menées par Blake-Kalff *et al.* (1998) sur le colza, en réponse à un déficit soufré, le taux de sulfate varie selon le type de feuille. En cas de besoin, les feuilles jeunes remobilisent le S à partir du sulfate et, dans des proportions moindres, du glutathion et des glucosinolates. Les feuilles matures ne contribuent quasiment pas à la remobilisation du S : leur teneur ne varie pas et ne reflète pas la situation au moment du diagnostic. De telles différences doivent être prises en compte dans le cadre d'un diagnostic déterminant si les plantes sont carencées ou non en S. Ainsi chez le colza, les feuilles jeunes situées dans la partie supérieure de la plante sont le meilleur organe permettant de mesurer l'état actuel de sa nutrition soufrée.

Pour permettre ce diagnostic, une large échelle de valeurs critiques largement utilisées a été proposée, en fonction (1) du stade de croissance auquel les plantes ont été échantillonnées, (2) des parties prélevées de la plante, (3) des méthodes analytiques utilisées, et (4) des modalités d'expérience (chambre à environnement contrôlé, serre ou champs). Ces conditions d'analyse rendent ces valeurs critiques tellement spécifiques qu'il peut être parfois difficile voire impossible de les extrapoler (Blake-Klaff *et al.* 2002).

### (3) Ratios

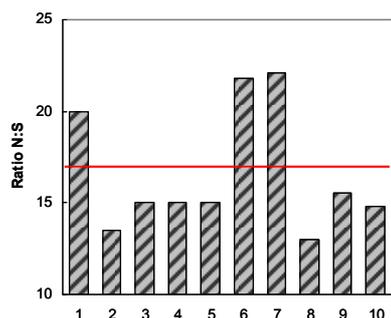
L'utilisation des ratios basés sur la proportion relative de composés soufrés (interne à la plante) serait plus viable dans la mesure où ces ratios sont moins variables que la valeur absolue des teneurs citées précédemment durant les différents stades de croissance des plantes. Deux principaux ratios sont utilisés : le ratio azote : soufre (N : S) et le ratio malate : sulfate. Tout comme pour les teneurs, le ratio mesuré est confronté à une valeur critique évaluée selon les quatre critères que nous venons de citer.

#### Ratio N:S

Basé sur les interactions entre le métabolisme de l'N et celui du S (Dijkshoorn & van Wijk 1967) le ratio N : S est l'indicateur le plus fréquemment utilisé pour mesurer une déficience soufrée. Bien qu'il soit un outil de diagnostic assez fiable, deux problèmes sont associés à son utilisation :

- Tout d'abord, il requiert deux analyses, ce qui augmente le travail et les méthodes d'analyses concernant

le dosage du S total n'étant pas standardisées, ceci peut engendrer une marge d'erreur plus importante quand à l'interprétation du ratio (Crosland *et al.* 2001 ; Figure 3).

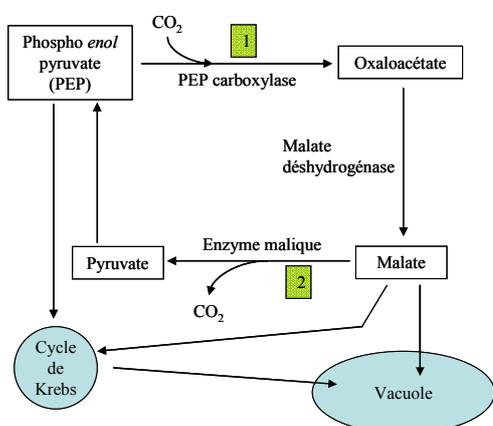


**Figure 3 :** Ratio N:S d'un échantillon de grain de blé mesuré par 10 laboratoires différents. La barre horizontale indique la valeur critique de 17 au-dessus de laquelle les échantillons sont diagnostiqués déficients en soufre (d'après Blake-Kalff *et al.* 2002).

- Ensuite, il reflète les proportions relatives de l'N et du S, mais ne tient pas compte de la variation de chacune au cours du temps (Blake-Kalff *et al.* 2002). Un faible ratio N : S peut indiquer une nutrition soufrée suffisante alors que les deux éléments sont en fait déficients. Inversement, un ratio N : S élevé peut indiquer une nutrition soufrée insuffisante alors que l'N est en fait en excès et le S suffisant (accumulation d'acides aminés libres).

#### Ratio Malate : Sulfate

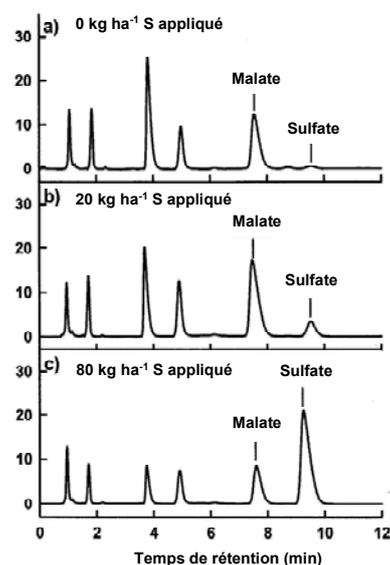
Blake-Kalff *et al.* (2000) proposent l'utilisation du ratio malate : sulfate comme indicateur fiable et pratique d'une carence en S. Le malate est un acide organique dont un des principaux rôles physiologiques est de maintenir l'équilibre ionique et le pH cytoplasmique des cellules d'une plante. Il contrebalance par ses variations de concentration les entrées et sorties de cations et d'anions (Figure 4).



**Figure 4 :** Représentation schématique des fonctions du malate dans le maintien du pH cytoplasmique (d'après Blake-Kalff *et al.* 2002).

- (1) Cas de carence en soufre (ou excès de cations)  
(2) Cas de suffisance en soufre (ou excès d'anions)

Par conséquent la relation entre la concentration en malate et celle en sulfate est inversée (Figure 5). Plus la concentration en sulfate s'élève, plus celle du malate diminue (Figure 5).



**Figure 5 :** Chromatogrammes de plantes de colza cultivées au champ selon différents niveaux de fertilisation soufrée: a) 0, b) 20 et c) 80 kg S ha<sup>-1</sup> (= 0, 50 et 200 kg SO<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup>). Les ratios malate : sulfate sont calculés par division des valeurs correspondantes aux pics de sortie et sont de 50,4, 5,14 et 0,33, pour les traitements 0, 20 et 80 kg ha<sup>-1</sup> respectivement.

Leurs concentrations varient dans les mêmes proportions durant la croissance. Ce ratio s'avère donc stable durant les phases de développement de la plante, quand la nutrition soufrée est suffisante. En pratique, 1,5 est la valeur critique du ratio. Ainsi au moment de l'échantillonnage, un ratio supérieur à 1,5 indique une carence en S, alors qu'un ratio inférieur ou égal à 1,5 indique une nutrition suffisante en S (Blake-Kalff *et al.* 2002).

Cependant, cette technique est difficilement applicable aux Fabacées. En effet, la fixation biologique de l'N<sub>2</sub> modifie le cycle du malate et donc l'interprétation du ratio malate : sulfate (Blake-Kalff *et al.* 2004). Selon le modèle de Ben Zioni *et al.* (1971), la nutrition azotée des plantes s'opère de façon générale au niveau des racines *via* l'absorption des nitrates accompagnée d'une entrée d'ion K<sup>+</sup> pour maintenir le pH cytoplasmique. Le KNO<sub>3</sub><sup>-</sup> serait transporté par la voie xylémique vers les parties aériennes pour y être réduit. Cette réduction stimulerait la production de malate dont le transport vers les racines s'exécute ensuite en compagnie de l'ion K<sup>+</sup> assurant ainsi le recyclage de cet ion. Le malate est alors décarboxylé par l'enzyme malique selon la voie n° 2 du

cycle (Figure 4). Au contraire les plantes fixant l' $N_2$  sont en symbiose avec des bactéries qui sont capables de convertir cette forme d' $N$  en  $NH_3^+$ , ce qui ne nécessite pas l'entrée d'ion  $K^+$ . De cette manière, le cycle du malate est biaisé. La concentration du malate est alors modifiée car il n'est plus utilisé comme navette pour le réacheminement de l'ion  $K^+$  des feuilles vers les racines. En outre, la fixation du  $N_2$  est réprimée en présence de nitrates dans le sol. La nutrition azotée est alors à nouveau assurée par l'absorption racinaire et le malate sollicité pour sa fonction de transporteur de l'ion  $K^+$ , des feuilles vers les racines. A cause de cette complication selon le statut azoté des sols, des précautions sont nécessaires quand à l'application du ratio malate : sulfate sur les Fabacées.



---

**Résumé** - L'importance de l'appauvrissement des sols en S, dû à l'augmentation des exportations et la diminution des apports atmosphériques, nécessite de préciser son impact sur la dynamique des communautés végétales de prairie, ceci en fonction de la co-disponibilité en N. Une étude pluri-échelle est menée : *in situ*, et en mésocosme, sur des populations et communautés modèles de 4 espèces dominantes. Soumises à un régime de fauche, la production relative, l'abondance et la compétitivité des espèces sont explicitées au travers de leur efficacité d'utilisation des ressources N et S, *via* un double marquage  $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$ . Leur réponse est conditionnée par leur aptitude physiologique à mobiliser les ressources, mais aussi, dans les milieux riches en N, à entrer en compétition pour celles-ci. Une forte co-régulation des métabolismes N et S est mise en évidence. Une augmentation de la disponibilité en S accroît la production aux différentes échelles. Les effets sur les Poacées se manifestent uniquement en situation de forte disponibilité en N, par une stimulation de leur efficacité d'utilisation de l'N, optimisant l'utilisation des engrais N apportés. Ceux sur le trèfle impliquent la stimulation (i) de la fixation de l'N atmosphérique, ceci même en situation de forte disponibilité en N, (ii) de sa multiplication végétative et (iii) de l'accumulation de réserves N dans les stolons. *In situ* et en communautés, l'apport de S favorise l'abondance d'espèces dominées et, en cas de fertilisation N élevée, maintient voire augmente la diversité spécifique. Par ces effets, un apport rationnel de S apparaît comme un outil important de gestion des prairies.

---

**Title** - Effects of nitrogen/sulphur gradients on plant community structure of Basse-Normandie grasslands: dynamics of mineral resources acquisition and of competitive interactions.

---

**Abstract** - The importance of soil S depletion, due to an increased export from plant harvest combined with a decreased atmospheric S deposition, requires to study its impact on the dynamics of grassland communities, under different N supplies. A pluri-scale study was carried out *in situ*, and in mesocosm consisting of populations or of model communities with 4 dominant species. Before and after defoliation, the relative production, the abundance and the competitiveness of the species were analyzed through their N and S use efficiency using a simultaneous  $^{15}\text{N}/^{34}\text{S}$  labelling. Their response was conditioned by their physiological ability to mobilize resources, but also to compete for the latter in N-rich soil. A strong co-regulation between N and S metabolisms was highlighted. An increased S availability enhanced production for all scale situations. The S effects on Poaceae appeared only at high N availability, by a stimulation of their soil N use efficiency, optimizing N fertilizer use. Those on clover induced the stimulation (i) of the atmospheric N fixation, even at high N availability, (ii) of its vegetative multiplication and (iii) of N reserves accumulation in stolons. *In situ* and in community, S input increased the abundance of dominated species and, with high N fertilization, maintained or increased specific diversity. Overall, a rational S input appeared as an important tool for grassland management.

---

**Mots clés :**

**Indexation rameau :** plantes des prairies/ écologie des prairies/ plantes fixatrices d'azote/ engrais soufrés/ engrais azotés/ absorption/ compétition (botanique)/ associations végétales

**Indexation libre :** isotopes stables en physiologie végétale/ fauche

---

**Discipline :** Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

---

**Laboratoire :**

UMR INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S  
Université de Caen Basse-Normandie  
Esplanade de la Paix  
14032 Caen cedex

---