

UNIVERSITE DE CAEN BASSE-NORMANDIE
U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée
UMR INRA/UCBN 950
Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S

RAPPORT DE STAGE

Présenté le 02 juin 2010 par

Rim KHLIFA

Dans le cadre du

Master 1

Biologie, Santé-parcours Ecosystèmes Biodiversité Anthropisation

Détermination de la Teneur Critique en soufre chez le ray-grass *Lolium perenne*

Directeur de laboratoire : F. LE DILY, Professeur
Maître de stage : J.B. CLIQUET, Maître de conférences



Lolium perenne(Ray-grass)

Présentation du laboratoire d'accueil

Le laboratoire qui m'a accueilli pour mon stage est l'UMR (Unité Mixte de Recherche) INRA (Institut National de Recherche Agronomique) de l'UCBN (Université de Caen Basse Normandie) 950 EVA (Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments N.C.S).

Cette unité est sous la direction du Professeur Frédéric LE DILY. A ce jour, l'activité de cette UMR mobilise 38 personnes qui peuvent être classées en trois catégories :

- Personnel de l'INRA, à savoir : 1 CR (Chargé de recherches), 1 IE (Ingénieur d'étude) 3 TR (Techniciens de recherche) 3 AT (Adjointes techniques).
- Les Universitaires : 4 Professeurs, 11 Maîtres de conférences, 2 Techniciens, 3 Adjointes techniques.
- Et... 1 Post-Doc, 8 Doctorants, 6 Master Recherche 2^{ème} année, 1 CDD.

L'UMR conduit des recherches de biologie intégrative sur les métabolismes de l'azote, du carbone et du soufre chez différentes espèces végétales cultivées telles que *Brassica napus* (le colza) , *Lolium perenne* (le ray-grass), *Trifolium repens* (le trèfle) ou *Medicago sativa* (la luzerne). Ses principaux objectifs visent à déterminer les mécanismes conditionnant l'efficacité d'utilisation de l'azote par les végétaux dans le contexte d'une optimisation de l'utilisation des intrants azotés, et d'une réduction des conséquences néfastes pour l'environnement.

Trois équipes de recherches y ont été constituées :

- L'équipe « **Azote** », dont l'objectif est d'identifier et de hiérarchiser les signaux impliqués dans l'absorption et la mise en réserve de l'azote.
- L'équipe « **Carbone- Défoliation** », qui étudie la régulation de l'allocation et de la répartition du carbone chez des espèces prairiales en relation avec la défoliation et le métabolisme azoté.
- L'équipe « **écologie, interaction plante-plante** », qui est la plus récente (2003), a pour objectif d'analyser la structure, le fonctionnement, la dynamique des communautés végétales herbacées le long d'un gradient N/S, et les mécanismes mis en jeu.

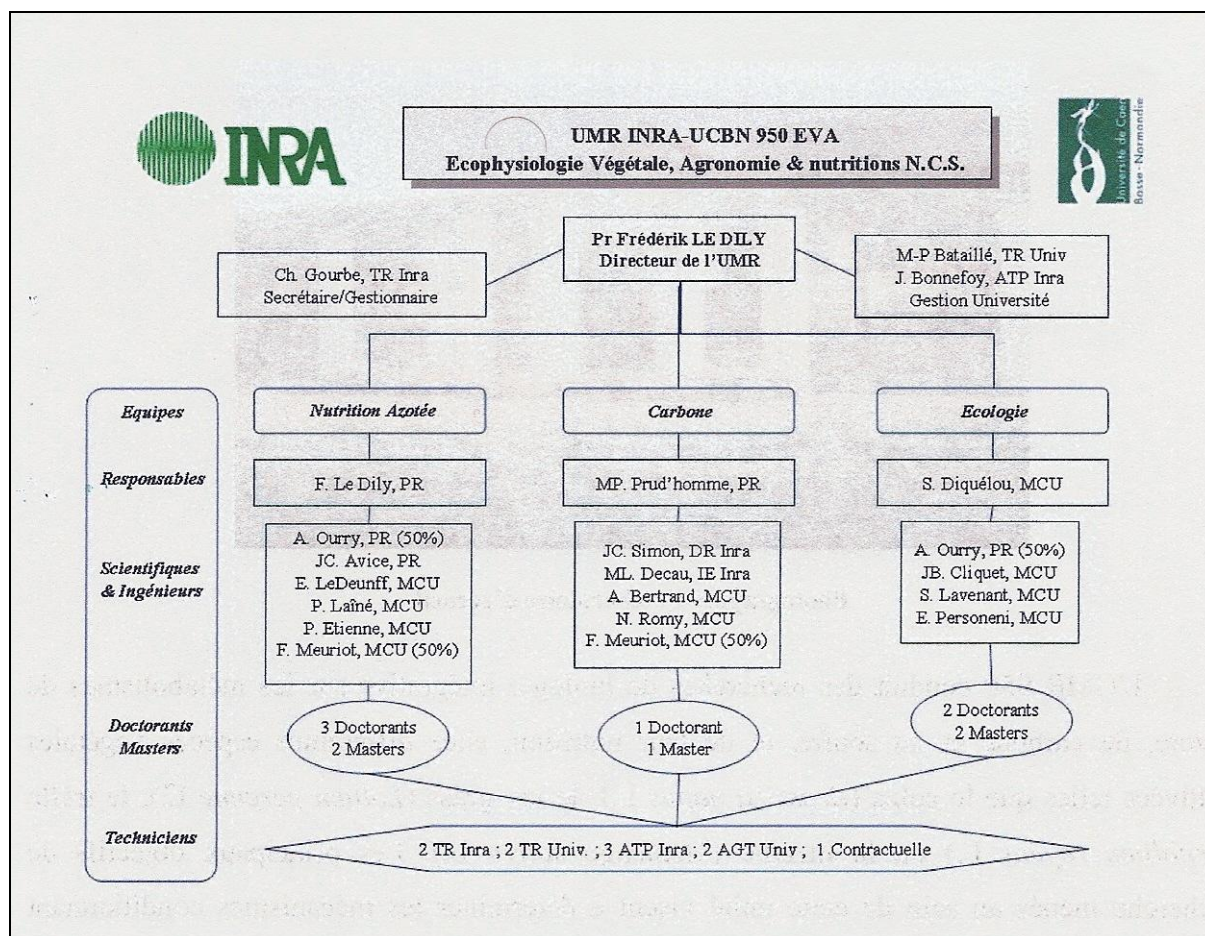


Figure 1. Organigramme du laboratoire d'accueil

1. INTRODUCTION :

Le Soufre (S) est le neuvième macroélément essentiel aux végétaux après l'Hydrogène, le Carbone, l'Oxygène, l'Azote (N), le Potassium, le Calcium, le Magnésium, et le Phosphore. Il est principalement employé comme engrais (sulfates) et phytosanitaire fongicide (contre l'oïdium de la vigne) mais est également largement utilisé dans les insecticides (Heller, 1984).

A l'heure actuelle, son métabolisme est bien connu car il a été bien étudié et mis en évidence tant au niveau biochimique que moléculaire (Mifin *et al.*, 1990). C'est ainsi que l'on a découvert que le S avait un rôle prépondérant dans de très nombreux processus métaboliques et physiologiques chez les végétaux (Figure 2) (Victoria, 2004). En effet, il entre dans la structure des protéines, et par conséquent leur fonction, puisqu'il est nécessaire à la synthèse des acides aminés soufrés, la Cystéine et la Méthionine qui constituent le groupement thiol (-SH) et les ponts disulfures. Le S contribue ainsi à l'élaboration de la structure tertiaire de ces protéines, et intervient également à plusieurs autres niveaux comme la constitution de vitamines telles que la thiamine ou la biotine ainsi que du coenzyme A (élément important dans la respiration) (Hopkins, 2003), mais aussi dans la composition des glucosinolates qui ont pour fonction la défense des plantes contre les ravageurs et les agents pathogènes. Ces mêmes glucosinolates pouvant être considérés comme une source potentielle de S pour les autres processus métaboliques en conditions de faibles teneurs en S. (Cependant la voie de mobilisation du S à partir des glucosinolates n'a pas encore été déterminée) (Falk *et al.*, 2007). Le S est aussi impliqué de manière directe ou indirecte en tant que constituant de groupes prosthétiques, donneur de groupe méthyle, précurseur d'hormones et plus généralement comme faisant partie intégrante de nombreuses protéines et d'enzymes (figure 2) (Victoria, 2004), on notera son rôle clé dans le métabolisme de l'N. La Nitrogénase, enzyme responsable de la réduction de l'N atmosphérique dans les symbioses fixatrices d'N, contenant un groupement prosthétique englobant 4 atomes de fer et 4 atomes de S (Mortenson et Thornley, 1979). De plus, la teneur en S et le ratio N/S du sol modulent l'absorption de l'N et l'activité de certaines enzymes impliquées dans la réduction et l'assimilation de ce dernier (Prosser *et al.* 2001).

Le principal site d'absorption du S par la plante est sa racine où il y est absorbé sous forme de sulfate grâce à l'intervention de transporteurs à forte affinité (HATS) (Sultr1 ; 1 et

Sultur2 ; 1) (Takahashi *et al.*, 2000). Mais il peut aussi provenir du S atmosphérique sous forme de dioxyde de S qui est capturé par les feuilles (Derome *et al.*, 2004).

L'intérêt que portent les scientifiques depuis quelques années pour le S, s'est amplifié suite aux diminutions des teneurs en S dans les sols. Le S du sol provient de l'atmosphère par l'intermédiaire des dépôts secs ou humides (Malcolm *et al.*, 1977), et le S atmosphérique provient des émissions volcaniques mais également des pollutions industrielles. Il est étroitement lié à la révolution industrielle et aux activités anthropiques croissantes (urbanisation, utilisation massive de combustibles fossiles, etc.) entraînant des pollutions qui ont profondément modifié la biosphère. Ainsi, la teneur en dioxyde de S (SO₂) de l'atmosphère a augmenté de 114 % entre 1960 et 1975 en France métropolitaine. Ces composés entraînent une acidification de l'atmosphère qui peut provoquer des pluies acides, particulièrement toxiques pour les végétaux (Malcolm *et al.*, 1977). De telles modifications se sont déjà produites dans le passé mais jamais avec une telle rapidité (Mann *et al.*, 1998), le danger que représentent donc de telles modifications pour tous les êtres vivants dans la biosphère, a marqué l'émergence dans le début des années 90 (« sommet de la terre » organisé par les Nations Unies à Rio en 1992) de conventions et d'engagements visant à stabiliser ou réduire les émissions de gaz carbonique et autres gaz à effet de serre et fixe des seuils de pollution à ne pas dépasser. Depuis, ces mesures se sont avérées efficaces dans le cas du S et les teneurs en S atmosphériques tendent désormais à chuter.

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

Cette chute des retombées atmosphériques conjuguée à l'intensification de la production agricole a entraîné une baisse des teneurs en S des sols à un niveau qui peut devenir limitant pour la croissance des plantes (Schnug *et al.*, 1992). En effet, cette déficience en S touche de nombreuses espèces à différents niveaux qu'ils soient morphologiques, physiologiques ou métaboliques. Tout ceci résulte d'une altération des capacités d'assimilation du carbone et de l'N. Par exemple, la privation en sulfate exerce un effet négatif sur la fixation du diazote chez *Vicia faba* en diminuant l'activité de la nitrogénase et la formation des nodules (Lange *et al.*, 1996) et chez le pois (Zaho *et al.*, 1999).

De plus, la baisse de la teneur en sulfate dans le substrat, s'accompagne généralement d'une baisse de la photosynthèse (Marayuma-Nakashita *et al.*, 2003), ainsi que de la teneur en chlorophylle (Gilbert *et al.*, 1997).

Cette tendance à la baisse du S dans les sols, devrait se poursuivre au cours des prochaines années (Scherer, 2001). C'est dans ce contexte d'une éventuelle sévère réduction de la disponibilité en S qui pourrait augmenter la compétition des plantes pour cet élément, que l'équipe d'écologie de l'UMR INRA « écophysiologie Végétale et Agronomie » s'intéresse au devenir des communautés végétales des prairies. Une meilleure connaissance des besoins en S des différentes plantes prairiales est donc nécessaire, d'autant plus que la composition spécifique des prairies est fortement liée à la disponibilité en nutriments. Les besoins en N ont été déterminés grâce à la détermination de la teneur minimale à laquelle la production maximale est observée, c'est la notion de teneur critique en N (Morot-Gaudry, 1997). Alors que les besoins en N des espèces prairiales sont assez bien connus, leurs besoins en S sont jusqu'à l'heure actuelle encore mal connus.

Ainsi, l'objectif principal de mon stage est de déterminer les besoins en S d'une Poacée prairiale, le ray-grass. Pour cela nous avons mis au point une méthode permettant de rechercher la teneur critique en S, en précisant les relations entre S et production de biomasse. J'ai analysé les tissus issus d'une culture effectuée en 2009, et qui comprenait 5 niveaux croissants de concentrations en sulfate dans les solutions nutritives. J'ai également mis en place, et partiellement analysé, une seconde culture comprenant 3 niveaux de concentrations différents en sulfate des solutions nutritives, destinée à apporter des résultats intermédiaires à ceux trouvés lors de la première culture. Tout ceci ayant pour but de mettre en évidence l'existence d'une teneur critique en S chez le ray-grass (*Lolium perenne*) qui est une poacée couramment cultivée comme plante fourragère, tout comme on sait désormais bien le faire pour l'N.

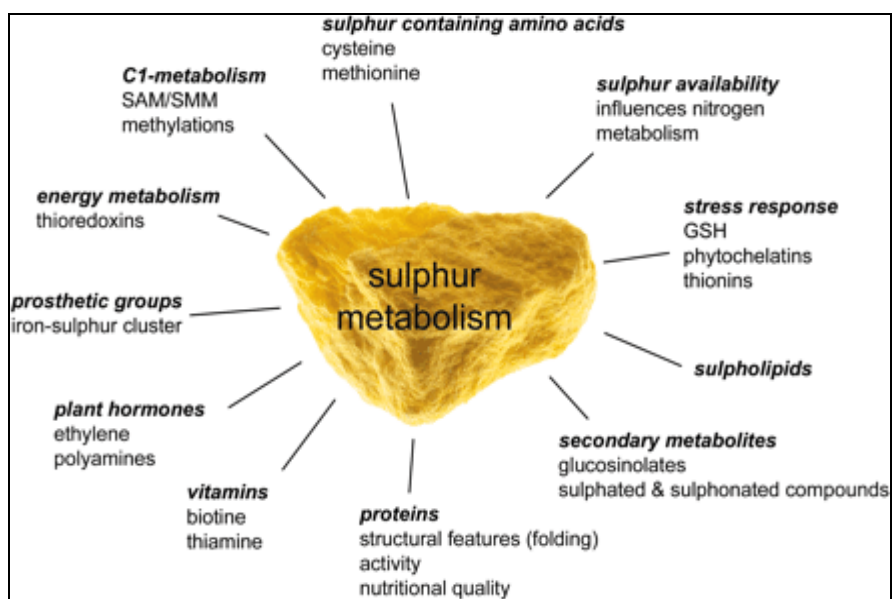


Figure 2. Schéma illustrant le rôle central du soufre dans de nombreux processus métaboliques et physiologiques chez les végétaux. (Victoria, 2004).

2. MATERIELS ET METHODES :

2.1. Matériel végétal et conditions de cultures

2.1.1. Matériel végétal

Lolium perenne (le Ray-grass) de variété sauvage est la Poacée prairiale qui a été choisie pour cette étude. C'est une plante fourragère très compétitive et très représentative des prairies mésophiles et nitrophiles et qui présente ici un avantage majeur, celui d'être une espèce à vitesse de croissance élevée et à durée de vie courte de ses organes. C'est la Poacée la plus cultivée dans nos prairies en raison de sa bonne valeur nutritive pour le bétail.

2.1.2. Conditions de cultures

Deux séries d'expérimentations ont eu lieu lors de cette étude, il s'agit de cultures en hydroponie réalisées en conditions contrôlées sous serre de manière à ce que les plantes éclairées par des lampes à sodium haute pression (400 Watts), reçoivent un éclairage de $400\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons synthétiquement actifs. Ces dernières sont alors cultivées en conditions de jours longs (16h d'héméropériode et 8h de nyctipériode). L'hygrométrie sous la serre était d'environ 60% et les températures diurne et nocturne étaient respectivement de 22°C et 18°C.

La première expérimentation qui s'est déroulée de juin à septembre 2009, représentait une culture de ray-grass comprenant 5 niveaux de concentrations en sulfate dans les solutions nutritives : 0mM ; 0.05mM ; 0.5mM ; 2.5mM et 5 mM, à raison de 5 répétitions par niveau. Au cours de mon stage, j'ai effectué la totalité des analyses de cette culture et mis en place une seconde culture qui s'est quant à elle déroulée de mars à juin 2010, et qui comprenait les 3 niveaux de concentrations en sulfate suivants : 0mM ; 0.005mM et 0.05mM avec également 5 répétitions par niveau. Il faut noter que dosage de sulfate dans l'eau déminéralisée a pu montrer la présence de trace de sulfate. Ainsi le traitement 0 mM correspond en réalité à une concentration de 1 μM en sulfate. Les 3 premières récoltes de cette culture ont été effectuées, et la quatrième le sera au mois de juin (Tableau I).

Tableau I. Composition de la solution nutritive alimentant les plantes de la seconde culture. Lors de la privation en Soufre, MgSO_4 est remplacé par MgCl_2 .

Pour 20 L					
Sels	Masse Molaire	[Conc Finale] mM	[Conc mère] mol.L-1	[Conc mère] g.L-1	Volume en ml Solution mère
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	236,1	1,25	1,25	295,13	20
KNO_3	101,1	1,25	0,5	50,55	50
KH_2PO_4	136,1	0,25	0,5	68,05	10
MgSO_4	246,37	0	1	246,37	0
EDTA, 2NaFe, 3 H_2O	421	0,2	0,08	33,68	50
Oligoéléments sans S	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	cf. ci-dessous	10
Pour 0mM de S					
MgCl_2	94,3	0,5	1	94,3	10
MgSO_4	246,37	0	1	246,37	0
Pour 0,005mM					
MgCl_2	94,3	0,495	1	94,3	9,9
MgSO_4	246,37	0,005	1	246,37	0,1
Pour 0,05mM					
MgCl_2	94,3	0,45	1	94,3	9
MgSO_4	246,37	0,05	1	246,37	1

Tout d'abord, une centaine de graines ont été mises à germer dans une petite jardinière contenant de la perlite très humide, puis les graines sont humidifiées par pulvérisation d'eau osmosée et placées 3 jours à l'obscurité (jardinière recouverte d'une feuille d'aluminium). Une fois germées (c'est-à-dire à peu près 10 à 15 jours après), les plants sont repiqués dans des bacs individuels de 1L de solution nutritive disposés de manière aléatoire sur le portoir (Figure 3).

A



B

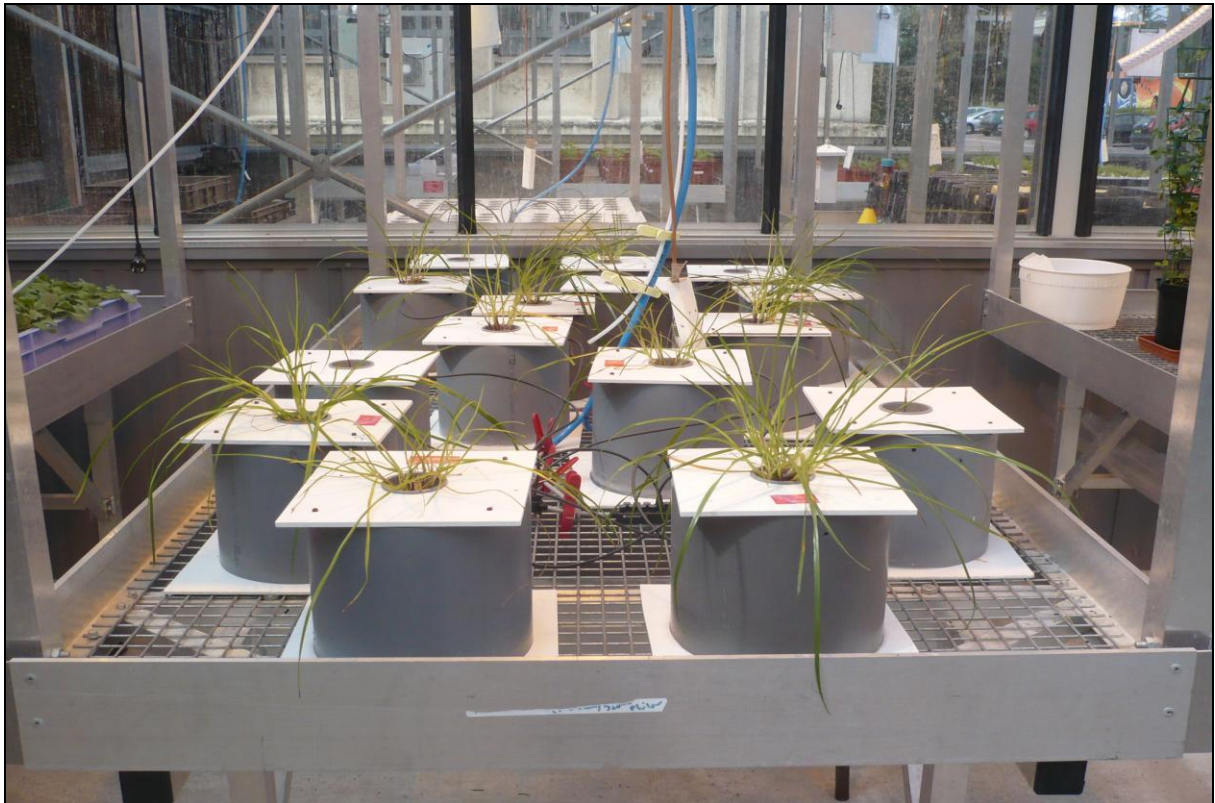


Figure 3. Photographies visualisant le dispositif utilisé pour la culture en hydroponie des ray-grass avant **(A)** et après **(B)** le passage en pots de 4L.

Le cycle de culture dure alors 80 jours, durant lesquels 5 récoltes ont lieu respectivement à 0 ; 15 ; 33 ; 49 et 80 jours. A la récolte 3 (c'est-à-dire à 49 jours), les plantes sont déplacées dans des bacs de 4L permettant de respecter leurs nouveaux besoins spatiaux à leur biomasse en croissance. Les bacs sont oxygénés à l'aide de bulleurs et sont déplacés après chaque récolte afin de minimiser les effets dus à leurs emplacements. Au début de la culture, les solutions nutritives sont changées toutes les deux semaines et complétées à niveau entre deux par une solution nutritive sans soufre.

A l'issue de chaque récolte, les échantillons sont pesés (Matières fraîches) et sont placés 48h à l'étuve ce qui permet de peser aussi leurs matières sèches et de les broyer finement afin d'obtenir de la poudre qui permettra de les analyser ultérieurement selon différents procédés.

2.2. Analyse du Soufre par IRMS « Isotope Ration Mass Spectrometry » (Spectromètre de masse isotopique)

L'IRMS (figure 4) est une spécialisation de la spectrométrie de masse. Des méthodes de cette dernière y sont utilisées pour mesurer l'abondance relative des isotopes dans un échantillon donné, (Paul, 2007) il permet ainsi la mesure précise des mélanges d'isotopes stables qui le composent. (Townsend, 1995)

Le système utilisé ici pour les analyses isotopiques comprend un analyseur élémentaire assurant la production de N_2 , CO_2 et SO_2 à partir d'échantillons solides ou liquides. Cet analyseur est couplé à un spectromètre de masse permettant d'assurer les rapports $^{15}N/^{14}N$, $^{13}C/^{12}C$ ou $^{34}S/^{32}S$. Dans le cadre de cette étude, seul le rapport $^{34}S/^{32}S$ sera mesuré.

Tous les échantillons ont préalablement été séchés à l'étuve puis broyés très finement à l'aide de broyeurs à billes afin d'obtenir une poudre fine qui pourra être analysée par l'IRMS. Ces échantillons réduits à l'état de poudre sont pesés dans des capsules en étain (diamètre : 3.5mm ; hauteur : 5mm) à raison de 2mg pour les échantillons ayant reçu une concentration inférieure à 2.5 mM de soufre (compte tenu de la faible disponibilité en poudre à peser de ces échantillons de petite taille) et de 4 mg pour les échantillons ayant reçu une fertilisation en soufre supérieure ou égale à cette dernière.

Les échantillons ainsi conditionnés sont alors injectés dans le spectromètre de masse et plus précisément dans une colonne qui assurera simultanément l'oxydation et la réduction du soufre contenu dans l'échantillon sous forme de SO_2 . Puis l'eau se trouve piégée en passant dans une colonne de perchlorate de magnésium ; et une chromatographie en phase

gazeuse à 95°C permet de former des pics et de bien séparer le CO₂ du SO₂ 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 afin que la mesure des molécules de SO₂ par le spectromètre de masse ne soit pas perturbée par le CO₂. Au niveau du spectromètre de masse, les paramètres de la source sont préalablement optimisés pour détecter les masses 64 et 66 pour le dosage du soufre. Le dioxyde de soufre est injecté 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 de SO₂ ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est donc uniquement conditionné par leur masse. Les ions sont collectés par trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis au système informatique. L'abondance isotopique en ³⁴S est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 66/64 et en comparant les résultats au gaz de référence (SO₂) injecté entre chaque échantillon. Ce gaz a été préalablement calibré avec des standards internationaux IAEA (International Atomic Energy Agency) et les quantités de Soufre total sont calculées par rapport à des échantillons solides de végétaux connus.

Analyseur Élémentaire Carbone Azote Soufre

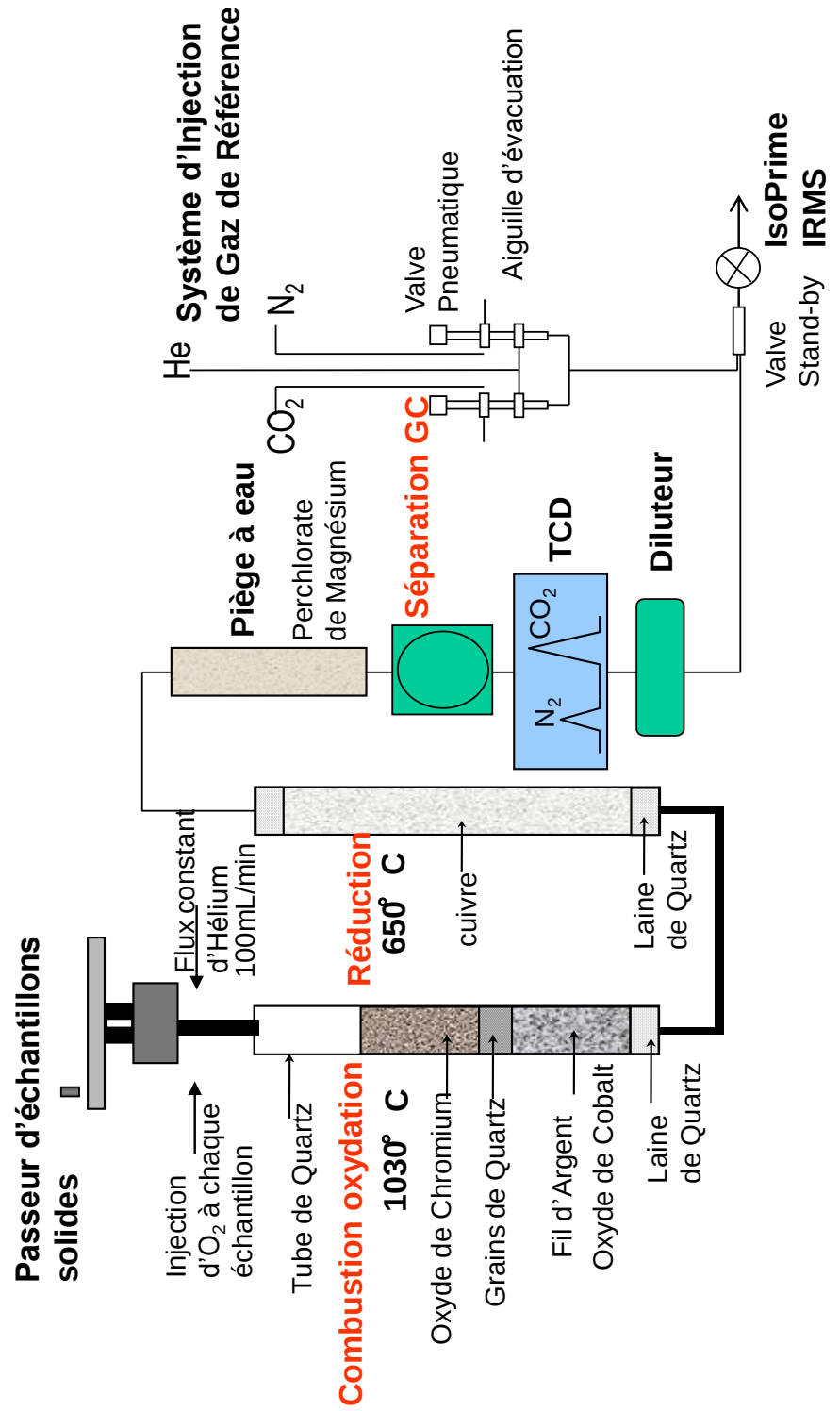


Figure 4. Schéma présentant le fonctionnement du spectromètre de mass isotopique.

2.3. Dosage du sulfate par chromatographie échangeuse d'ions

Les teneurs en sulfates sont mesurées par chromatographie ionique haute performance (CIHP). Le principe est le suivant : Les anions sont séparés par une colonne échangeuse d'ions (IONPAC AS4A -SC 4mm- polystyrène polyacrylate) par compétition avec l'éluant (KOH) en fonction de leur masse moléculaire et de leur valence. Ils sont détectés par conductimétrie puis identifiés en fonction de leur temps de rétention par comparaison de l'aire avec un standard.

Cependant, avant le passage en chromatographie des organes à analyser, une extraction de sulfate à partir d'échantillons de feuilles et de racines réduits en poudre fine est préalablement nécessaire. Il s'agit d'extraire une masse connue d'échantillon (environ 50 mg secs) avec 2ml d'éthanol à 50%, d'agiter à l'aide d'un vortex avant de déposer au bain-marie à 40°C durant 1h, puis de centrifuger (à 10000g pendant 10 minutes) afin de récupérer le surnageant et de recommencer les opérations précédentes à partir du culot, cette fois avec seulement 1 ml d'éthanol à 50%. Puis avec le nouveau culot, c'est avec uniquement de l'eau que toutes ces étapes vont être répétées depuis le début à la différence près que cette fois, le bain-marie sera à 95°C. Lorsque tous les surnageants correspondants à toutes ces étapes seront accumulés dans des tubes en plastiques, ils seront placés dans un concentrateur durant 900 minutes afin d'évaporer le solvant contenu dans les échantillons. Une fois récupérés, les tubes vont se voir ajouter 1 ml d'eau, puis vont être vortexés et déposés dans des tubes eppendorf et centrifugés durant 5 minutes à 15000g. Le surnageant sera récupéré et filtré à l'aide de filtres et de seringues, puis selon les différentes concentrations qu'ont reçu les échantillons, il sera alors décidé au cas par cas si l'injection en chromatographie sera manuelle ou automatique compte tenu du degré de dilution qui devra être appliqué aux échantillons afin d'obtenir des concentrations en sulfate comprises dans la gamme (c'est-à-dire entre 5 et 50 µg/mL).

La chromatographie ionique haute performance, nous donnant aussi les concentrations en nitrates et en phosphates des échantillons, ces dernières ont donc aussi été prises en compte dans la partie résultats.

2.4. Utilisation du lecteur de chlorophylle (SPAD-502)

Le lecteur de chlorophylle est un appareil qui permet d'estimer la teneur en chlorophylle dans la feuille. L'échelle de mesure de cet appareil est sans unité et peut varier de 0 à 80, avec les valeurs élevées correspondant à des feuilles d'un vert plus foncé (Dwyer *et al.*, 1994). Il mesure la quantité de lumière passant à travers les feuilles et interprète les

données concernant les propriétés de la chlorophylle et le spectre électromagnétique. Pour ce faire, il suffit de pincer une feuille avec l'appareil toujours au même endroit et sur des feuilles de même âge. Ce dernier envoie alors deux rayonnements de longueurs d'onde différentes qui traversent la feuille. L'un de ces rayonnements (430nm) est absorbé par la chlorophylle, proportionnellement à sa teneur dans la feuille, tandis que l'autre (750nm) est très peu absorbé, et sert plutôt de référence interne, afin de compenser pour l'absorbance non-chlorophyllienne liée aux parois cellulaires et à la teneur en eau de la feuille (Dwyer *et al.*, 1994). Le ratio entre ces deux longueurs d'onde, en plus du ratio déterminé sans feuille, est mesuré par l'appareil.

Le soufre étant un élément essentiel de la synthèse chlorophyllienne, la teneur en chlorophylle obtenue sera donc un bon indicateur de la relation existant entre cette dernière et la disponibilité en soufre pour la plante.

2.5. Mesure des pigments foliaires par Multiplex 3

Le multiplex est un capteur optique qui mesure de manière instantanée et non destructive, les polyphénols et la chlorophylle des plantes. C'est une technique basée sur la fluorescence de la chlorophylle, pour déterminer les polyphénols présents dans l'épiderme des plantes et la chlorophylle, aussi bien des feuilles que des fruits.

Ainsi les chlorophylles, les flavonoïdes, les anthocyanes et l'indice de bilan azoté (NBI « Nitrogen Balance Index ») (représentant le rapport chlorophylles/ flavonoïdes) ont été mesurés et analysés statistiquement (figure 5).

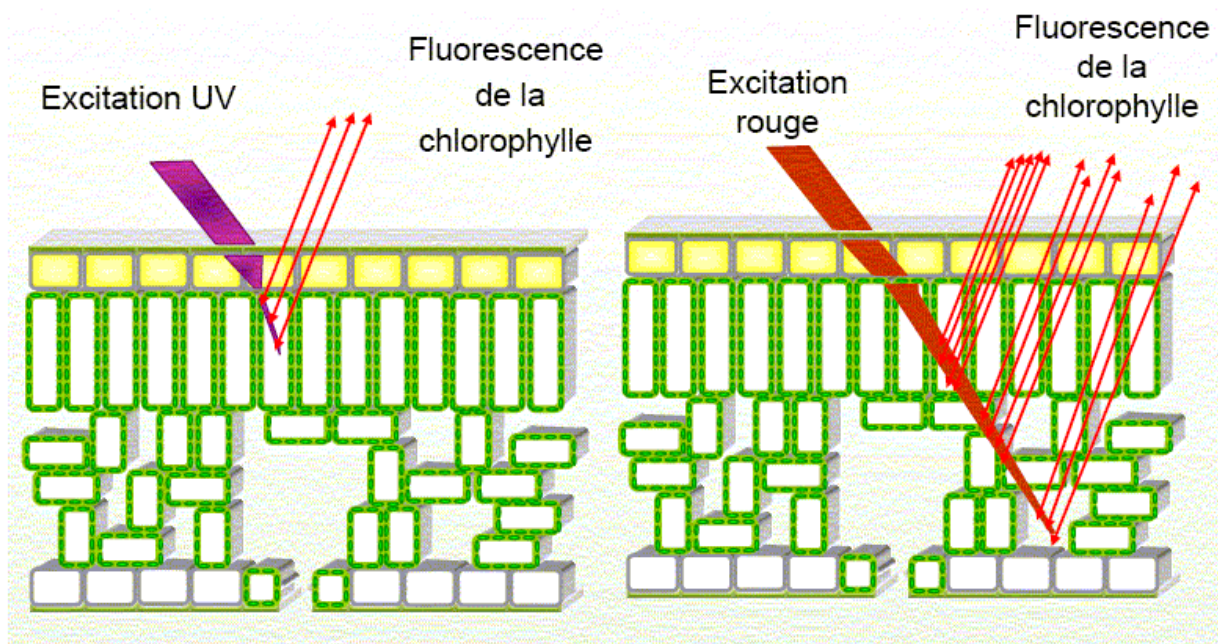


Figure 5. Schéma illustrant la mesure des chlorophylles par multiplex 3. Technologie basée sur les propriétés d'absorption des molécules présentes dans l'épiderme. (Bilger *et al.*, 1997).

2.6. Traitement statistique des données

Cinq répétitions par traitement et par date de récolte ont eu lieu afin de réaliser ces tests statistiques. Les données ont été analysées par un test ANOVA (logiciel Minitab version 13.20), à chaque fois que cela était possible, c'est-à-dire, à chaque fois que les deux conditions suivantes ont été vérifiées et validées, à savoir, la normalité des données d'une part et la l'égalité des variances d'autre part. Quand l'une de ces deux conditions n'était pas respectée, les données ont été analysées par un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis. Dans les cas où ce dernier a révélé l'existence de différences significatives, il a alors été complété par le test de la médiane de Mood qui permet de situer les différences observées. (Les résultats seront présentés dans la partie « Résultats » par les valeurs des probabilités p et les valeurs de H).

3. RESULTATS :

3.1. Effet de la disponibilité en Sulfate sur la croissance des plantes

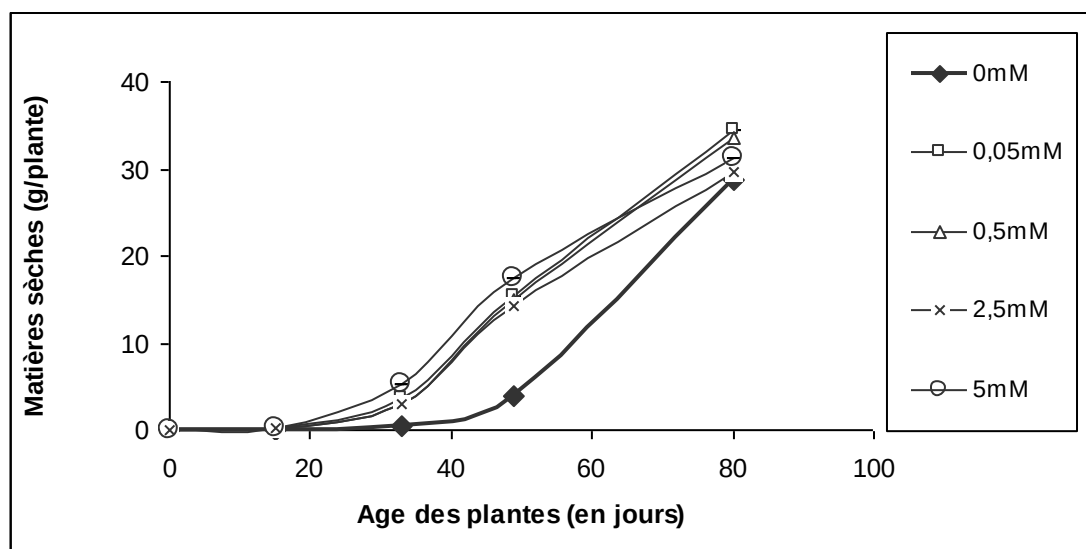


Figure 6. Courbes de croissance du ray-grass représentant la masse sèche totale des plantes (g/plante) en fonction des différentes concentrations en Sulfate dans la solution nutritive (culture 1). Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards.

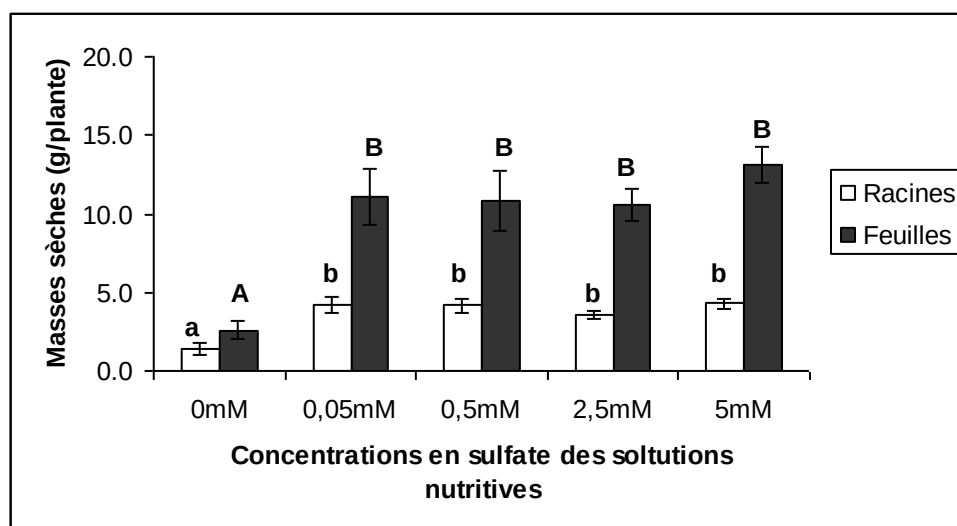


Figure 7. Matières sèches des parties aériennes et des racines de ray-grass âgés de 49 jours en fonction des concentrations en sulfate de la solution nutritive (culture 1). Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Les lettres indiquent des différences significatives entre les masses d'un même organe.

Les figures 6 et 7, présentent l'évolution des matières sèches totales des parties aériennes et des racines de la première culture qui comprenait les 5 concentrations en sulfate suivantes : 0mM ; 0.05mM ; 0.5mM ; 2.5mM et 5mM. En 2010 une deuxième culture du même type a été réalisée comprenant cette fois 3 niveaux de concentrations : 0mM ; 0.005mM et 0.05mM permettant ainsi d'ajouter un niveau intermédiaire aux deux premiers niveaux précédemment mis en place (figure 8).

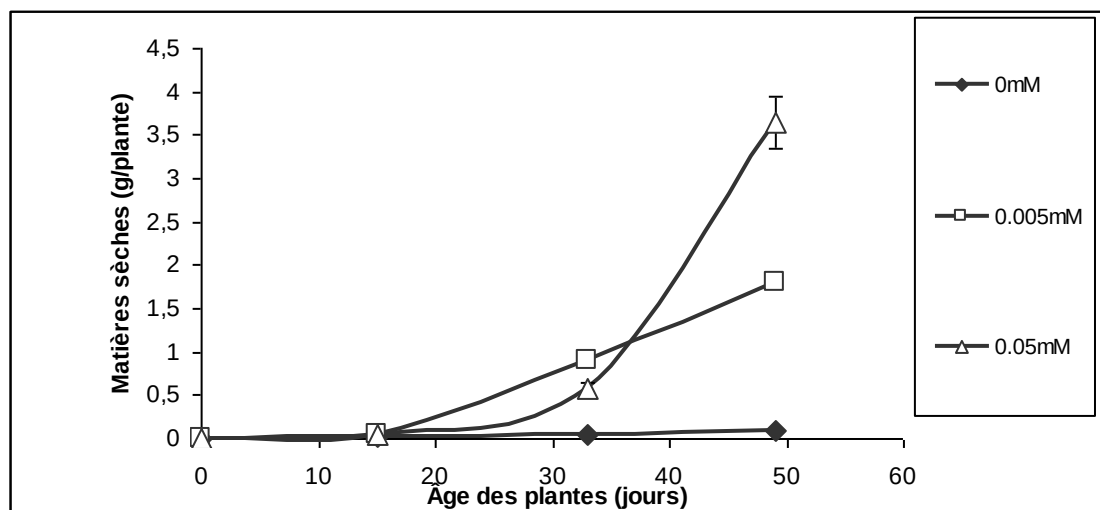


Figure 8. Courbes de croissance du ray-grass représentant la masse sèche totale des plantes (g/plante) en fonction des différentes concentrations en Sulfate dans la solution nutritive (culture 2). Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards.

Il apparaît dans les deux cas, que la disponibilité en sulfate modifie la croissance des plantes. La croissance des plantes traitées avec 0mM de sulfate, est significativement inférieure à celles des autres concentrations pour les trois premières récoltes dans les deux cultures. C'est le cas par exemple pour la 3ème récolte (à 49 jours) de la culture 1 ($H = 12,85$; $P = 0,012$). Il n'y a pas de différences significatives entre les autres concentrations pour la culture 1. De plus, à 80 jours de cette même culture, il n'apparaît plus de différences significatives entre les 5 concentrations par rapport aux matières sèches. Dans la seconde culture, il apparaît que les concentrations de 0.005mM en sulfate présentent des résultats intermédiaires. Cette deuxième culture n'est pas terminée à l'heure actuelle.

La figure 9 présente l'évolution de la teneur en S des parties aériennes en fonction de l'âge des plantes. Ces courbes nous indiquent que la teneur en S augmente dans toutes les plantes jusqu'à 33 jours de croissance. Après cette date, cette teneur est stable pour les plantes

cultivées sur les concentrations fortes en sulfate, mais diminue pour les concentrations faibles (0.05mM) ou nulles (H=34.85 ; $p<0.001$).

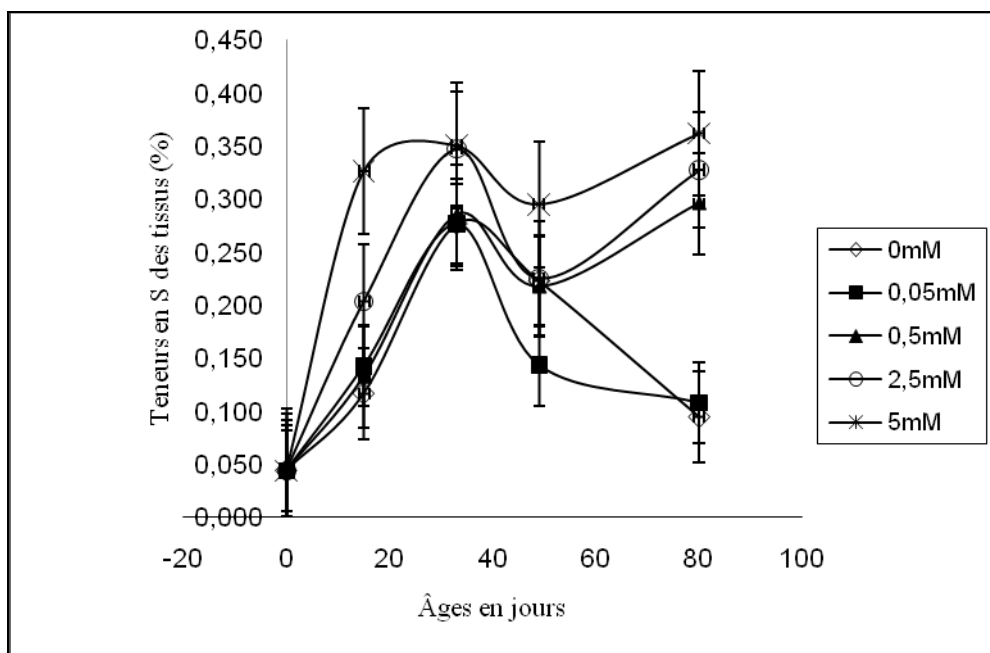


Figure 9. Evolution de la teneur en soufre des parties aériennes en fonction de l'âge des plantes. Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards.

La figure 10 qui représente la teneur en S des parties aériennes de ces dernières plantes en fonction de leur biomasse exprimée en grammes de matière sèche (MS), permet de mettre en évidence une dilution du S dans la biomasse des plantes cultivées sur 0 ou 0.05mM de S entre 33 et 80 jours de croissance. Il existe une relation logarithmique entre la teneur en S et la MS ($\%S = -0.0429 \ln(MS) + 0.2493$) de coefficient de corrélation ($R^2=0.77$; $p<0.001$).

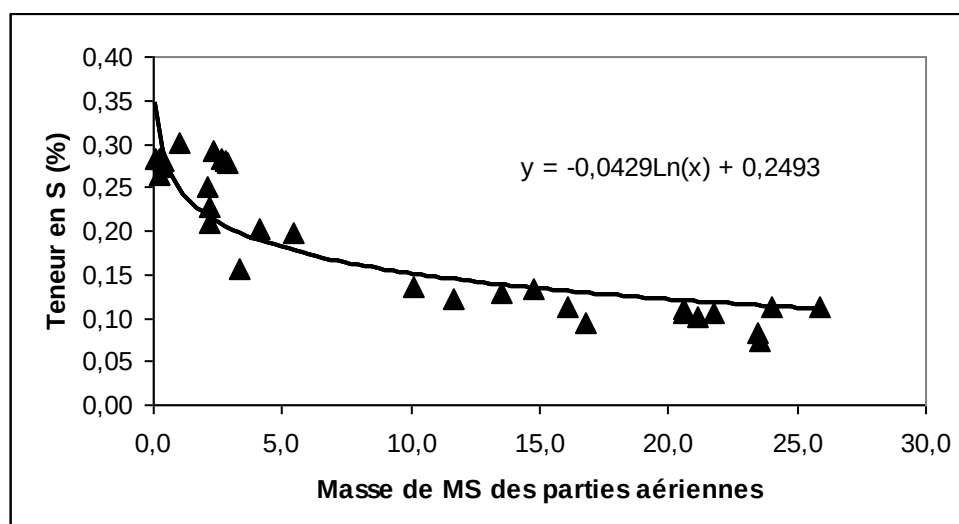


Figure 10. Représentation graphique de la teneur en S en fonction de la biomasse des parties aériennes. Chaque point représente une plante récoltée entre 33 jours et 80 jours, pour les deux concentrations faibles en sulfate de la solution nutritive (0 et 0,05 mM) lors de la culture 1.

3.2. Effet de la disponibilité en sulfate sur la teneur en ions des Parties aériennes et des Racines chez le ray-grass

Les teneurs en Sulfate, nitrate et phosphate des parties aériennes et racinaires de la récolte 4 (culture 1) sont présentées sur les figures 11 et 12.

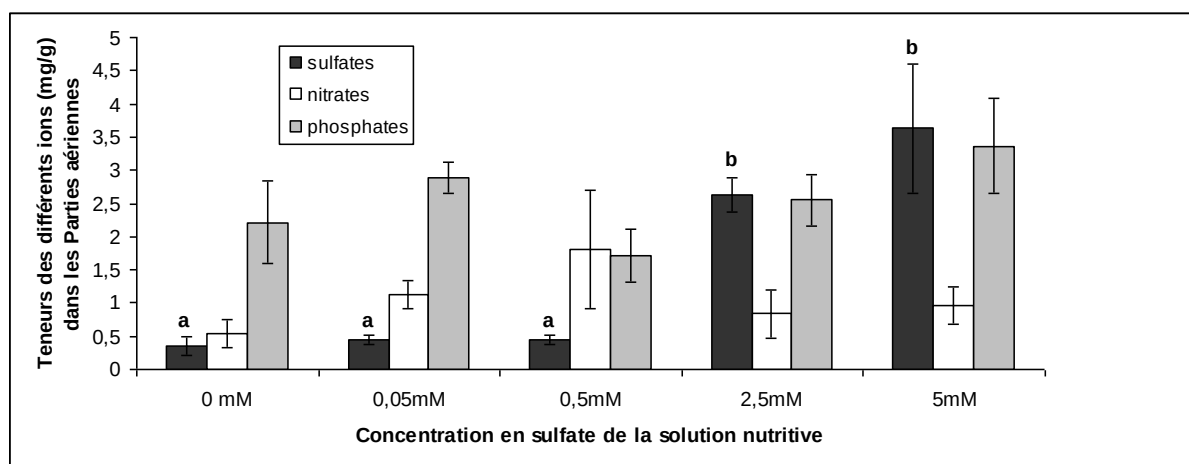


Figure 11. Teneurs en sulfate, nitrate et phosphate en fonction des concentrations en sulfate des solutions nutritives dans les parties aériennes de ray-grass. Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Deux teneurs en sulfate qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes. Aucune différence significative entre les traitements n'a été observée pour le nitrate et le phosphate.

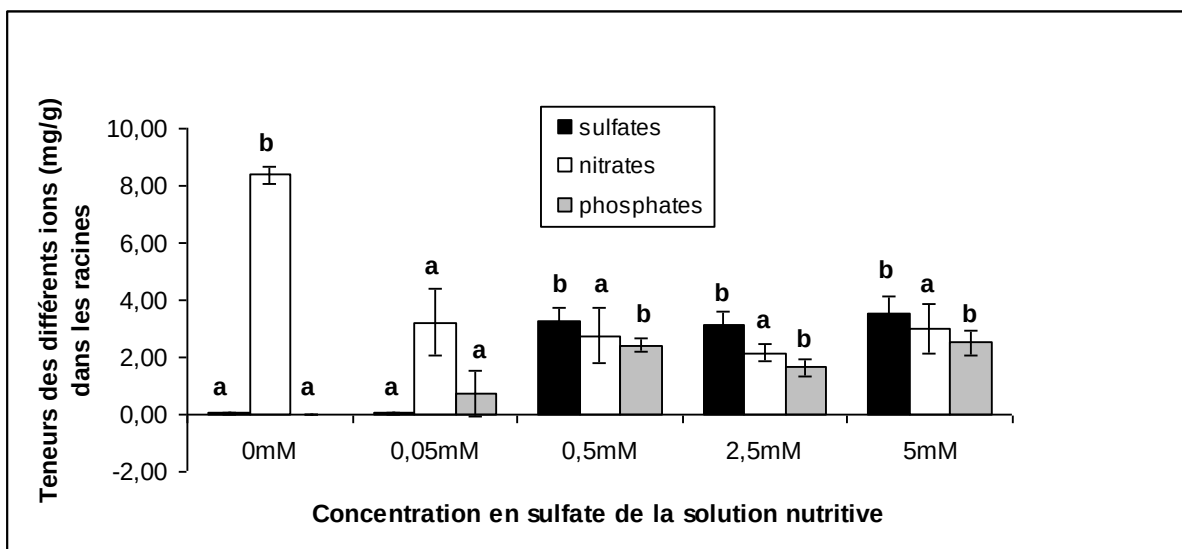


Figure 12. Teneurs en sulfate, nitrate, et phosphate en fonction des concentrations en sulfate des solutions nutritives dans les racines de ray-grass. Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Deux teneurs qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes pour un même anion.

Les parties aériennes des plantes cultivées sur de fortes concentrations en sulfate des solutions nutritives (2.5mM et 5mM) sont caractérisées par une forte accumulation de sulfate par rapport aux autres plantes ($H=17.37$; $p=0.002$). Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en sulfate des solutions nutritives ne modifie pas les teneurs en nitrate et phosphate dans les parties aériennes.

Dans les racines, l'accumulation de sulfate est observée pour les 3 fortes concentrations en sulfate des solutions nutritives. A l'inverse, les racines cultivées sur une concentration nulle en sulfate, accumulent plus de nitrate que les autres ($H=12.21$; $p=0.016$). Parallèlement, la teneur en phosphate est significativement plus basse (quasiment nulle) pour les solutions nutritives contenant 0mM de sulfate, que dans les autres concentrations ($H=13.27$; $p=0.010$).

3.3 Effet de la disponibilité en sulfate sur l'indice des chlorophylles et des polyphénols

Afin de rechercher la relation existant entre la disponibilité en sulfate et leurs teneurs en chlorophylles des feuilles, des mesures ont été faites au quarante-sixième jour de la seconde culture. Dans un premier temps, les chlorophylles ont été mesurées à l'aide d'un SPAD 502, les teneurs en chlorophylles variaient entre 0.6 et 38.5 (exprimées en index SPAD) et se trouvent être dépendantes de la disponibilité en sulfate du substrat ($H=25.55$;

$p < 0.001$). En effet plus la disponibilité en sulfate est grande, plus les feuilles contiendront de la chlorophylle comme l'indique la figure 13.

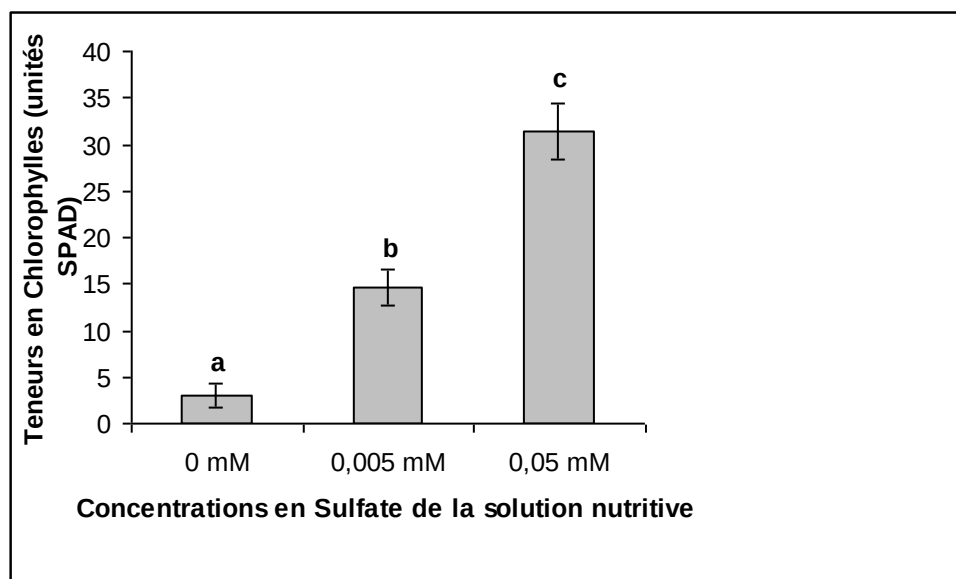


Figure 13. Mesures des teneurs en chlorophylles de ray-grass en fonction des différentes concentrations en sulfate des solutions nutritives de la 2^{ème} culture à 46 jours à l'aide d'un SPAD 502. Chaque point représente la moyenne de 5 répétitions indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Deux teneurs qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

Les pigments foliaires ont également été mesurés par fluorescence au quarante-septième jour de la culture 2 à l'aide d'un multiplex 3 (figure 14). Ces mesures, (contrairement à celles effectuées avec le SPAD qui portaient sur la mesure de la quantité de lumière passant à travers une dizaine de feuilles pour chaque plante) ont été faites sur les plantes entière et confirment l'augmentation de la teneur en chlorophylle en fonction de l'augmentation de la teneur en sulfate dans les différentes concentrations. Ainsi, les plantes ayant reçu les concentrations à 0.05mM de sulfate, ont un indice de chlorophylle plus élevé que pour les deux autres concentrations ($H=40.16$; $p < 0.001$). Il en est de même pour l'indice de bilan azoté (NBI « Nitrogen Balance Index ») (représentant le rapport chlorophylles/ flavonoïdes) ($H=34.76$; $p < 0.001$). A l'inverse, il apparaît que la teneur en flavonoïdes est plus élevée dans les plantes ayant reçu les concentrations 0mM et 0.005mM par rapport aux plantes ayant reçu la concentration 0.05mM ($H=14.12$; $p=0.001$). La teneur en anthocyanes est également significativement plus élevée chez les plantes ayant reçu les concentrations 0mM et 0.005mM de sulfate dans leurs solutions nutritives que dans les plantes qui en ont reçu 0.05mM ($H=22.58$; $p < 0.001$).

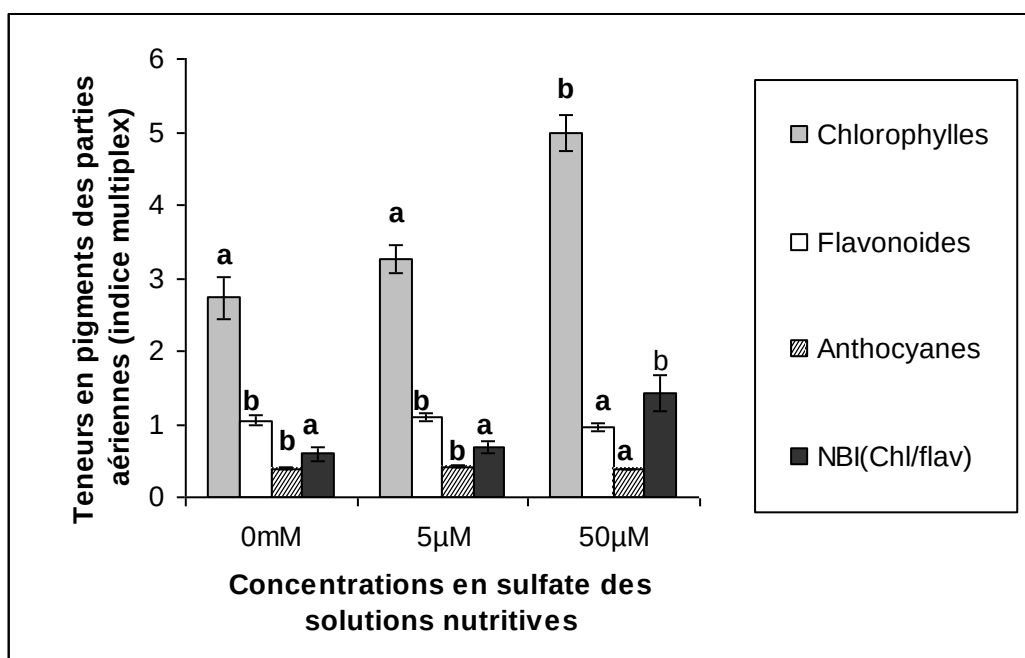


Figure 14. Mesures des teneurs en pigments foliaires dans les parties aériennes de ray-grass de la 2^{ème} culture à 47 jours en fonction des différents traitements en soufre à l'aide d'un multiplex 3. Les barres représentent les erreurs standards, Deux teneurs qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes pour un même pigment.

4. DISCUSSION :

Le S, en tant que macroélément, est indispensable au développement de la plante. Une déficience en S a pour conséquence directe de réduire la synthèse de protéines et a par conséquent un impact sur le fonctionnement de la plante entière. (Varin, 2008). Le travail effectué lors de ce stage a donc permis de mettre en évidence d'une part un effet direct du S sur la croissance du ray-grass, cette dernière étant modulée par la concentration en sulfate du substrat, et d'autre part son effet indirect via l'acquisition de l'azote.

Les différentes analyses effectuées révèlent une forte sensibilité du ray-grass à la disponibilité en sulfate des solutions nutritives, comme cela a déjà été démontré dans des expérimentations de croissance en pot chez cette même espèce (Tallec, 2008). Ainsi, dès 15 jours de croissance, on observe une biomasse 7 fois supérieure chez les ray-grass cultivés en présence de sulfate que chez les ray-grass totalement privés de cet élément. Cependant, une concentration de 0.05mM en sulfate dans les solutions nutritives semble suffire pour obtenir une croissance équivalente à celle des concentrations plus élevées dans la 1^{ère} culture, puisque l'on n'observe pas de différence de croissance pour des concentrations comprises entre 0.05mM et 5mM en sulfate dans la solution. Dans la seconde culture, un niveau intermédiaire a donc été ajouté entre 0mM et 0.05mM afin de rechercher la concentration en sulfate minimum pour une croissance suffisante du ray-grass. Les analyses de la seconde culture ne sont pas encore totalement achevées, mais nos premiers résultats montrent que la concentration de 0.005mM ne permet pas d'obtenir une croissance équivalente à 0.05 mM. D'autres Poacées prairiales, mais également des Fabacées ont également montré une forte sensibilité à la disponibilité en S (Gilbert *et al.*, 1984 ; Tallec, 2008).

De plus, l'examen de la courbe de croissance de la première culture, montre que la disponibilité en sulfate ne modifie pas la taille finale des plantes de ray-grass, mais qu'une faible disponibilité en cet élément, provoque un retard de croissance. En effet , la biomasse des plantes cultivées sur 0mM en sulfate est plus faible que les autres pour les 3 premières récoltes, mais n'est pas significativement différente pour 80 jours de culture. Ainsi, contrairement à ce qui a été observé pour le trèfle (Varin, 2009), la disponibilité en sulfate ne joue pas sur la plasticité phénotypique (mêmes phénotypes produits), mais sur la plasticité ontogénique (retard de croissance).

Ce travail, a également permis de préciser les relations qui lient croissance et accumulation de S chez le ray-grass. Alors que la teneur en S reste stable entre 33 et 80 jours de croissance chez les plantes cultivées sur des concentrations fortes en sulfate, elle diminue

chez les plantes cultivées sur des concentrations faibles. Le graphique qui représente la teneur en S des parties aériennes de ces plantes (0mM et 0.05 mM) en fonction de leur biomasse (courbe de dilution du S en fonction de la croissance) (figure 10), révèle ainsi une corrélation entre la teneur en S et la production de biomasse ($R^2 = 0.77$, $p < 0.001$). On remarque aussi, que l'augmentation de la concentration en sulfate de la solution nutritive augmente beaucoup plus la biomasse produite que la teneur en S des tissus. Cette représentation suggère donc que le S pourrait se comporter chez le ray-grass comme l'azote (Gastal et Lemaire, 2002). Cette représentation est utilisée pour déterminer la teneur critique en azote, c'est-à-dire la teneur minimale pour laquelle la production maximale est observée. Les analyses en S de la deuxième culture seront nécessaires pour déterminer la teneur minimale en S dans les tissus pour permettre une production de biomasse optimale. On peut donc de la même manière, déterminer la teneur critique en S, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre les relations entre nutrition azotée-soufrée et production des cultures par exemple.

Le fait que cette baisse de la teneur en S ne soit pas observée pour les concentrations en sulfates supérieures à 0.05 mM dans la solution nutritive, alors que la croissance n'est pas stimulée, suggère à ce niveau l'existence d'une consommation de luxe chez le ray-grass. Cette hypothèse est également supportée par la forte accumulation de sulfate observée dans les racines pour les concentrations de 0.5mM ; 2.5mM et 5mM, ainsi que dans les parties aériennes pour les concentrations de 2.5mM et 5mM de sulfate dans les solutions nutritives.

L'analyse des teneurs en pigments confirme l'existence d'un lien important entre la nutrition soufrée et la nutrition azotée. Ainsi, un rapport N/S optimal a été défini par Dijkshoon et Van Wijk (1967) fixé à environ 40 :1 pour la croissance des légumineuses, permettant de démontrer en accord avec de nombreuses études (Dijkshoon et Van Wijk, 1967 ; Scherer et Lange, 1996 ; Zhao *et al.*, 1999), qu'une diminution de l'apport en Sulfate entraîne une augmentation du rapport N/S et une diminution de l'acquisition de l'N par absorption d'N soluble ou fixation de l'N atmosphérique.

La chlorophylle est considérée comme étant un bon indicateur de l'état de nutrition azotée chez les plantes (Brassard, 2007), en raison du besoin en molécules azotées pour sa synthèse (Bilger *et al.*, 1997). L'augmentation de la disponibilité en sulfate des solutions nutritives, augmente significativement la teneur en pigments chlorophylliens et réduit la teneur en flavonoïdes et anthocyanes, confirmant le déséquilibre dans les voies de synthèse des pigments foliaires. Ces résultats vont dans le sens des nombreux travaux qui montrent le lien entre soufre et photosynthèse (Gilbert *et al.*, 1997).

5. CONCLUSION & PERSPECTIVES :

Cette étude fait apparaître que la croissance du ray-grass est fortement dépendante de la disponibilité en S du substrat. Cependant, la faible disponibilité en sulfate ne modifie pas la taille finale des plantes de ray-grass, mais provoque un retard de croissance. Ceci montre que la disponibilité en sulfate ne joue pas sur la plasticité phénotypique du ray-grass mais sur sa plasticité ontogénique

De plus, le fait qu'au-delà d'une certaine concentration en sulfate, l'accumulation de ce dernier dans les tissus ne provoque plus de croissance supplémentaire, suggère l'existence d'une consommation de luxe chez cette poacée.

Ce travail a également permis de préciser les relations qui lient croissance et accumulation de S chez cette espèce, révélant ainsi une corrélation entre la teneur en S et la production de biomasse. Cette relation permettant directement de mettre en évidence l'existence d'une teneur critique en S chez le ray-grass à savoir, la teneur minimale en S dans les tissus pour permettre une production de biomasse optimale.

L'expérimentation a également révélé un impact du S sur les teneurs en pigments foliaires, provoquant un déséquilibre dans leurs voies de synthèse, et confirmant ainsi, le lien étroit qui existe entre nutrition soufrée et nutrition azotée ainsi que l'implication du S dans les processus de photosynthèses.

A l'issue de ce travail, différentes perspectives peuvent être proposées. Le ray-grass est une Poacée prairiale qui cohabite et entre en compétition avec d'autres Poacées mais également des dicotylédones dans les prairies. La méthodologie mise au point dans ce travail pourra être appliquée pour préciser les exigences en S de différentes espèces prairiales. La comparaison avec les teneurs des plantes cultivées en plein champ permettra de préciser les interactions compétitives entre les espèces et de déterminer si l'oligotrophisation en S des sols pourrait entraîner des modifications de la composition spécifique des prairies.

Références Bibliographiques

- ❖ **Bilger W, Veit M, Schreiber L, Schreiber U (1997).** Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiol Plant* 101: 754-763
- ❖ **Brassard M. (2007).** Développement d'outils diagnostiques de la nutrition azotée du maïs-grain pour une gestion optimale de l'engrais azoté. Université Laval Québec, 106 p.
- ❖ **Derome J, Nieminen T, Saarsalmi A. (2004).** Sulphur dioxide absorption in Scots pine canopies exposed to high ammonia emissions near a Cu-Ni smelter in SW Finland. *Environmental Pollution* 129, 79-88.
- ❖ **Dijkshoorn W, Van Wijk AL. (1967).** The sulphur requirements of plants as evidenced by the sulphur nitrogen ratio in the organic matter. A review of published data. *Plant and Soil* 26, 129-157.
- ❖ **Dwyer, L.M., A.M. Anderson, B.L. Ma, D.W. Stewart, M. Tollenaar et E. Gregorich. (1994).** Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. *Can. J. Plant Sci.* 75: 179-182.
- ❖ **Falk KL; Tokuhisa J; Gershenzon J. (2007).** The effect of sulphur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9, 573-581 [GER227]
- ❖ **Gastal F, Lemaire G. (2002).** N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of experimental Botany* 53, 789-799.
- ❖ **Gilbert MA, Robson AD. (1984).** The effect of sulfur supply on the root characteristics of subterranean clover and annual ryegrass. *Plant and Soil* 77, 377-380.
- ❖ **Gilbert S.M., Clarkson D.T., Cambridge M., Lambers H., Hawkesford M.J. (1997).** SO_4^{2-} deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-Biphosphate carboxylase / oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. *Plant Physiol.* 115: 1231-1239.

- ❖ **Heller M. (1984).** Physiologie végétale. Tome II. Développement, Masson, Paris, 20pp.
- ❖ **Hopkins WG. (2003)** Physiologie végétale.
- ❖ **Lange A., Scherer H.W. (2001).** Effect of sulphur nutrition on the activity of nitrogenase and enzymes of the C- and N- metabolism of *Vicia faba* minor and *Pisum sativum*. Proc. 4th ESA Congress, Veldhoven-Wageningen, The Netherlands, pp 568-659. In : Scherer HW. (2001). Sulphur in crop production – invited paper. European Journal of Agronomy 14, 81-111.
- ❖ **Malcolm DC, Garforth MF. (1977).** The sulphur: nitrogen ratio of conifer foliage in relation to atmospheric pollution with sulphur dioxide. Plant and Soil 47, 89-102.
- ❖ **Mann ME, Bradley RS, Malcolm K., Hughes MK. (1998).** Global-scale temperature patterns and climate forcing over the past six centuries. Nature 392, 779-787.
- ❖ **Maruyama-Nakashita A., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Yamaya T., Takahashi H. (2003).** Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. Plant Physiol. 132: 597-605
- ❖ **Miflin BJ, Lea PJ. (1990).** *The biochemistry of plants*. Vol. 16. *Intermediary nitrogen metabolism*. USA: Academic Press
- ❖ **Morot-Gaudry, J.-F. (1997).** Sources et cycle de l'azote. Dans : Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. J.-F. Morot-Gaudry (Ed.).INRA éditions. Paris, France, pp. 355-356.
- ❖ **Mortenson L.E., Thornley R.N.F. (1979).** Structure and function of nitrogenase. Ann Rev Biochem 48: 387-418
- ❖ **Paul D, G Skrzypek, Fórizs I (2007).** Normalisation de mesurer les compositions isotopiques stables et l'isotope échelles de référence - un examen. *Rapid Commun. Spectrom* messe. 21 (18): 3006-14 *Phyton* 32, 119-122.
- ❖ **Piekielek et Fox,(1992).** Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize . Agron.J.84:59-65.
- ❖ **Prosser I.M., Purves J.V, Saker L.R.,Clarkson D.T. (2001).** Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. Journal of Experimental Botany. 52: 113-121.

- ❖ **Rausch T, Wachter A. (2005).** Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* 10: 503-509
- ❖ **Saito .K. (2004).** Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road. *Plant Physiology* 136:2443-2450
- ❖ **Scherer HW. (2001).** Sulphur in crop production-Invited paper. *European Journal of Agronomy* 14, 81-111.
- ❖ **Schnug E, Evans EJ. (1992).** Monitoring of the sulphur supply of agricultural crops in Northern Europe.
- ❖ **Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith F.W., Blake-Kalff M., Hawkesford M.J., Saito K. (2000).** The roles of three functional sulfate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 23, 171-182.
- ❖ **Taltec T. (2008).** 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. Thèse de Doctorat, Université de Caen Basse Normandie, Caen, 167 pages.
- ❖ **Townsend, A. (1995).** Encyclopaedia of Analytical Science Encyclopaedia of Analytical Science.
- ❖ **Varin S. (2009).** Plasticité fonctionnelle du trèfle blanc en réponse à la disponibilité en soufre. Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie/ Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée/ Thèse de l'université de Caen, 137 p.
- ❖ **Victoria J. Nikiforova, et al., (2004).** Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* 2004 55(404):1861-1870; doi:10.1093/jxb/erh177
- ❖ **Zhao F.J., Wood A.P., McGrath S.P. (1999).** Effects of sulphur nutrition on growth and nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and soil* 212, 209-219.

