



HAL
open science

Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation du soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge

Mickaël Cregut

► To cite this version:

Mickaël Cregut. Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation du soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Français. NNT : 2009INPL025N . tel-01748716

HAL Id: tel-01748716

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748716v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale RP2E

UMR INPL(ENSAIA)-INRA 1121 Agronomie et Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL
En Sciences Agronomiques

Par

Mickaël CREGUT

**Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée
dans la minéralisation du soufre organique dans les
rhizosphères de colza et d'orge**

Soutenue publiquement le 27 Mai 2009, devant le jury composé de :

M. Alain BRAUMAN	Directeur de Recherches, IRD, Montpellier	Rapporteur
M. Georges BARBIER	Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest	Rapporteur
M. Laurent PHILIPPOT	Directeur de Recherches, INRA, Dijon	Examinateur
M. Jean-Marie MACHET	Ingénieur de Recherches, INRA, Laon- Reims- Mons	Examinateur
M. Luc CHAMPOLIVIER	Ingénieur au CETIOM, Toulouse	Examinateur
Mlle Séverine PIUTTI	Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinatrice
M. Emile BENIZRI	Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinateur

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés à l'UMR Agronomie et Environnement INPL-ENSAIA-INRA de Nancy. Je tiens à exprimer, au travers de ces quelques lignes, toute ma reconnaissance envers les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail.

Je tiens avant tout à exprimer toute ma gratitude envers Mademoiselle **Séverine Piutti**, Maître de Conférences, et Monsieur **Emile Benizri**, Professeur à l'ENSAIA, qui m'ont offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Je les remercie notamment pour le temps qu'ils m'ont consacré notamment pour la lecture du manuscrit, des articles en préparation, ainsi que pour les conseils avisés qu'ils m'ont prodigués.

Je voudrais vivement remercier les chercheurs qui ont participé au jury de cette thèse : Monsieur **Alain Brauman**, Directeur de Recherches de l'IRD de Montpellier, Monsieur **Georges Barbier**, Professeur de l'Université Européenne de Bretagne, Monsieur **Jean Marie Mchet**, Ingénieur de Recherches de l'INRA à Laon et Monsieur **Luc Champolivier**, Ingénieur du CETIOM à Toulouse. Enfin, je tiens tout particulièrement à adresser mes sincères remerciements à Monsieur **Laurent Philippot**, Directeur de Recherches de l'INRA de Dijon, pour m'avoir donné le goût de la recherche en Master 2 et pour son accueil au cours de mes différentes missions effectuées au CMSE de l'INRA.

Je voudrais également remercier les chercheurs qui ont participé au comité de pilotage de cette thèse : Madame **Sylvie Recous**, Directeur de Recherches de l'INRA à Reims, Monsieur **Yvan Moenne-Loccoz**, Professeur de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Monsieur **Fabrice Martin-Laurent**, Directeur de Recherches de l'INRA de Dijon, Monsieur **Xavier Pinochet**, Ingénieur du CETIOM à Toulouse et Monsieur **Alain Hehn**, Maître de Conférences à l'ENSAIA.

Je tiens à présenter toute ma sympathie et ma reconnaissance pour les bons moments passés en salle de pause, en salle de manip, dans la « thésards-vallée » et en extérieur à **Isabelle Crovisier**, **Sonia Henry**, **Marion Devers**, **Camille Bénard**, **Flore Biteau**, **Sissi Miguel**, **Martine Callier**, **Lama Hamdan**, **Emmanuelle Personeni**, **Etienne Gaujour**, **Romain Larbat**, **P'tit Ben**, **Benoît Mignard**, **µSeb**, **Moyen Seb** (Sébastien Goujon), **Grand Seb** (Sébastien Doerper), **Christophe Dambreville**, **Alexandre Olry** ...

Merci aussi à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à mes recherches au travers de discussions et de leur soutien : **Sophie Slezack-Deschaumes** et **Phuy-Chhoy Vong**, sans oublier **Thamara Olivier**.

Je voudrais également remercier les absents du jour de ma soutenance : Madame **Stéphanie Hallet**, Technicienne de l'INRA à Dijon, Monsieur **Fabrice Martin-Laurent**, Directeur de Recherches, Monsieur **Christophe Mougel**, Chargé de Recherches et Monsieur **David Bru**, Assistant Ingénieur de l'INRA à Dijon. Merci, à vous tous, qui avaient également contribué à ma formation.

Enfin, un grand merci à **mes parents** et à **ma famille**, pour leur soutien sans faille et continu.

Angélique, je ne t'oublie pas !

Sommaire

Contexte général.....	9
Chapitre 1.	13
1. La rhizosphère.....	15
1.1. Définition de la rhizosphère.....	15
1.2. Nature et classification des rhizodépôts.....	15
1.3. Rôles des rhizodépôts sur la microflore rhizosphérique.....	17
1.4. Impacts des rhizodépôts sur les cycles des éléments minéraux.....	18
2. Le Soufre.....	20
2.1. Contexte Agronomique.....	20
2.2. Entrées et sorties de S dans les sols.....	21
2.3. Les Carences en soufre au sein des cultures.....	22
2.4. Le soufre dans le sol.....	24
2.5. La dynamique du soufre.....	26
3. Le métabolisme soufré chez les bactéries.....	29
3.1. Assimilation du soufre par les microorganismes.....	29
3.2. Le métabolisme soufré chez les bactéries en situation de carences en sources de soufre directement assimilables.....	32
4. Les différentes formes de soufre organique et leur assimilation chez les bactéries.....	35
4.1. Les différentes formes de soufre du sol assimilées par les microorganismes.....	35
4.2. Les enzymes microbiennes impliquées dans la dégradation des sources de soufre organique du sol.....	36
4.3. L'arylsulfatase enzyme clef du cycle du soufre ?.....	41
4.4. La régulation des arylsulfatases.....	43
5. Références bibliographiques.....	50
Chapitre 2.	69
Résumé.....	71
Mots-clefs.....	71
1. Introduction.....	73
2. Matériel et Méthodes.....	74
2.1. Prélèvements et Sol.....	74
2.2. Extraction et purification de l'ADN de sol.....	76
2.3. Quantification du gène de l'ARNr 16S par PCR en temps réel.....	76
2.4. Analyse de la structure génétique des communautés bactériennes par A-RISA.....	78
3. Résultats et discussion.....	79
3.1. Estimation de la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique sous couvert de colza et d'orge.....	79
3.2. Evolution de la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique sous couvert d'orge et de colza.....	83
4. Références bibliographiques.....	89
Chapitre 3.	95
Chapitre 3-1. Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate.....	97
Résumé.....	99
Mots -clefs.....	99
1. Introduction.....	101
2. Matériel et Méthodes.....	102
3. Résultats et discussion.....	104

4. Références bibliographiques	107
Chapitre 3-2. Densité, structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza.....	111
Résumé.....	113
Mots-clefs.....	113
1. Introduction	115
2. Matériel et Méthodes.....	116
2.1. Prélèvements du sol rhizosphérique.....	116
2.2. L'activité arylsulfatase	118
2.3. Caractérisation de la densité, de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle	118
2.4. Analyses statistiques	120
3. Résultats	120
3.1. Taille et activité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable	120
3.2. Structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle.....	121
4. Discussion	125
4.1 Evolution de l'activité ARS et de la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable.....	126
4.2 Evolution de la structure et de la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable	128
5. Références bibliographiques	130
Chapitre 4.	139
Résumé.....	141
Mots-clefs.....	141
1. Introduction	143
2. Matériel et méthodes	145
2.1. Conditions d'induction de l'arylsulfatase selon la nature de S présent dans le milieu de culture	145
2.2.2. Compartimentation de l'activité arylsulfatase et induction selon la disponibilité en sulfates.....	147
2.3. Analyses statistiques	149
3. Résultats	150
3.1. Croissance bactérienne et activité arylsulfatase	150
3.2. Compartimentation et induction de l'activité arylsulfatase.....	153
4. Discussion	155
4.1. Croissance bactérienne et activité arylsulfatase	155
4.2. Compartimentation de l'activité arylsulfatase.....	157
4.3. L'effet répresseur du sulfate sur l'activité arylsulfatase.....	157
5. Conclusion.....	158
6. Références Bibliographiques.....	159
Chapitre 5.	165
Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, <i>atsA</i> , et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate	167
Résumé.....	169
Mots-clefs.....	169
1. Introduction	170
2. Matériel et méthodes	171
2.1. Isolement et caractérisation des souches bactériennes isolées des rhizosphères d'orge et de colza.....	171

2.2. Extraction de l'ADN des souches bactériennes	173
2.3. Amplification du gène <i>atsA</i>	173
2.4. Analyse phylogénétique	175
2.5. Numéros d'entrée dans la GenBank des séquences nucléotidiques.....	176
3. Résultats	176
3.1. Amplification et caractérisation du gène <i>atsA</i> codant l'arylsulfatase	176
3.2. Diversité de séquences du gène <i>atsA</i>	180
4. Discussion	186
4.1. Méthodologie et amplification PCR.....	186
4.2. Diversité du gène <i>atsA</i>	187
5. Conclusion.....	188
6. Références bibliographiques	189
Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire	193
Résumé	195
Mots-clefs.....	195
1. Introduction	197
2. Matériel et Méthodes.....	198
2.1. Echantillonnage de sol	198
2.2. Extraction de l'ADN de sol rhizosphérique	198
2.3. Amplification d'un fragment du gène <i>atsA</i> codant l'unité catalytique de l'arylsulfatase	200
2.4. Analyse statistique.....	201
2.5. Analyse phylogénétique	202
2.6. Numéros d'entrée dans la GenBank des séquences nucléotidiques.....	202
3. Résultats et discussion.....	202
3.1. Amplification par PCR d' <i>atsA</i> sous couvert de colza et d'orge.....	202
3.2. Structure et diversité de la communauté fonctionnelle	202
3.3. Etude de diversité des séquences arylsulfatases obtenues	207
4. Conclusion.....	209
5. Références bibliographiques	209
Chapitre 6.	215
1. Discussion générale.....	217
2. Perspectives.....	225
3. Références bibliographiques	227
Chapitre 7.	235
Annexes.....	269

Contexte général

Contexte général

Depuis une trentaine d'année, l'élément soufre est devenu un des éléments les plus limitants pour la croissance des cultures. En effet, de nombreux facteurs comme les nouvelles pratiques de gestion des sols et la limitation des pollutions anthropiques ont entraîné une limitation du retour du soufre dans le sol. Ainsi, le bilan soufré des sols est devenu déficitaire, au fil des ans. Dans ce sens, des carences en soufre au sein des cultures apparaissent de plus en plus fréquemment et plus particulièrement en Europe de l'Ouest. Ces carences en soufre affectent prioritairement les cultures qui possèdent de forts besoins en soufre telles les crucifères et notamment le colza.

Chez les crucifères, comme le colza, particulièrement exigeantes en cet élément, le soufre est un élément important : (i) il a un rôle essentiel sur la croissance et le développement des végétaux, mais est aussi impliqué dans la résistance des plantes vis-à-vis des organismes pathogènes (sulfur induced resistance) (Bloem *et al.*, 2005), (ii) d'un point de vue santé publique, ces plantes accumulent des métabolites secondaires soufrés, de type glucosinolates, ayant des activités anti-cancérogènes (Rouzaud *et al.*, 2003). Or l'accumulation de ces composés est d'autant plus importante que la nutrition soufrée n'est pas limitante. (Zhao *et al.*, 1997).

La forme de soufre majoritaire dans le sol est une forme organique indisponible pour la nutrition soufrée des plantes. Dans ce sens, l'intervention de la microflore est essentielle pour assurer la minéralisation du soufre organique et sa transformation en sulfates bio disponibles. Le taux annuel de minéralisation du soufre organique est très variable et dépend des conditions pédo-climatiques. Ainsi, l'estimation, dans le sol, de la réserve de soufre organique ne suffit pas pour déterminer la part potentiellement disponible pour les plantes *via* le processus de minéralisation.

Ainsi, il apparaît important et nécessaire de comprendre et de quantifier les flux nets de soufre issus des processus de minéralisation et d'immobilisation et son turn-over dans les sols. Ces processus étant liés à la microflore tellurique, l'objectif global de ma thèse est de caractériser la communauté microbienne fonctionnelle impliquée dans le processus de minéralisation du soufre organique en sulfate, au sein d'environnements rhizosphériques de plantes présentant des demandes en S contrastées.

Ces travaux auront donc pour objectifs d'une part, de caractériser plus précisément la communauté bactérienne fonctionnelle impliquée dans la minéralisation du S organique dans les sols. D'autre part, nous développerons des outils permettant de caractériser cette communauté fonctionnelle. Afin de mieux comprendre les flux de minéralisation du S organique, nous étudierons le processus de régulation de la demande en soufre au sein de microorganismes. Enfin, nous comparerons la structure génétiques de ces communautés bactériennes fonctionnelles issues de la rhizosphère de plantes présentant des demandes en soufre contrastées et une rhizodéposition différente.

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. La rhizosphère

1.1. Définition de la rhizosphère

La rhizosphère, terme employé pour la première fois en 1904 par Hiltner, correspond à la zone du sol soumise à l'influence des racines vivantes.

Les composantes physico-chimiques et biologiques de la rhizosphère diffèrent nettement de celles d'un sol non cultivé (Bowen et Rovira, 1999 ; Miah *et al.*, 2000). Les racines elles-mêmes, par leur développement, induisent mécaniquement des modifications structurales telles que la compaction du sol à leur proximité et par conséquent une diminution de sa porosité (Foster et Bowen, 1982 ; Whiteley et Dexter, 1984 ; Young, 1998). Par ailleurs, la libération dans le sol de mucilage, substance organique gélatineuse sécrétée principalement par les apex racinaires (Rovira, 1969), permet d'augmenter la stabilité des agrégats (Helal et Sauerbeck, 1989 ; Morel *et al.*, 1991 ; Traoré *et al.*, 2000).

Les propriétés biologiques du sol

Les études portant sur les communautés microbiennes montrent une augmentation de leur taille à proximité des racines. Ce phénomène est communément désigné sous le terme « d'effet rhizosphère » (Katznelson, 1965 cité dans Krafczyk *et al.*, 1984 ; Lynch et Whipps, 1990 ; Merbach *et al.*, 1999) et peut être apprécié par le calcul du rapport R/S (nombre de microorganismes dans la rhizosphère/nombre de microorganismes dans le sol non rhizosphérique). Les valeurs communément citées dans la littérature pour les bactéries fluctuent entre 10 et 100 (Martin, 1978) mais peuvent exceptionnellement atteindre des valeurs proches de 1000 (Sands et Rovira, 1971 ; Foster, 1985 ; Davet, 1996). Cette prolifération microbienne s'explique par l'enrichissement du sol rhizosphérique en carbone organique. En effet, le processus de rhizodéposition et plus particulièrement l'exsudation de composés solubles tels que des sucres, des acides organiques et des acides aminés, constituent une source de carbone et d'énergie directement utilisable par les microorganismes (Warembourg, 1975 ; Meharg et Killham, 1988 ; Whipps, 1990 ; Xu et Juma, 1993 ; Bowen et Rovira, 1999).

1.2. Nature et classification des rhizodépôts

L'origine des rhizodépôts est photosynthétique. En effet, une partie des photoassimilats est allouée au système racinaire pour sa croissance et sa maintenance (Curl et Truelove, 1986). Mais une partie de ce flux carboné est directement libérée dans le sol à la suite du processus

qu'est la rhizodéposition (Whipps, 1990). La rhizodéposition peut notamment être évaluée par l'intermédiaire du traceur isotopique ^{14}C (Warembourg, 1975 ; Martin, 1977 ; Nguyen *et al.*, 1999). D'après Helal et Sauerbeck (1989), 22 % du carbone fixé au niveau des feuilles d'un plant de maïs sont libérés dans le sol sous forme de CO_2 (18 %) et de corps microbiens (4 %).

Différents types de rhizodépôts peuvent être considérés :

- les exsudats : ce sont des molécules hydrosolubles de faibles poids moléculaires émises dans le sol, sans dépense énergétique. Cette diffusion passive s'effectue selon un gradient de concentration. Les sites de libération sont présents sur l'ensemble des racines, au niveau des parois et au niveau des jonctions cellulaires. Ces exsudats regroupent essentiellement des sucres, des acides organiques et des acides aminés. Enfin, des vitamines comme les vitamines B1, B2, B6, la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine, la niacine et l'acide pantothénique pour le maïs (Schönwitz et Ziegler, 1982, 1989) et certaines hormones (Lynch et Whipps, 1990) peuvent également être exsudés,

- les sécrétions : ce sont des molécules de hauts comme de faibles poids moléculaires libérées dans le sol grâce à des processus actifs. Les composés identifiés peuvent être des enzymes telles que des invertases, des cellobiases, des phosphatases et des nucléases pour le maïs (Chang et Bandurski, 1964). Les sécrétions comprennent également des enzymes très spécifiques telles que l'enzyme dégradant l'acide 2-chlorobenzoïque pour le riz (Siciliano *et al.*, 1998) ainsi que des glucides polymérisés (Lynch et Whipps, 1990),

- le mucilage : le mucilage, d'aspect gélatineux, est surtout produit aux apex racinaires suite à l'exocytose de vésicules golgiennes issues des dictyosomes (Morre *et al.*, 1967 ; Jones et Morre, 1973 ; Guckert *et al.*, 1975) et est également détecté au niveau des poils absorbants (Uren, 1993). La production du mucilage est particulièrement intense au niveau des racines primaires et latérales (Oades, 1977). En conditions naturelles, le mucilage végétal est associé à des particules du sol, aux corps et aux mucilages microbiens si bien que le gel résultant est appelé mucigel et son épaisseur peut atteindre $10\mu\text{m}$ (Guckert *et al.*, 1975). Le mucilage est constitué en grande partie par des polysaccharides de poids moléculaire élevé et se présente sous la forme d'un réseau fibrillaire et granuleux (Greaves et Darbyshire, 1972 ; Bacic *et al.*, 1987 ; Knee *et al.*, 2001). La nature des polysaccharides est dominée par le fucose, le galactose, le glucose et l'arabinose (Harris et Northcote, 1970 ; Foster, 1982). Au sein du mucilage, les acides glucuroniques et galacturoniques ainsi que le mannose et le xylose sont aussi détectés. Floyd et Ohlrogge (1970) ont également mis en évidence la présence de l'acide uronique et d'enzymes telles que l'ATPase et la phosphatase acide.

- les lysats : les lysats sont constitués des produits d'autolyse de cellules épidermiques sénescents et desquamés. La dégradation microbienne des parois permet par ailleurs de libérer le contenu cytoplasmique de ces cellules. Rovira (1973) remarque au niveau du système racinaire du blé que la lyse bactérienne des parois cellulaires végétales est suivie par une colonisation dense de ces cellules,
- les gaz : les racines libèrent des composés volatils tels que le CO₂, l'éthylène (hormone végétale), le propylène, des alcools (éthanol, méthanol) et des aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, propionaldéhyde) qui peuvent influencer à distance la germination de spores fongiques (Mol, 1995 ; Prescott *et al.*, 1999).

1.3. Rôles des rhizodépôts sur la microflore rhizosphérique

La croissance microbienne, dans le sol, est principalement limitée par le carbone (Wardle, 1992). Or, dans le sol, il existe différentes sources de carbone et en particulier celles d'origine végétale (matières végétales mortes et rhizodépôts). En effet, les débris racinaires, le mucilage et les exsudats représentent les plus importantes sources de matière organique apportée au sol (Whipps et Lynch, 1983 ; Helal et Sauerbeck, 1986 ; Wheatley *et al.*, 1990). Norton et Firestone (1991) ont mis en évidence une stimulation de l'activité des bactéries avec 57 % des cellules bactériennes actives, dans la rhizosphère d'une espèce de pin (*Pinus ponderosa* L.), alors que seulement 41 % des cellules bactériennes étaient actives dans le sol nu environnant. Ainsi, la rhizosphère représente un environnement unique stimulant la croissance et l'activité des microorganismes (Klein *et al.*, 1988 ; Grayston *et al.*, 1998 ; Merbach *et al.*, 1999 ; Benizri *et al.*, 2002, 2007), du fait de la libération, par les plantes, d'un ensemble de composés carbonés et azotés (Duineveld *et al.*, 1998, 2001 ; Baudoin *et al.*, 2003). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence et ont quantifié l'impact de différentes espèces végétales sur la composition des communautés microbiennes rhizosphériques (Di Giovanni *et al.*, 1999 ; Carelli *et al.*, 2000 ; Miethling *et al.*, 2000). Cet effet est variable suivant l'espèce végétale ou suivant les variétés considérées (Jones *et al.*, 2004) mais aussi suivant la rotation (Grayston *et al.*, 1998 ; Steer et Harris, 2000).

En outre, Paterson et Sim (1999, 2000) ont mis en évidence des variations temporelles de la rhizodéposition en lien avec l'âge des plantes, mais aussi suivant les conditions environnementales et les pratiques culturales. En conséquence, la taille mais aussi la structure des communautés microbiennes rhizosphériques sont modifiées suivant le stade de développement de la plante même s'il est fait état dans la littérature de relativement peu de données expérimentales sur ce sujet (Duineveld *et al.*, 1998 ; Yang et Crowley, 2000 ;

Baudoin *et al.*, 2002). Il ressort, néanmoins, que la plante, *via* sa rhizodéposition, constitue un effecteur majeur de la structure des communautés microbiennes telluriques (Marschner *et al.*, 2001 ; Alvey *et al.*, 2003) même si le type de sol apparaît lui aussi comme un élément structurant (Latour *et al.* 1996 ; Girvan *et al.*, 2003 ; de Ridder-Duine *et al.*, 2005 ; Nunan *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2007).

Quoiqu'il en soit, l'impact des rhizodépôts sur la structure des communautés microbiennes est indéniable et la libération de composés carbonés et azotés dans le sol pourrait même être à l'origine de la sélection de certains groupes microbiens (Grayston *et al.*, 1998 ; Duineveld *et al.*, 2001 ; Smalla *et al.*, 2001 ; Kowalchuk *et al.*, 2002 ; Kuske *et al.*, 2002 ; Grayston *et al.*, 2004 ; Costa *et al.*, 2006). De plus, il a été également montré que selon les zones considérées, situées à plus ou moins grande distance de la racine (endorhizosphère, rhizoplan et sol adhérent aux racines, sol non rhizosphérique), il était possible de distinguer des groupes bactériens spécifiques alors que certains autres genres apparaissaient ubiquistes (Marilley et Aragno, 1999). De même, la structure génétique et les aptitudes cataboliques des communautés bactériennes sont variables suivant la zone racinaire considérée, de la zone d'émergence des racines à leur apex (Baudoin *et al.*, 2002). La plupart de ces travaux ont concerné les communautés bactériennes rhizosphériques (Smalla *et al.*, 2001 ; Kowalchuk *et al.*, 2002 ; Nunan *et al.*, 2005), et/ou les communautés fongiques (Smit *et al.*, 2001 ; Marcial-Gomes *et al.*, 2003). Rares sont par contre les expérimentations qui ont cerné l'impact des espèces végétales et du type de sol sur les deux communautés microbiennes (champignons et bactéries), (Mougel *et al.*, 2006 ; Costa *et al.*, 2006).

Enfin, le lien entre fonction microbienne et effet rhizosphère demeure encore peu abordé dans la littérature. En effet, peu d'éléments sont actuellement disponibles quant à un effet rhizosphère stimulant spécifiquement ou non certaines activités microbiennes (Asmar *et al.*, 1995 ; Badalucco *et al.*, 1996). Toutefois, quelques travaux semblent mettre en évidence, outre une stimulation de la densité bactérienne, une augmentation des activités enzymatiques des microorganismes en lien avec la rhizodéposition (Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2003 ; Dedourge *et al.*, 2004 ; Vong *et al.*, 2004 ; Mounier *et al.*, 2004 ; Henry *et al.*, 2008).

1.4. Impacts des rhizodépôts sur les cycles des éléments minéraux

1.4.1. L'azote

Des études concernant le cycle de l'azote tendent à indiquer un rôle stimulant des rhizodépôts sur les activités microbiennes. Ainsi, Nguyen (2007) a montré que l'apport de rhizodépôts au sol stimule l'immobilisation de l'azote par la microflore tellurique. Cet apport induit

également une accélération de la vitesse de minéralisation de l'azote. Par ailleurs, selon le type de rhizodépôts (mucilage ou exsudats), il est observé des réponses différentes de la biomasse microbienne du sol : l'apport d'exsudats induit une immobilisation plus rapide de l'azote par rapport au mucilage. Ce résultat tend à souligner l'importance de la nature du carbone apporté sur la modulation des activités de la biomasse microbienne.

De la même façon, Henry *et al.*, (2008) ont mis en évidence une stimulation de deux activités enzymatiques de la respiration des nitrates (les activités nitrates réductrices et dénitrifiantes) suite à l'apport d'exsudats racinaires synthétiques à un sol nu. Il ressort de ces travaux des activités nitrates réductrices et dénitrifiantes différentes selon qu'il y ait eu apport ou non d'éléments carbonés au sol. Par ailleurs, ces auteurs mettent également en évidence, selon la nature du carbone apportés au sol, une structuration différente des communautés bactériennes nitrates réductrices et dénitrifiantes. Ainsi, cet apport de carbone, sous la forme d'exsudats artificiels, semble stimuler des activités spécifiques, liées au cycle de l'azote, comme la respiration des nitrates ou la dénitrification.

1.4.2. Le soufre

Les travaux portant sur le cycle du soufre (S) ont mis également en évidence la stimulation de certaines activités enzymatiques en lien avec le turn-over de ce cycle biogéochimique au niveau de la rhizosphère. Ainsi, Vong *et al.*, (2007_b) ont montré que l'activité arylsulfatase est stimulée dans l'environnement rhizosphérique comparé à un sol nu. Par conséquent, la rhizodéposition de la plante, et notamment celle du colza, stimulerait les activités de la biomasse microbienne impliquée dans la minéralisation du S (Vong *et al.*, 2008). En effet, un apport de C important augmente le ratio C/S et corrélativement est à l'origine d'une diminution de la concentration (relative) en S disponible dans le sol. En conséquence, il semblerait que cette diminution relative du S stimulerait les activités microbiennes de minéralisation du soufre organique dans les sols afin de satisfaire les besoins en soufre des microorganismes. Par ailleurs, les travaux de Dedourge *et al.* (2004), portant sur l'étude du turn-over du S, mettent en évidence une réponse variable des phénomènes de minéralisation et d'immobilisation du S lorsque des rhizodépôts étaient apportés à un sol nu, avec ou sans cystéine. Ainsi, ces auteurs ont observé une stimulation du turn-over du cycle du S quand la cystéine n'était pas présente dans les rhizodépôts apportés au sol. A l'inverse, la présence de cystéine induisait une diminution de l'immobilisation du S organique total. Ces résultats suggèrent ainsi que les microorganismes utilisent prioritairement la cystéine qui est apportée au sol plutôt que les sources de S organique présentes dans le sol. En effet, l'apport de C,

contenu dans les rhizodépôts, stimule la biomasse et les activités microbiennes comme la respiration et induit une augmentation du ratio C/S des microorganismes telluriques à l'origine d'une limitation du S. Ainsi, cette diminution relative du S disponible induit alors la synthèse d'enzymes permettant la libération de sulfate à partir du S contenu dans la matière organique du sol. Dans ce sens, Dedourge *et al.* (2004) ont observé une corrélation positive entre l'activité arylsulfatase et l'immobilisation du sulfate dans les cellules bactériennes lorsque la cystéine n'était pas apportée au sol. Ainsi, les microorganismes sont à même de synthétiser certaines enzymes afin de satisfaire leur besoin en S, en absence d'un substrat soufré disponible.

2. Le Soufre

2.1. Contexte Agronomique

Le soufre est le 10^{ème} élément le plus abondant de l'univers et le 5^{ème} par son poids. Par ailleurs, le soufre est le 5^{ème} constituant des êtres vivants et est essentiel à tous les organismes. L'élément soufre est un élément commun du sol et est retrouvé naturellement dans le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dans le schiste sous forme de pyrite (FeS_2), dans le charbon, dans le grès et dans la chaux. Sous sa forme élémentaire, S^0 , le soufre peut être retrouvé dans de nombreux types de sol et dans l'humus marin (Stevenson et Cole, 2005).

Chez les êtres vivants, le soufre a une fonction plastique car il peut être intégré dans certaines protéines et certains polysaccharides. Il est également un composé essentiel de certaines vitamines et hormones. Au sein du monde végétal, la chaîne photosynthétique est constituée de cytochromes possédant des liaisons Fe-S qui sont impliquées dans le transfert des électrons entre le photosystème 2 (PS2) et le photosystème 1 (PS1). Par ailleurs, l'absence de soufre empêche la synthèse protéique et notamment la synthèse d'enzymes impliquées dans la synthèse de chlorophylles. En outre, comme pour l'ensemble des êtres vivants, chez les plantes, le soufre intervient dans la synthèse d'acides aminés tels, la cystéine et la méthionine. Enfin, le soufre a également un rôle catalytique puisqu'il intervient dans l'activation des enzymes protéolytiques et dans la synthèse de certaines vitamines. Il est également un constituant de première importance dans le métabolisme où les fonctions soufre ont un rôle d'activateur des réactions d'oxydoréduction.

Chez les crucifères, comme le colza, plantes particulièrement exigeantes en cet élément, le soufre est un élément particulièrement important. En effet, en plus de son rôle essentiel pour la croissance et le développement de la plante, le soufre montre un effet physiologique majeur

vis-à-vis la résistance de la plante face aux organismes pathogènes (sulfur induced resistance) (Bloem *et al.*, 2005). En effet, les crucifères accumulent au cours de leur développement des métabolites secondaires soufrés, les glucosinolates, connus pour leurs effets antagonistes sur certains organismes pathogènes. Ces molécules sont, de plus, susceptibles d'être hydrolysées par la microflore intestinale en isothiocyanates, molécules à activités anti-cancérogènes (Rouzaud *et al.*, 2003).

Si le soufre est essentiel pour les végétaux, ces derniers assimilent cet élément majoritairement sous sa forme minérale (sulfates) alors que dans le sol la majeure partie des composés soufrés est stockée sous des formes organiques, non disponibles pour les organismes supérieurs (Fitzgerald, 1978 ; Watwood *et al.*, 1986 ; Autry et Fitzgerald, 1990).

2.2. Entrées et sorties de S dans les sols

Les principaux réservoirs en soufre sur la planète sont la lithosphère et l'hydrosphère. Par ailleurs, les teneurs en soufre dans le sol sont modérées et c'est dans l'atmosphère qu'elles sont les plus faibles (Stevenson et Cole, 2005). Bien que les teneurs en soufre des sols soient modérées, elles sont en réalité très variables et dépendent de facteurs abiotiques comme la température, l'humidité et les caractéristiques physico-chimiques du sol (Tabatabai, 1984). En effet, les valeurs estimées du soufre total varie de moins 20 mg S kg⁻¹ de sol, pour les sols sableux, à plus de 600 mg S kg⁻¹ de sol dans les sols argileux. Dans les sols cultivés, Stevenson et Cole (2005) rapportent des teneurs moyennes se situant entre 224 et 1120 kg de S ha⁻¹. Ainsi, pour les sols français cultivés, il est possible de distinguer trois catégories de sols suivant leurs teneurs en S (Simon-Sylvestre, 1969) : (i) les sols à faibles teneurs en S (< 100 mg de S kg⁻¹ de sol) pour les sols acides développés sur les massifs cristallins, les sols sableux, les alluvions légers et les sols généralement pauvres en matière organique, (ii) les sols à teneurs moyennes en S (< 250 mg de S kg⁻¹ de sol mais > à 100 mg de S kg⁻¹ de sol) pour les sols limoneux à pH proche de la neutralité (iii) les sols à teneurs élevées en S (> 400 mg de S kg⁻¹ de sol) qui sont typiquement des sols argilo-calcaires. Toutefois, la part de soufre minéral disponible dans ces sols est estimée entre 1 et 10 % du soufre total (Tabatabai, 1984 ; Tabatabai, 1996 ; Stevenson et Cole, 2005). Ainsi, la part minérale libre, seule forme assimilable par les plantes, peut être estimée entre de 10 mg à 40 mg de S kg⁻¹ de sol pour les sols cultivés en France (Simon-Sylvestre, 1969).

2.2.1. Les entrées

Par dépositions atmosphériques, l'apport de soufre aux sols agricoles est estimé entre 2 et 20

kg de S ha⁻¹ an⁻¹ suivant les régions du globe.

Les apports de soufre minéral issus de différents processus chimiques et/ou biologiques d'altération minérale de la roche mère et de minéralisation de l'humus sont estimés entre 0 à 5 kg de S ha⁻¹ an⁻¹.

Enfin, les apports par les fertilisants minéraux sont estimés en moyenne à 22 kg de S ha⁻¹ an⁻¹ (pour la France). Ceux issus de l'épandage d'effluents d'élevage sont quant à eux estimés à 80 kg de S ha⁻¹ an⁻¹. Néanmoins, l'épandage en France ne concerne que 15 % des surfaces cultivées.

2.2.2. Les sorties

La moyenne des besoins des plantes est estimée de 10 à 50 kg de S ha⁻¹ an⁻¹. La moyenne des exportations des cultures est de 5 à 20 kg de S ha⁻¹ an⁻¹ du soufre de ces sols. Les animaux quant à eux prélèveraient de 0 à 5 kg de S ha⁻¹ an⁻¹. Enfin, la lixiviation du soufre, suivant le type de sol, s'échelonne entre 0 et 75 kg de S ha⁻¹ an⁻¹ et la part retirée par les émissions volatiles reste encore inconnue.

Ainsi, le soufre sous sa forme minérale (le sulfate) représente la forme majoritairement assimilée par les organismes vivants. Toutefois, cette forme minérale est un anion et est donc fortement sujet au lessivage. En conséquence, les teneurs en soufre des sols sont très variables et peuvent conduire à des cas de carences pour les cultures, ceci plus particulièrement dans les sols européens qui sont parmi les plus pauvres en soufre minéral.

2.3. Les Carences en soufre au sein des cultures

Des déficiences en soufre ont été observées depuis une trentaine d'années sur certaines cultures, notamment les crucifères et les céréales (Photographie 1).



Photographie 1 : Mise en évidence de déficiences en soufre chez une culture de blé (Zhao et al., 2001)

La première cause de limitation en soufre est due à la réduction des dépositions de dioxyde de soufre (SO_2) atmosphérique (Figure 1). Dans un souci de limiter la pollution atmosphérique, la déclaration d'intention de Rio et le protocole de Kyoto ont participé de manière significative à la limitation des retombées en soufre libre générées par les industries et la combustion des produits d'origine pétrolière. Toutefois, cet apport en soufre contribuerait encore à 50 % des besoins en soufre des cultures. La seconde cause de limitation en soufre des sols agricoles provient du développement des nouvelles générations d'intrants N, P, K, Mg, s'orientant dans une logique de production de matières synthétiques, qui contiennent moins de soufre libre (Sommer *et al.*, 1986 ; Kauka, 1993). Or, en plus d'une limitation des entrées de soufre sur les cultures, les nouvelles variétés commercialisées sont plus productives et nécessitent plus d'engrais, en particulier soufrés, pour assurer leur croissance et leur développement. Enfin, l'agriculture intensive a tendance à appauvrir les sols en matières organiques. Cette diminution de la matière organique induit alors une limitation du pool potentiel de soufre organique pouvant être minéralisé par les microorganismes telluriques. Tous ces facteurs contribuent ainsi, en partie, à favoriser l'apparition de carences en soufre chez les plantes.

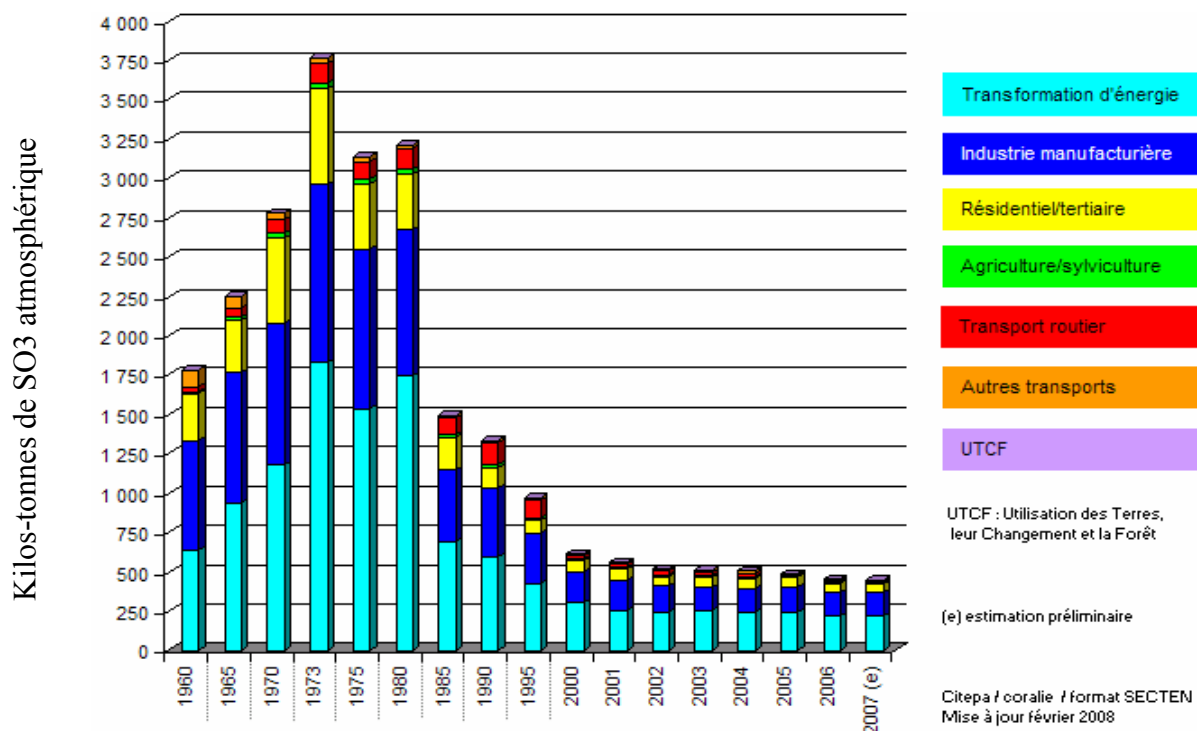


Figure 1 : Emissions de SO_2 dans l'air en France métropolitaine (CITEPA, 2008)

L'apparition de ces phénomènes de carences dans les cultures a conduit de nombreux scientifiques à engager des travaux sur la compréhension de la dynamique du soufre dans les sols (Tabatabai et Bremner, 1970_{a,b} Cooper, 1972 ; Castellano et Dick, 1991 ; Kandeler *et al.*, 1996 ; Freeman *et al.*, 1996 ; Deng et Tabatabai, 1997 ; Tscherko et Kandeler, 1997; Klose *et al.*, 1999 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2007_{a,b}).

2.4. Le soufre dans le sol

Il convient de distinguer deux formes de soufre dans le sol : la forme minérale et la forme organique (Tableau 1).

Teneur en S	0,02-0,2 % (en sol tourbeux 1%)	
Formes minérales de S	Sulfide (-2)	↓ dépendant du potentiel redox
(entre parenthèses le chiffre d'oxydation)	S élémentaire (0)	
	Thiosulfate (+2)	
	Sulfite (+4)	
	Sulfate (+6)	
Formes organiques de S	60-95% dans l'horizon A	
Sulfate soluble dans l'eau	< 10 mg S/kg	
Absorption de S par les plantes	très largement sous forme de SO_4^{2-}	
	55% de la tranche de sol 0-20cm	
	45% du sous-sol	

Tableau 1 : Situation du soufre dans le sol (Vis et Goujard, 2005)

2.4.1. La forme minérale

Le soufre minéral est majoritairement constitué de sulfates, SO_4^{2-} , dont la rétention dans le sol dépend essentiellement de la texture du sol et de la pluviométrie. Les sulfates constituent la forme majoritaire de soufre assimilable par le système racinaire. De plus, ils peuvent être retrouvés sous forme de sels solubles dans la solution du sol ou adsorbés au complexe argilo-humique ou sur certains hydroxydes métalliques (Maynard *et al.*, 1984). Néanmoins, il existe d'autres formes de soufre minéral : les formes du soufre non sulfatées (les sulfures, les thiosulfates, les polythionates et le soufre élémentaire) qui ne sont pas directement assimilables par les plantes. La forme minérale représente moins de 10 % du soufre total dans les sols.

2.4.2. La forme organique

Selon Tabatabai (1984), 90 à 95 % du soufre, dans le sol, sont stockés sous une forme organique. Cette forme prédominante de soufre reste indisponible pour les organismes supérieurs (Tabatabai, 1984) et est liée directement ou non à un atome de carbone (liaison C-S ou C-O/N-S).

Ainsi, deux types de composés organiques soufrés peuvent être distingués :

- le soufre organique directement reliés à un atome de carbone (C-S).

Ce groupe représente 26 % du soufre organique total, dont 10 % sont principalement constitués par la méthionine et la cystéine. Le pool d'acides aminés soufrés (constitué de cystéine et de méthionine) résulte de l'activité microbienne (Scherer, 2001). Ce groupe de composés, chez lesquels le soufre est directement lié à un atome de carbone, est également constitué de protéines soufrées, de sulfonates, de composés hétérocycliques, de glutathion, de certaines coenzymes, d'antibiotiques et de vitamines (Stewart et Bettany, 1982).

- le soufre organique non directement lié à un atome de carbone.

Ce groupe comprend principalement les esters de sulfate liés au carbone par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène ou d'azote (-C-O-S et -C-N-S (aussi appelés sulfamates)). Il représente de 27 à 78 % du soufre total des sols (Stewart et Bettany, 1982). Dans les sols forestiers, ce sont les sulfamates (-C-N-S) et les sulfonates (-C-S) qui sont majoritairement présents. Par contre, dans les sols agricoles se sont les esters de sulfate de type (-C-O-S) qui sont majoritaires (Watwood *et al.*, 1986 ; Autry et Fitzgerald, 1990 ; Tschërko et Kandeler, 1997).

La forme exacte des esters de sulfate n'est pas établie. Ainsi, les esters de sulfate comprendraient les arylsulfates et les polysaccharides sulfates de type choline sulfate, la chondroïtine sulfate et la kératine sulfate (Scherer, 2001). Ce groupe est considéré comme la fraction la plus labile et la plus active dans les processus biologiques (Freney *et al.*, 1975). Selon Mc Laren *et al.* (1985), les esters de sulfate représentent une source de soufre rapidement disponible pour la plante, après transformation, du fait de leurs fortes labilités.

Ainsi, la proportion des différentes formes de soufre est variable selon les écosystèmes, comme l'illustre la figure 2.

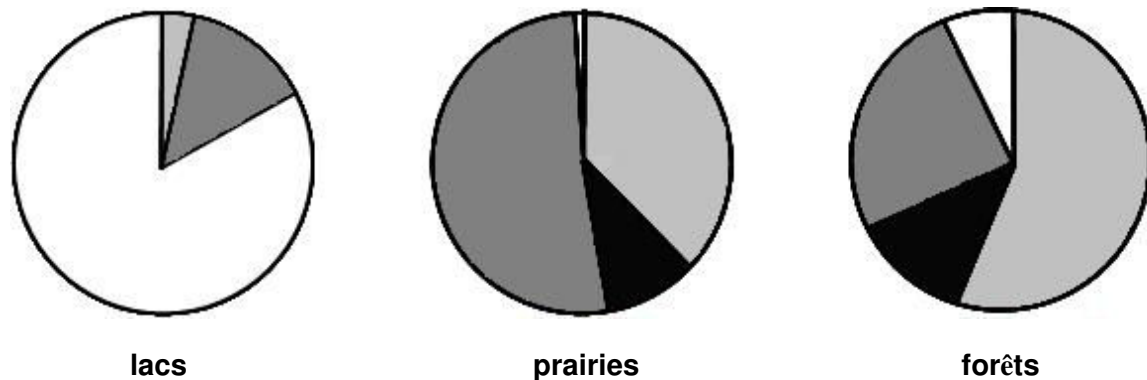


Figure 2 : Proportions des différentes formes de soufre dans les lacs (David et Mitchell, 1985), les prairies (Watwood et al., 1986) et les sols forestiers (Autry et Fitzgerald, 1990), (sulfates : en blanc, sulfonates : en gris clair, esters de sulfate : en gris foncé, acides aminés soufrés : en noir. Dans le cas des lacs, les acides aminés et les sulfonates sont représentés en gris clair)

Les microorganismes jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques. En effet, ils sont aujourd'hui considérés comme les principaux catalyseurs des transformations entre les formes de soufre organique et minérales (Banerjee et Chapman, 1996). Ces transformations correspondent aux processus de minéralisation et d'immobilisation, essentiels dans le cycle interne du soufre. En outre, les différentes transformations que peut subir le soufre, sous l'action des microorganismes, sont interdépendantes des cycles biogéochimiques des autres éléments essentiels (carbone, azote, phosphore) (Stewart, 1984). Ainsi, les processus d'immobilisation et de minéralisation du soufre, qui se produisent simultanément dans le sol, possèdent une intensité dépendante de la demande envers les autres éléments (carbone, azote, phosphore), mais aussi sont sous l'influence des conditions pédo-climatiques et des propriétés physico-chimiques du milieu (Stewart et Bettany, 1982 ; Mc Laren *et al.*, 1985 ; Mc Donald *et al.*, 1995).

2.5. La dynamique du soufre

2.5.1. Le cycle biogéochimique du soufre

En 1974, Brady a proposé une représentation du cycle du soufre dans la biosphère (Figure 3). Il ressort que le soufre est réparti dans l'ensemble des compartiments et qu'il est retrouvé majoritairement sous forme de soufre (SO_2) gazeux dans l'atmosphère. Dans les sols et les environnements anaérobies, le soufre est sous forme de sulfide d'hydrogène (H_2S). Dans les sols aérobies, le soufre minéral peut être converti en sulfates (SO_4^{2-}) puis être utilisé par les plantes et les microorganismes. Ce soufre peut alors être assimilé sous une forme organique comme la cystéine et la méthionine dans les protéines ou être utilisé directement pour la

synthèse de polysaccharides. Quand ces composés organiques soufrés ou les résidus de cultures et les effluents d'élevage retournent au sol, ils sont dégradés par l'activité microbienne pour donner soit du soufre minéral, soit du soufre organique re-immobilisé dans les microorganismes ou dans le sol. En outre, les voies d'entrées du soufre dans le sol sont multiples. En effet, le soufre peut être apporté également par des engrais et amendements, par de nombreux produits phytosanitaires, par l'eau d'irrigation et les précipitations mais aussi par l'absorption de soufre gazeux issu de l'atmosphère (SO_2).

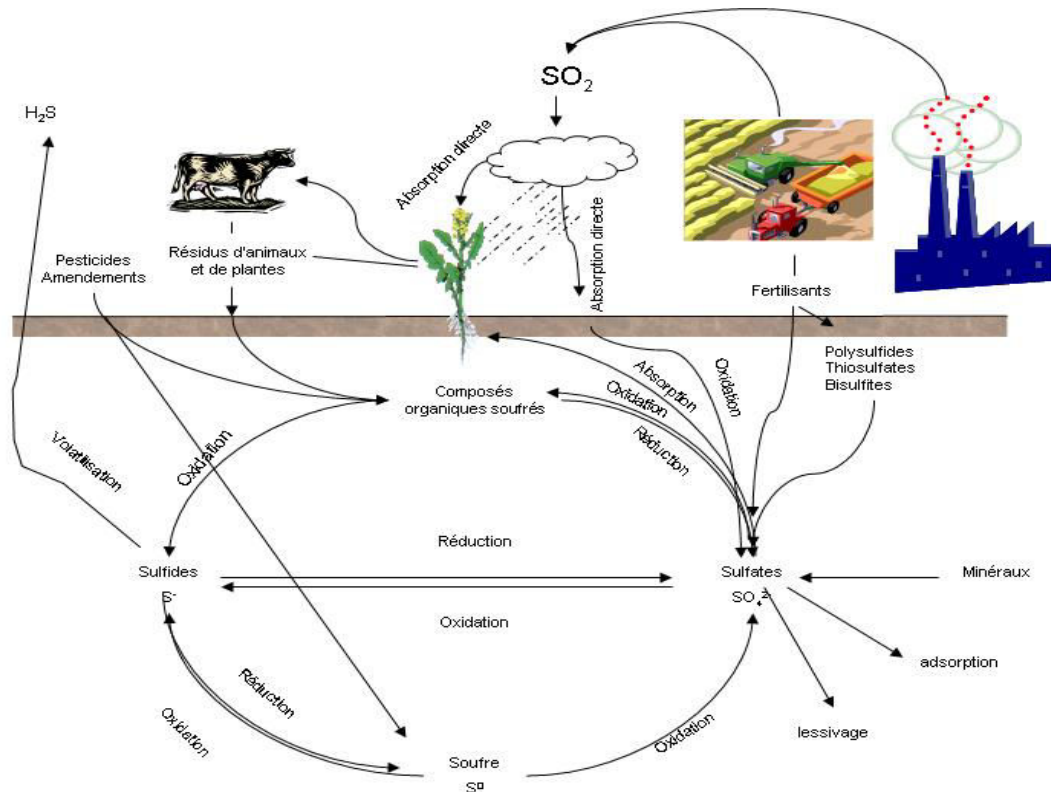


Figure 3 : Représentation du cycle du soufre dans le sol (Brady, 1974)

2.5.2. Rôle de la microflore dans le turn-over du soufre

Selon Mc Gill et Cole (1981), il existe deux processus de minéralisation du soufre : la minéralisation dite biologique et celle dite biochimique. Le processus biologique résulte d'une demande en carbone de la microflore afin de répondre aux besoins énergétiques des microorganismes. Cette minéralisation est donc dépendante de la taille et de l'activité de la biomasse de la microflore totale et concerne la fraction organique stable (C-S) qui libère du soufre sous forme de sulfates par oxydation. La deuxième voie, dite voie de minéralisation biochimique, résulte d'une demande en sulfates des microorganismes et concerne la fraction du soufre organique la plus labile qui est hydrolysée par les sulfatases microbiennes. Dans ce cadre, l'enzyme la plus étudiée dans la littérature est l'arylsulfatase qui hydrolyse les esters de

sulfate en sulfate (Tabatabai et Bremner, 1970_b ; Tabatabai, 1984 ; 1994 ; Klose *et al.*, 1999 ; Elsgaard et Vinther, 2004 ; Vong *et al.*, 2004 ; Klose et Ajwa, 2004 ; Klose *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2006 ; Hojati et Nourbakhsh, 2006 ; Vong *et al.*, 2007_b).

Selon Zhao *et al.* (1996), ces deux voies de minéralisation ne sont pas toujours totalement séparées. En effet, plus la biomasse microbienne du sol est importante, plus les besoins en carbone sont importants et plus les sulfates deviennent limitants. Ainsi, les processus de minéralisation du soufre pourraient conduire en un approvisionnement en carbone et en soufre. Par ailleurs, la dynamique de minéralisation du soufre dans le sol semble corrélée au ratio C/S. Dans les sols, le ratio moyen est estimé généralement entre 85 à 250. Lorsque le ratio est en dessous de ces valeurs, la minéralisation est supérieure à l'immobilisation, et inversement l'immobilisation est plus importante lorsque le ratio est supérieur à ces valeurs (Stevenson et Cole ; 1999).

En ce qui concerne les microorganismes, ceux-ci ne représentent que de 1 à 3 % du soufre organique total du sol. Par ailleurs, leur ratio C/S est estimé entre 57 et 85 pour les bactéries et 180 à 230 pour les champignons (Saggar *et al.*, 1981 ; Wu *et al.*, 1994). Ainsi, les microorganismes, et plus particulièrement les bactéries, possèdent des besoins en S particulièrement élevé. En effet, la teneur en soufre contenue dans la biomasse bactérienne étant plus importante que dans celle du sol, les bactéries doivent participer de façon prépondérante au turn-over du S afin de maintenir un faible ratio C/S. Ainsi, afin de maintenir un ratio C/S plus faible que le ratio C/S présent dans le sol, les bactéries telluriques doivent chercher de nouvelles sources de sulfate et notamment à partir des formes de soufre organique. Par ailleurs, le pool de soufre au sein des bactéries est majoritairement présent sous forme de méthionine et de cystéine (Saggar *et al.*, 1981). Ainsi, lors de la lyse cellulaire, la bactérie libère de la méthionine et de la cystéine. Ces acides aminés soufrés font alors l'objet d'une compétition entre les différents microorganismes présent dans le sol mais également entre les microorganismes et la plante au niveau de la rhizosphère. Ainsi, malgré la faible teneur en soufre organique contenu dans les microorganismes, cette fraction du soufre est très labile et représente ainsi une composante clef du turn-over du soufre dans le sol.

Ainsi, plus la biomasse microbienne soufrée est importante, plus il y a de soufre disponible pour les plantes (Gupta et Germida, 1988). Ceci s'explique du fait de la vitesse du turn-over de la microflore. Par ailleurs, différentes études ont mis en évidence que la biomasse microbienne soufrée est corrélée positivement avec la biomasse microbienne carbonée (Saggar *et al.*, 1981 ; Chapman, 1987 ; Wu *et al.*, 1994). Gupta et Germida (1989) ont également mis en évidence que le soufre total contenu dans la biomasse microbienne était

également corrélé avec le taux de soufre extractible à l'eau chaude, les esters de sulfate, qui possèdent une liaison ester (de type C-O-S), et dont l'hydrolyse est aisément réalisée par la biomasse microbienne. Enfin, le soufre total contenu dans la biomasse microbienne est également positivement corrélé avec des activités enzymatiques microbiennes liées aux différents cycles biogéochimiques (Autry et Fitzgerald, 1991).

Chez les champignons, le soufre est prioritairement stocké sous forme d'esters de sulfate de type choline sulfate (Wu *et al.*, 1994). Ainsi, la choline sulfate après lyse du champignon, reste inaccessible aux organismes supérieurs avant son incorporation et/ou sa dégradation par les autres microorganismes.

En conclusion, la biomasse microbienne semble jouer un rôle primordial dans le turn-over du soufre mais également dans la nutrition soufrée des plantes au niveau de l'environnement rhizosphérique.

3. Le métabolisme soufré chez les bactéries

3.1. Assimilation du soufre par les microorganismes

3.1.1. L'assimilation du sulfate

Le sulfate pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs à localisation membranaire et/ou associés au périplasme. Ceci s'effectue à l'aide d'un transport actif et/ou passif (perméase). Deux enzymes sont impliquées dans ce mécanisme, l'ATP sulfurylase, catalysant la formation de l'adénosine phosphosulfate (APS), et une APS kinase, qui phosphoryle l'APS en PAPS (phosphoadénosine-phosphosulfate). Ces deux étapes d'activation s'effectuent en présence d'adénosine triphosphate (ATP). L'atome de soufre est dans un premier temps réduit en sulfite par une PAPS réductase. Puis, dans un second temps, la réduction du sulfite en sulfide est catalysée par une sulfite réductase en présence de NADPH₂. Une fois réduit en sulfide, le soufre est incorporé au niveau d'un squelette carboné qui servira d'intermédiaire pour la synthèse des acides aminés soufrés. La nature du squelette carboné diffère en fonction des organismes, ce qui conditionnera la nature du premier composé soufré synthétisé (un C₃ pour la cystéine ou un C₄ pour l'homocystéine).

3.1.2. La voie de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine

Chez la plupart des bactéries, la voie de biosynthèse de la cystéine, est le mécanisme prépondérant par lequel le soufre minéral est réduit en composés organiques (Figure 4). Chez

Escherichia coli, espèce pour laquelle la voie est bien caractérisée, la vingtaine de gènes impliqués dans ces étapes de réduction du sulfate est organisée en plusieurs opérons *cys* (Kredich, 1996). Chez cette bactérie, le premier composé organique soufré synthétisé dans la cellule est la cystéine dont le squelette carboné dérive de la sérine (C3). Cette réaction est catalysée par un complexe multienzymatique appelé cystéine synthase (composé d'une sérine acétyl transférase et une *O*-acétylsérine (thiol) lyase). Après cette étape, l'atome de soufre peut alors entrer dans le métabolisme cellulaire général, et en particulier dans la synthèse du précurseur soufré de la méthionine (l'homocystéine), *via* la voie de transulfuration (Saint-Girons *et al.*, 1988 ; Kredich, 1996). Toutefois, certaines bactéries ont la particularité de posséder une voie de sulfhydrylation directe, qui permet la synthèse d'homocystéine (C4) à partir d'un ester de l'homosérine et de sulfide. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, cette réaction est catalysée par une *O*-succinylhomosérine sulfhydrylase. Chez d'autres bactéries (*Brevibacterium flavum*, *Bacillus sphaericus* ou encore *Leptospira meyeri*), l'*O*-acétylhomosérine est le substrat C4 préférentiellement utilisé.

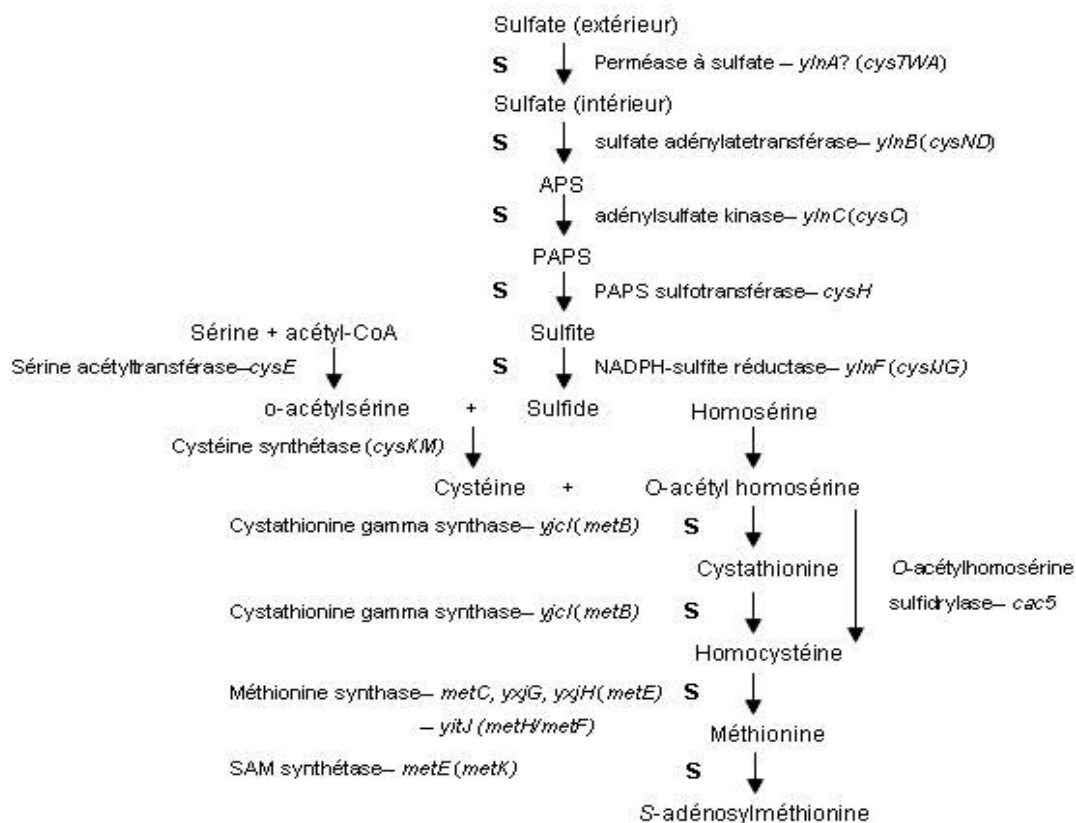


Figure 4 : Voie de l'assimilation et de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine. Les noms des enzymes sont suivis par les noms probables des gènes chez *Bacillus subtilis* ; les homologues chez *Escherichia coli* figurent entre parenthèses lorsqu'ils diffèrent. Les flèches nommées S représentent les gènes issus de la *S* box family (Grundy et Henkin, 1998)

Le régulon cystéine est réprimé en présence de cystéine ou d'une source de soufre directement utilisable pour la croissance de l'organisme. En effet, la plupart des gènes qui sont impliqués dans la synthèse de cystéine et ceux permettant l'assimilation d'autres formes de soufre comme la L-cystine, le thiosulfate et la taurine sont sous le contrôle du régulon cystéine (Quan *et al.*, 2002). Des expérimentations conduites *in vivo* par Kredich (1971) et Ostrowski et Kredich (1990) montrent, que la présence d'acétylsérine et des conditions limitantes en soufre sont nécessaires à l'activation du régulon cystéine. Par ailleurs, aux travers de plusieurs études réalisées en conditions *in vitro* avec *Salmonella typhimurium*, la régulation de l'assimilation du soufre a pu être clarifiée. Ainsi, le sulfide et le thiosulfate ont un effet inverse de l'acétylsérine sur l'initiation de la traduction de l'opéron *cys*. Dans ce sens, l'acétylsérine stimule la voie de biosynthèse de la cystéine (Ostrowski et Kredich, 1989 ; Ostrowski et Kredich, 1990 ; Hryniewicz et Kredich 1991) qui régule positivement la réduction du sulfate et du thiosulfate.

La voie de biosynthèse de la méthionine est encore peu connue chez les bactéries Gram+. Selon Grundy et Henkin (1998), chez *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum* et *Staphylococcus aureus*, les gènes impliqués dans les voies de biosynthèses de la méthionine et de la cystéine sont régulés par un système global de contrôle défini comme la S box régulon (Figure 4). En effet, la voie de la biosynthèse de la méthionine est exclusivement liée à celle de la cystéine (Figure 5). Chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* la traduction des gènes impliqués dans la synthèse de méthionine est stimulée par deux protéines CysB (également impliqué dans la voie de biosynthèse de la cystéine, Figure 5) (Iwanicka-Nowicka et Hryniewicz, 1995 ; Iwanicka-Nowicka *et al.*, 2007) et MetR. A ce sujet, l'activateur MetR, qui régule positivement la voie de biosynthèse de la méthionine, est lui même régulé négativement par la présence d'homocystéine (Urbanowski et Stauffer, 1987). En outre, deux composés sont connus pour réprimer la synthèse de méthionine : MetJ et la S-adénylméthionine (produit terminal de la voie de biosynthèse de la méthionine) (Saint-Girons *et al.*, 1988 ; Maxon *et al.*, 1989 ; Urbanowski et Stauffer, 1989 ; Weissbach et Brot, 1991 ; Mares *et al.*, 1992 ; Cowan *et al.*, 1993 ; Lorenz et Stauffer, 1996). Ainsi, ces nombreux régulateurs permettent une initiation de la synthèse de la méthionine uniquement lors d'une diminution du taux de méthionine ou des produits terminaux de la voie de biosynthèse de la méthionine (homocystéine, S-adénylméthionine et méthionine). Par ailleurs, la voie de biosynthèse de la méthionine est également directement sous le contrôle du régulon *cys*. Ainsi, la cellule peut contrôler son taux de S cellulaire qui est utilisé dans cette

voie de biosynthèse par rapport à celui utilisé dans la voie de biosynthèse de la cystéine. Dans ce sens, Dias et Weimer (1998) rapportent que l'activité cystathionine β -lyase (*metC*) est influencée par la concentration en cystéine et en méthionine dans le milieu de culture. De même, les travaux de Fernandez *et al.*, (2000 ; 2002) rapportent que la méthionine, la cystéine, le glutathion et l'O-acétyl-L-sérine régulent l'expression des gènes *metC* et *cysK* chez *Lactococcus lactis*.

En conclusion, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la cystéine et de la méthionine nécessite ainsi une régulation positive de la protéine régulatrice, produite par le gène *cysB*, la présence d'un inducteur (le N-acétyl-L-sérine), ainsi qu'une condition limitante en soufre (Kredich, 1996 ; Fernandez *et al.*, 2002).

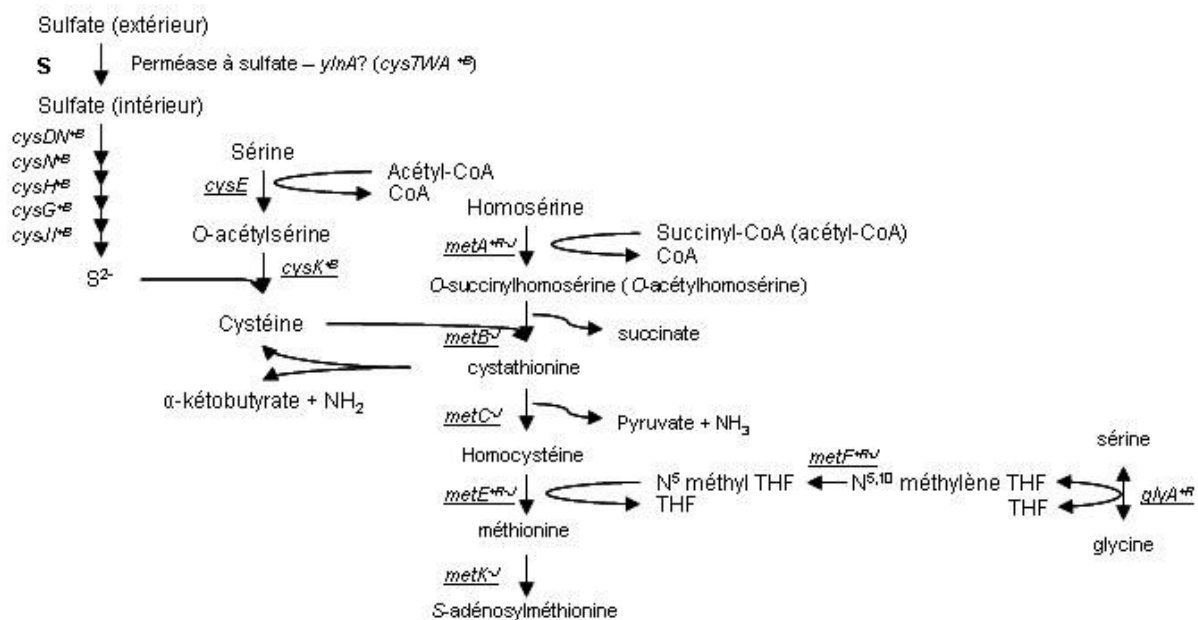


Figure 5 : Voie de la biosynthèse de la méthionine chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ; les homologues de ces gènes, chez *Bacillus subtilis*, sont soulignés. L'activation des gènes est provoquée par *CysB* (^{+B}) et *MetR* (^{+R}), alors que la répression de l'expression est exercée par *MetJ* (). Il est à noter que la conversion de la cystathionine en cystéine n'est pas décrite chez *Escherichia coli* CBL, ni chez *Salmonella typhimurium*, alors que cette réaction est obtenue *in vitro* chez *Bacillus subtilis* (Fernandez *et al.*, 2002)

3.2. Le métabolisme soufré chez les bactéries en situation de carences en sources de soufre directement assimilables

L'assimilation de soufre chez les microbes du sol a fait l'objet de récentes études notamment chez les bactéries. Ainsi, lorsque le substrat soufré préférentiellement utilisé devient limitant, certaines protéines sont synthétisées par les bactéries, afin de pallier au manque en sulfates nécessaires à la croissance bactérienne. Par des approches de protéomique, différents auteurs

ont pu identifier les protéines qui sont impliquées dans la régulation de la teneur en soufre intracellulaire (Kertesz *et al.*, 1993 ; Quadroni *et al.*, 1996 ; Hummerjohann *et al.*, 1998). Elles ont été définies comme les SSI protéines (Sulfate Starvation Induced protein). Ces SSI protéines sont retrouvées aussi bien chez les Gram+ que les Gram- mais leur nature diffère selon l'espèce bactérienne. Une étude réalisée par Kertesz *et al.* (1993) a permis de vérifier que l'expression de ces protéines était exclusivement liée à une limitation en sulfates de la cellule bactérienne. En effet, la voie de minéralisation du soufre organique est une composante principale de la régulation globale de la cystéine sous le contrôle du régulon *cys* (Kredich, 1992 ; Kredich, 1996). Par ailleurs, les différents travaux réalisés, sur ce sujet, suggèrent l'existence de 3 classes de SSI protéines, permettant à la cellule bactérienne de pourvoir ses besoins en soufre malgré une situation de carences en sulfates.

Ces SSI sont ainsi généralement regroupées en 3 catégories :

- les protéines qui sont impliquées dans le système de transport et la dégradation de différentes sources de soufre organique présentes dans l'environnement *i.e.* les esters de sulfate, les sulfonates, les alkylsulfates, les chondrosulfates, les myrosulfates. En outre, leur localisation est généralement périplasmique chez les protéobactéries (Filoux *et al.*, 1988 ; Wanner, 1996),
- les protéines synthétisées à partir de copies de gènes de ménage qui possèdent la même fonction et une conformation très similaires aux protéines initiales. Ces protéines sont synthétisées, lorsque le soufre minéral intracellulaire est limitant pour la croissance de l'organisme. Dans ce sens, ces protéines nouvellement synthétisées remplacent les premières qui sont importantes au maintien de l'intégrité du fonctionnement cellulaire. Néanmoins, ces protéines possèdent peu de groupements soufrés. En effet, un remaniement général des acides aminés soufrés dans ces protéines est observé. Ainsi, lorsque ces acides aminés soufrés n'ont pas un rôle critique dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle, ils sont remplacés par d'autres acides aminés non soufrés (Mazel et Marlière, 1989). Ainsi, peu de résidus cystéine et méthionine sont présents dans ces protéines ce qui permet à la cellule bactérienne de rester viable malgré une situation de carence en soufre minéral et une diminution de son taux de soufre total.
- les protéines impliquées dans la remobilisation du soufre intracellulaire. L'étude réalisée par Roberts *et al.* (1955) a montré chez *Escherichia coli*, une remobilisation des composés soufrés intracellulaires, quand le soufre est limitant, pour la cellule. Bien que, ce groupe de protéines soit peu connu, il est notamment constitué de sulfotransférases et de certaines sulfatases

comme la choline sulfatase qui permettent de libérer ou de remobiliser du sulfate à partir de protéines soufrées ou de polysaccharides de réserves (Kertesz, 1999).

Aujourd'hui encore, peu de ces protéines SSI ont déjà été caractérisées en terme de structure et de fonction. Néanmoins, celles impliquées dans la voie de régulation de la biosynthèse de la cystéine, correspondant au régulon *cys*, ont déjà été, en partie, isolées et caractérisées. Plus spécifiquement, les études, menées par Kredich (1992, 1996) indiquent que le processus de minéralisation du soufre organique existant chez les bactéries, afin de pourvoir à la demande en soufre de la cellule, est également sous le contrôle du régulon *cys*. Ainsi, l'assimilation de soufre minéral, notamment par l'activité des sulfatases, est permise par la minéralisation du soufre organique en absence des substrats soufrés préférentiels de la cellule bactérienne. La réponse physiologique de la cellule bactérienne lors d'une situation de carence en soufre est schématisée en Figure 6. Par ailleurs, chez les bactéries, il existe différents types de sulfatases, qui appartiennent aux SSI protéines de la 1^{ère} catégorie et qui sont classées selon le type d'esters de sulfate organiques qu'elles hydrolysent. Ainsi, six principaux groupes de sulfatases ont été recensés : les arylsulfatases, les alkylsulfatases, les stéroïdes sulfatases, les glucosulfatases, les chondrosulfatases et les myrosulfatases (Fromageot, 1950 ; Roy, 1960).

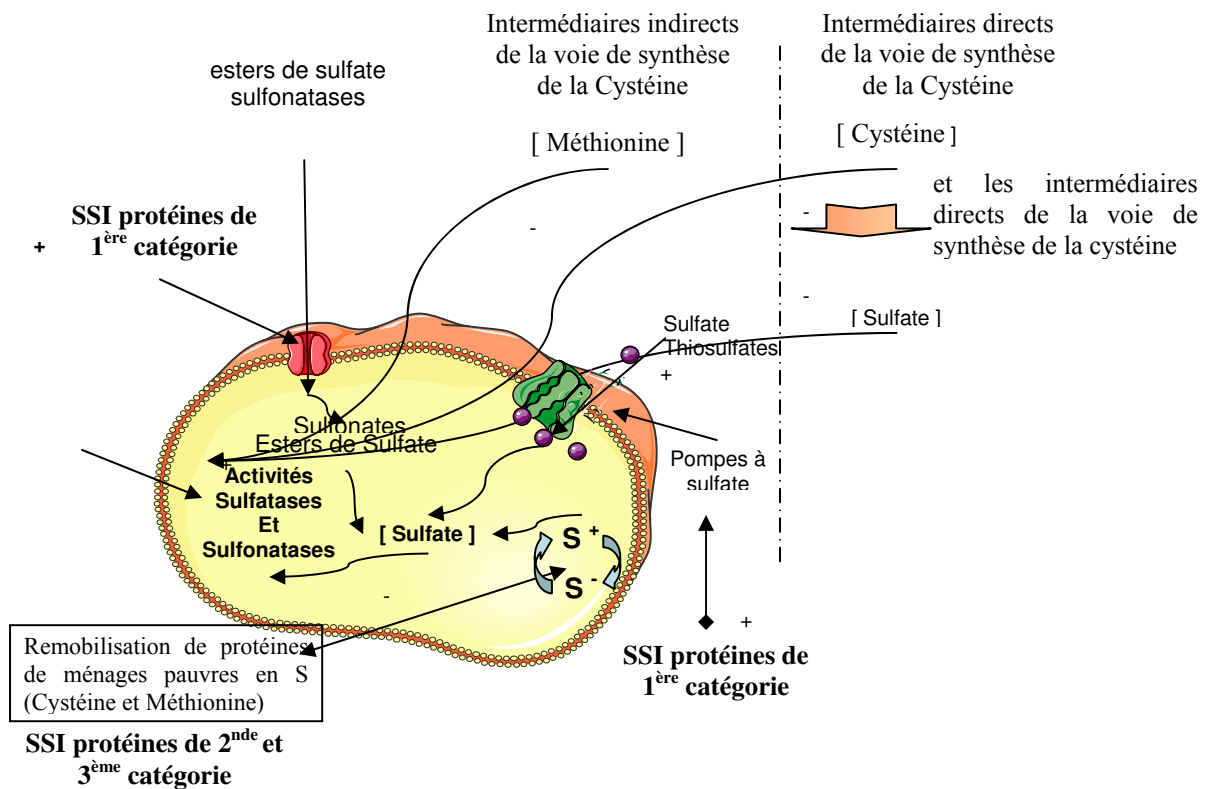


Figure 6 : Assimilation du soufre au sein de la cellule bactérienne, lors d'une situation de carence en soufre minéral

4. Les différentes formes de soufre organique et leur assimilation chez les bactéries

4.1. Les différentes formes de soufre du sol assimilées par les microorganismes

Les microorganismes ont développé des aptitudes physiologiques leur permettant d'accéder aux 90 à 95 % du soufre stockés dans le sol sous une forme organique, pour satisfaire leurs besoins en soufre. Ainsi, en situation de carences en sulfate, les microorganismes sont capables de synthétiser des enzymes (SSI protéines) qui leur permettent d'acheminer dans la cellule des sources de soufre organique et de les réduire afin d'obtenir du sulfate nécessaire à leurs besoins physiologiques.

4.1.1. Les formes minérales

Le soufre minéral est minoritaire dans le sol (<10 %) et les sulfates représentent la source de soufre la plus largement assimilée par les organismes vivants. Toutefois, cette forme de soufre est très facilement lessivée par les pluies ou adsorbée aux colloïdes du sol (Suhardi, 1992). Ainsi, la rétention des sulfates dépendra essentiellement de la texture du sol et de la pluviométrie.

4.1.2. Les formes organiques

Dans les sols cultivés, la forme organique est constituée (Figure 7) : (i) du soufre organique directement lié à un atome de carbone (C-S) qui est constitué du pool d'acides aminés soufrés (la cystéine et la méthionine) et de protéines soufrées, de sulfonates, de composés hétérocycliques, de glutathion, de certains coenzymes, d'antibiotiques et de vitamines (Bettany et Stewart, 1983), (ii) du soufre organique non directement lié à un atome de carbone qui comprend principalement les esters de sulfates (-C-O-S) et pour une part les sulfamates (Bettany et Stewart, 1983).

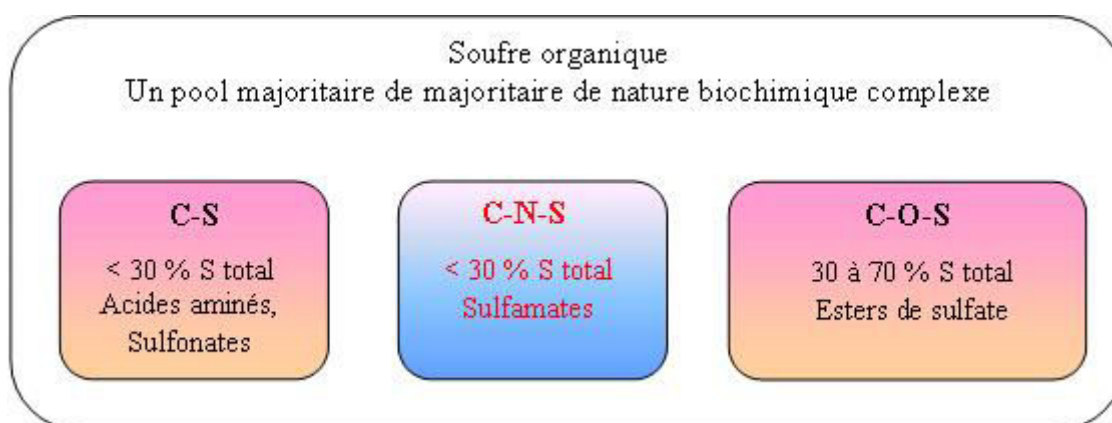


Figure 7 : Représentation du pool de soufre organique dans les sols

4.2. Les enzymes microbiennes impliquées dans la dégradation des sources de soufre organique du sol

Dans la cellule bactérienne, différents systèmes enzymatiques fonctionnent conjointement et permettent notamment un transport et une dégradation de différents substrats pour libérer du sulfate. Dans ce sens, la machinerie cellulaire dispose d'un transporteur commun dédié aux transferts, du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, des esters de sulfate (aliphatiques et aromatiques) et des sulfonates aromatiques (Vermeij *et al.*, 1999 ; Kertesz, 2001). Ce transporteur est constitué des gènes *atsRBC* qui ont été notamment caractérisés chez *Pseudomonas putida* S-313 (Vermeij *et al.*, 1999). Les gènes *atsBC* présentent de fortes similarités avec les perméases et les sites actifs ATP dépendants, caractéristiques des transporteurs membranaire de type ABC. Le gène *atsR* code une protéine périphérique, bien que celle-ci soit plus éloignée de l'opéron *atsBC*. Les investigations d'Hummerjohann et Kertesz (cité dans Kertesz, 1999) ont montré, suite à l'insertion de cassettes dans le gène *atsR*, l'incapacité de la cellule à se développer sur un substrat constitué d'esters de sulfate ou de sulfonates aromatiques. Ainsi, le rôle d'*atsR* semble permettre la fourniture de composés

soufrés aromatiques à la cellule bactérienne. En conclusion, le système de transport AtsRBC constitue une voie d'acheminement générale de l'ensemble des composés aromatiques soufrés qui permet un apport, à la cellule bactérienne, de nombreuses sources de S organique (Kertesz, 1999).

4.2.1. Les sulfonates et les sulfonatas

L'utilisation de sources de soufre naturellement présentes dans le sol comme les taurines, les alcanesulfonates, les isothiocyanates et les cystéates est courante au sein de la communauté bactérienne du sol. Néanmoins, une complète dégradation de ces composés semble être limitée à quelques espèces bactériennes (King et Quinn, 1997 ; Seitz *et al.*, 1993).

Les alcanesulfonates et les esters de sulfonates aliphatiques et aromatiques présents dans l'environnement sont généralement considérés comme des composés xénobiotiques (Kertesz *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1994) qui sont produits industriellement comme des surfactants, des additifs et des colorants. Ces composés sont alors minéralisés dans l'environnement afin de pourvoir à la demande en carbone.

L'étape clef des réactions de désulfonation est une étape d'oxygénation dans laquelle le pouvoir réactif de l'oxygène moléculaire est utilisé afin de déstabiliser ou casser la forte liaison entre l'atome de carbone et l'atome de soufre (Figure 8).

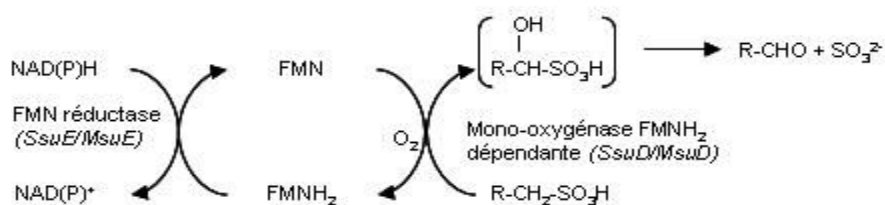


Figure 8 : Mécanisme proposé par Kertesz (1999) dans le cas de la désulfonation des alcanesulfonates. La Flavine mononucléotide (FMN) est réduite par une FMN réductase utilisant le NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide réduite) ou le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme donneur d'électron. La FMNH agit alors comme co-substrat dans le processus de désulfonation par les protéines SsuD ou MsuD qui produisent l' α -hydroxysulfonate qui décompose le produit en aldéhyde et libère du sulfite

Les sulfonates aromatiques sont généralement dégradés afin de satisfaire la demande en carbone. En conditions limitantes en soufre, l'étape de désulfonation a lieu avant le clivage du cycle aromatique et est effectuée par une unique monooxygénase. L'action de cette enzyme produit alors du sulfite et un phénol correspondant au sulfonate initial (Zürer *et al.*, 1987 ;

Kertesz *et al.*, 1994) (Figure 9). Le clivage du cycle aromatique peut être réalisé à l'aide de plusieurs dioxygénases.

Au travers de la littérature, une souche modèle est fréquemment considérée pour l'étude de la régulation de la désulfonation des sulfonates aromatiques : *Pseudomonas putida* S-313 (Zürer *et al.*, 1987 ; Kertesz, 1999 ; Vermeij *et al.*, 1999 ; Kahnert *et al.*, 2002).

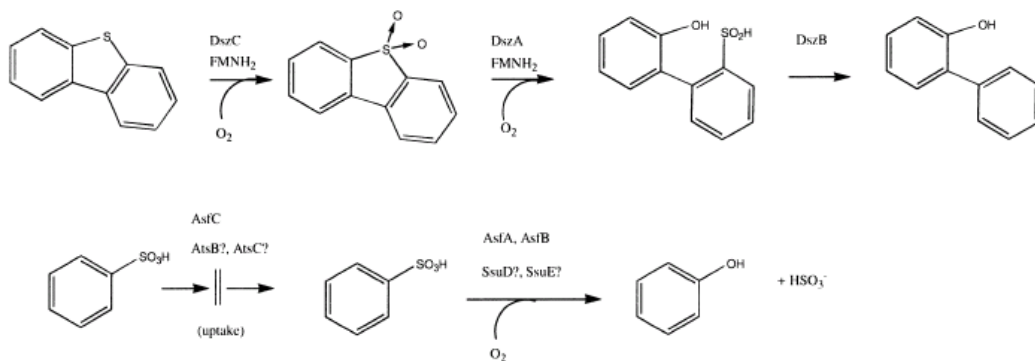


Figure 9 : Comparaison de la voie de désulfuration par *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gray *et al.*, 1996) et *Pseudomonas putida* S-313 (Vermeij *et al.*, 1999). Concernant *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, le soufre du thiophène est oxydé en 2 étapes. Dans un premier temps, une DBT-monoxygénase produit du DBT-dioxyde qui par la suite est clivée par une DBT-dioxyde monoxygénase en 2-(2-hydroxyphényl)benzènesulfonate (HPBS). Puis, le groupement sulfinate est finalement libéré par une HPBS sulfinate, cette seconde étape oxygénolytique est produite par une FMN réductase (DszD). Concernant, *Pseudomonas putida* S-313, les protéines AtsBC sont impliquées dans le transport du sulfonate. Puis, les protéines SsuDE sont impliquées dans le clivage du sulfinate encore une fois par une réaction oxygénolytique

4.2.2. Les sulfates organiques et les sulfatases

Les sulfatases (EC 3.1.6.-) ont déjà fait l'objet de nombreuses investigations et ont ainsi été isolées chez de nombreux organismes, comme les bactéries (Harada et Spencer, 1964 ; Murooka *et al.*, 1977 ; Dodgson *et al.*, 1982 ; Beil *et al.*, 1995), les champignons filamenteux (Harada et Spencer, 1962 ; Marzluf, 1994 ; Marzluf, 1997), les algues (Hallman et Sumper, 1994 ; Barbeyron *et al.*, 1995 ; De Hostos *et al.*, 1988), les oursins (Hoshi et Moriya, 1980 ; Yamada *et al.*, 1989) et des organismes eucaryotes supérieurs (Parenti *et al.*, 1997).

4.2.2.1. Les alkylsulfates et les alkylsulfatases

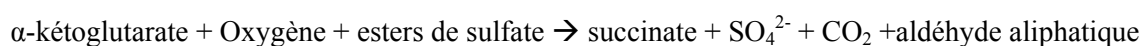
Les alkylsulfates représentent une partie du pool des esters de sulfate du sol et possèdent un groupement aliphatique. Dans le sol, les alkylsulfates peuvent provenir de sources naturelles ou anthropiques. En effet, les plantes et les animaux peuvent produire des esters de sulfate aromatiques qui peuvent, par la suite, être dégradés dans le sol en esters de sulfate

aliphatiques, comme les polysaccharides sulfates et les glycosaminoglycanes. De plus, les alkylsulfates sont souvent utilisés dans l'industrie de par leurs propriétés de surfactants. Ils sont alors rejetés en grandes quantités dans l'environnement, ce qui représente un important apport anthropique.

La voie métabolique par laquelle les alkylsulfates sont dégradés a fait l'objet de nombreuses études (Bartholomew *et al.*, 1977 ; Cloves *et al.*, 1977 ; Barrett *et al.*, 1980a,b ; Cloves *et al.*, 1980_{a,b} ; Crescenzi *et al.*, 1984 ; Kahnert et Kertesz, 2000 ; Hagelueken *et al.*, 2006 ; Gadler et Faber, 2007). La première étape de biodégradation des esters de sulfate aliphatiques, est catalysée par des enzymes de type alkylsulfatase. L'action des alkylsulfatases conduit au clivage de la liaison Oxygène-Soufre de l'ester de sulfate aliphatique et permet ainsi une libération de sulfate et du résidu alcool correspondant à l'ester de sulfate initial.

Les travaux menés par Kahnert et Kertesz (2000) révèlent l'existence chez *Pseudomonas putida* S-313 d'une alkylsulfatase, nommée AtsK, minéralisant les esters de sulfate aliphatiques. AtsK semble spécifique de la minéralisation des esters de sulfate bien qu'elle possède un degré d'identité de 38 % avec les séquences peptiques des taurines dioxygénases (TauD) présente chez *Escherichia coli* (Eichhorn *et al.*, 1997). A la différence de TauD qui est une dioxygénase α -kétoglutarate dépendante, AtsK ne semble pas spécifique de l' α -kétoglutarate et peut utiliser différents acides de type α -kétos comme co-substrat : l' α -kétoadipate, l' α -kétovalérate et l' α -kétooctanoate (Kahnert et Kertesz, 2000). Néanmoins, ses propriétés biochimiques la relie à la super famille des dioxygénases α -kétoglutarate dépendante (Thomas *et al.*, 1988).

AtsK

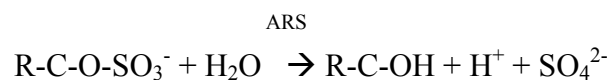


L'existence de plusieurs alkylsulfatases au sein d'un même organisme suggère fortement une localisation spécifique des différentes enzymes. Il est possible de distinguer une activité alkylsulfatase minéralisant les esters de sulfate aliphatiques à courte chaîne carbonée (de 3 à 5 atomes de carbone) localisée dans le cytoplasme (Thomas *et al.*, 1988) et une activité alkylsulfatase minéralisant des esters de sulfate à longues chaînes carbonées dans le périplasma (Fitzgerald et Laslie, 1975). Lorsque le substrat est composé d'une courte chaîne carbonée, il est acheminé dans le cytoplasme *via* un transporteur de type ABC, AtsRBC. A l'inverse, lorsque la chaîne carbonée est plus longue, l'ester de sulfate aliphatique resterait dans le domaine périplasmique (Thomas *et al.*, 1988). L'alkylsulfatase périplasmique a été découverte par Hsu (1965) qui a observé une nouvelle activité sulfatase capable de dégrader

des détergents industriels. Par la suite, cette alkylsulfatase a été nommée par Dodgson *et al.*, (1982) enzyme SDSase. L'étude menée par Davison *et al.*, (1992) a permis la caractérisation des gènes impliqués dans la biodégradation du Sodium Dodécyl Sulfate par le *Pseudomonas sp.* ATCC19151 qui était capable d'utiliser le SDS comme source de carbone et de soufre. Cette alkylsulfatase, SdsA, est capable de dégrader les esters de sulfate à longue chaîne carbonée dans le périplasme mais Hagelueken *et al.*, (2006) ont également mis en évidence sa capacité à minéraliser des composés alkylsulfates à courtes chaînes carbonées. Ainsi, c'est bien la localisation du substrat qui conditionne l'aptitude de cette enzyme à ne dégrader que des alkylsulfates à longues chaînes carbonées et non pas le fait qu'elle soit incapable de minéraliser les alkylsulfates à courtes chaînes. Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'alkylsulfatase SdsA1 peut dégrader des esters de sulfate aliphatiques à courtes et longues chaînes carbonées. Par contre, cette enzyme ne semble pas capable de minéraliser les arylsulfates comme le nitrocatécholsulfate et le *p*-nitrophénylsulfate (Hagelueken *et al.*, 2006), ce qui semble confirmer la spécificité de cette enzyme à dégrader spécifiquement des esters de sulfate aliphatiques. Enfin, le rôle de SdsA1 ne semble pas limité au métabolisme soufré chez *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, cette alkylsulfatase semble aussi jouer un rôle dans les processus de détoxification de certains composés potentiellement biocides, ainsi que dans les processus de régulation de la communauté bactérienne totale, *via* le quorum sensing (Hagelueken *et al.*, 2006).

4.2.2.2. Les arylsulfates et les arylsulfatases

La principale enzyme étudiée dans la dynamique du soufre dans les sols agricoles est l'arylsulfatase (arylsulfate sulphohydrolase, EC 3.1.6.1) qui catalyse l'hydrolyse des esters de sulfate aromatiques en SO_4^{2-} , en clivant la liaison O-S (Fitzgerald, 1978).



L'arylsulfatase est une enzyme d'origine microbienne. Cette enzyme est largement présente dans les sols et est utilisée comme indicateur de la qualité biologique des sols (Bandick et Dick, 1999 ; Ndiaye *et al.*, 2000 ; De la Paz Jimenez *et al.*, 2002). En effet, l'activité arylsulfatase est modulée par les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol et cette enzyme est impliquée dans le turn-over du soufre (Ndiaye *et al.*, 2000).

La teneur en sulfates du sol (Dodgson *et al.*, 1982), la présence d'acides aminés et de phosphates soufrés (Tabatabai, 1994) inhibent l'activité de l'enzyme. L'activité est aussi dépendante des variations d'humidité et de température du sol avec laquelle elle est corrélée

positivement (Cooper, 1972 ; Castellano et Dick, 1991 ; Freeman *et al.*, 1996). Le pH influence également directement l'activité de l'enzyme (Tabatabai et Bremner, 1970_b) et l'optimum de pH est estimé entre 5,8 et 8,2. Selon Deng et Tabatabai (1997), lorsque le pH prend de faibles valeurs, soit la synthèse de l'enzyme est inhibée, soit cette dernière devient instable et inactive. Par ailleurs, les valeurs d'activité arylsulfatase sont plus élevées si le sol présente un pH neutre ou alcalin (Knauff *et al.*, 2003). De plus, la présence d'éléments toxiques, comme les métaux lourds, inhibe également l'activité arylsulfatase (Kandeler *et al.*, 1996 ; Tscherko et Kandeler, 1997). Selon Klose *et al.* (1999), l'activité arylsulfatase est aussi corrélée avec la teneur en carbone du sol et cette activité diminue, corrélativement à la teneur de matière organique, en fonction de la profondeur du sol (Tabatabai et Bremner, 1970_a). Ainsi, la présence d'un couvert végétal ou des résidus de culture ont une influence sur cette activité enzymatique. Enfin, l'activité arylsulfatase semble modifiée suivant le type de couvert végétal et selon les besoins spécifiques en soufre minéral des végétaux. Ainsi, la succession des cultures aura donc une influence sur le niveau d'activité (Deng et Tabatabai, 1997 ; Klose *et al.*, 1999 ; Vong *et al.*, 2002 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2003). Selon Gupta et Germida (1988), les activités enzymatiques supérieures sous friches comparativement à celles mesurées en sols cultivés semblent s'expliquer par l'absence de labour qui déstructure le sol. Le maintien du couvert végétal permettrait ainsi de plus longues périodes de croissance racinaire et un effet rhizosphère qui stimulerait la minéralisation du soufre organique (Bopaiah et Shetty, 1991).

4.3. L'arylsulfatase enzyme clef du cycle du soufre ?

4.3.1. Les différents substrats de l'arylsulfatase

Les arylsulfatases sont généralement considérées comme des enzymes clefs du cycle du soufre. En effet, le large spectre d'activité de l'enzyme arylsulfatase lui permet d'hydrolyser des composés aromatiques soufrés standards tels le 4-nitrocatechol sulfate ou le nitrocatechol sulfate qui sont des substrats artificiels utilisés en routine dans les tests de mesures d'activités enzymatiques. Ceci a permis, dans un premier de temps, la caractérisation puis l'étude de cette enzyme (Nicholls et Roy, 1971). Toutefois, le substrat naturel de cette enzyme, dans les sols, semble être assez éloigné de ces composés aromatiques. En effet, dans les sols et dans les sédiments, il existe de nombreuses sources potentielles pouvant constituer un apport d'esters de sulfate non aromatiques. Ces esters de sulfate peuvent provenir soit directement de l'humus où ils sont synthétisés par voie chimique, soit des organismes vivants qui peuvent

libérer ces types de composés. Ainsi, dans l'environnement, les esters de sulfate retrouvés en fortes proportions sont de type composés aliphatiques et les polysaccharides soufrés. Néanmoins, les esters de sulfate apportés par les organismes vivants peuvent également être des composés aromatiques soufrés biocides. Ainsi, cette capacité à minéraliser des composés aromatiques soufrés pourrait reposer sur la conservation d'une stratégie de dégradation de composés biocides (Kim *et al.*, 1994 ; Kertesz, 1999). De manière similaire, la sulfatation, chez les mammifères, est une des principales voies de détoxification de composés aromatiques xénobiotiques.

Ainsi, l'activité de l'arylsulfatase est largement répandue dans les sols, quelle que soit la teneur en esters de sulfate. Ceci s'explique en partie suivant la part réelle d'esters de sulfate disponible dans le sol (Freney *et al.*, 1975 ; Eriksen *et al.*, 1995). En effet, les esters de sulfate peuvent s'adsorber aux colloïdes du sol et donc être peu disponibles. Toutefois, malgré de nombreuses études à ce sujet, il n'est toujours pas possible, actuellement, de statuer sur l'importance réelle de cette activité enzymatique dans le turn-over du S dans le sol.

4.3.2. L'arylsulfatase chez les microorganismes

Parmi les sulfatases, l'enzyme arylsulfatase a été la mieux caractérisée dans les processus d'apports en soufre minéral chez les bactéries (Adachi *et al.*, 1975 ; Murooka *et al.*, 1977 ; Beil *et al.*, 1995), les champignons filamenteux (Dodgson *et al.*, 1982 ; Marzluf, 1994) et les algues (De Hostos *et al.*, 1988°; Hallman et Sumper, 1994). Communément, l'arylsulfatase est scindée en 2 groupes en regard de ses optima de pH. Ainsi, un de ces groupes est acidophile et possède un optimum de pH de 6,5 à 7,1, alors que pour le second groupe, l'optimum de pH est plus alcalin (8,3 à 9,0). Néanmoins, une bactérie peut posséder plusieurs isozymes de l'arylsulfatase. En effet, *Proteus rettgeri* possède neuf isozymes de l'arylsulfatase et a un optimum de pH évalué entre 6,7 à 8,1 (Fitzgerald et Milazzo, 1970 ; Deslile et Milazzo, 1970). Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, deux isozymes de l'arylsulfatase ont été répertoriées et leurs optima de pH se situe à 8,4 et 9 (Fitzgerald et Milazzo, 1970 ; Deslile et Milazzo, 1972). Cependant, chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, seule une des deux arylsulfatases semble fonctionnelle (Kertesz, 1999). En outre, les enzymes de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae* ont une relative bonne similarité (37 %) en acides aminés et ont une taille respectivement de 60 et 62 kDa (Muller et Schmidt, 1986). Néanmoins elles possèdent certaines différences. En effet, l'arylsulfatase de *Pseudomonas aeruginosa* est intracellulaire alors que celle de *Klebsiella pneumoniae* est périplasmique. Enfin, leur optimum de pH est respectivement de 8,9 et 7,5.

4.4. La régulation des arylsulfatases

Au travers de la littérature, deux souches sont fréquemment utilisées comme souches modèles pour l'étude des processus impliqués dans la minéralisation du soufre organique et plus spécifiquement dans la synthèse et la régulation de l'arylsulfatase. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Plus récemment, d'autres travaux ont porté sur la régulation des sulfatases d'*Escherichia coli* (Berteau *et al.*, 2006 ; Benjdia *et al.*, 2007_{a,b}) et l'ensemble de ces études ont permis d'appréhender la régulation des sulfatases et notamment des arylsulfatases.

4.4.1. La régulation des sulfatases

Toutes les sulfatases actuellement caractérisées chez les procaryotes et/ou les eucaryotes possèdent un motif en acides aminés relativement conservé sur leur site actif et défini comme une signature caractéristique des sulfatases (Kertesz, 1999 ; Mougous *et al.*, 2002 ; Sardiello *et al.*, 2005). Les enzymes de types sulfatases sont synthétisées dans un premier temps sous une forme native. Puis, celles-ci sont par la suite modifiées par un régulateur post traductionnel qui permet la maturation de l'enzyme. Dans ce cadre, les enzymes sulfatases natives subissent une modification post-traductionnelle du résidu cible (la cystéine ou de la sérine initiale de la séquence) par un résidu 2-oxoalanine (qui est le formylglycine, FGly). Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, c'est la cystéine, en position cys-51 qui est modifié en FGly (Dierks *et al.*, 1998) alors que chez *Klebsiella pneumoniae*, c'est la sérine, en position ser-72, qui est modifiée en FGly (Szameit *et al.*, 1999).

Les récents travaux de Berteau *et al.*, (2006) et Benjdia *et al.*, (2007_a) mettent en avant l'existence de différentes signatures peptidiques permettant la reconnaissance des sulfatases. Ainsi, les sulfatases semblent présenter 3 motifs distincts et semblent être régulées suivant cette signature peptidique (Figure 10)^o:

- C-X-P-X-R-X₄-TG, dont le motif semble relativement conservé entre procaryotes, *Pseudomonas aeruginosa*, et Eucaryotes (Kertesz, 1999 ; Dierks *et al.*, 1999) et dont la maturation de la cystéine s'effectue de façon strictement aérobie par une Enzyme Générant le FormylGlycine (FGE),
- S-X-P-X-R-X₄-TG, qui a été caractérisée chez les Enterobactéries et notamment *Klebsiella pneumoniae* et qui semblerait uniquement présente au sein de ce groupe taxonomique (Adachi *et al.*, 1973 ; 1974 ; 1975 ; Murooka *et al.*, 1977 ; 1990) et dont la sérine est modifiée en FormylGlycine par une réaction strictement anaérobie, anSME (Effecteur Anaérobie Modifiant les Sulfatases) (Fang *et al.*, 2004),

- C-X-A-X-R-X₄-TG, dont le motif a été récemment mis en évidence chez *Escherchia coli* et qui semblerait répartie dans près de 10 % des génomes de la GenBank (Berteau *et al.*, 2006 ; Benjdia *et al.*, 2007_a) et dont la maturation de la cystéine s'effectue de façon strictement aérobie par une enzyme pourtant proche de l'effecteur anSME (Benjdia *et al.*, 2007_b).

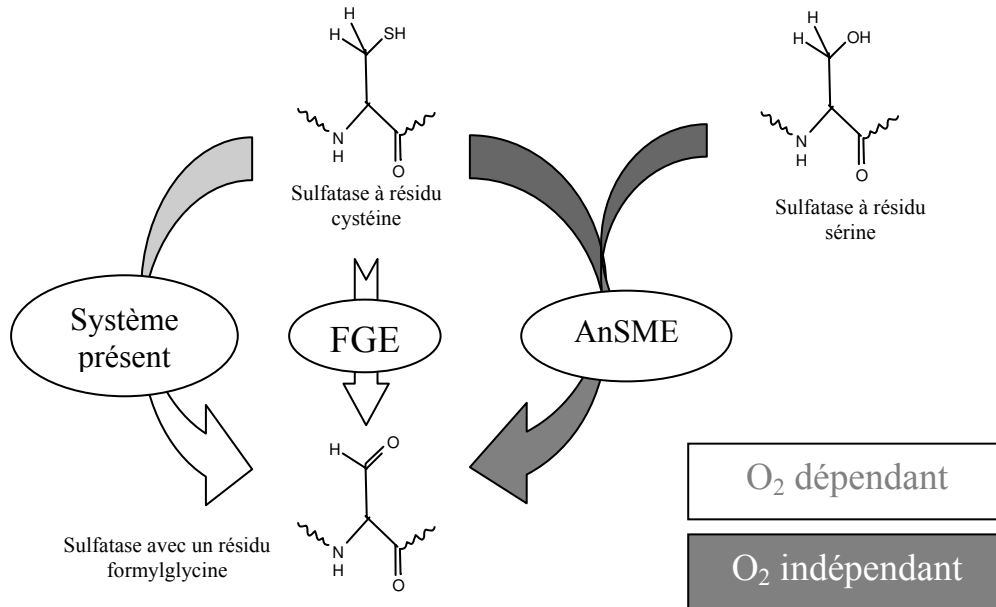


Figure 10 : Les différents mécanismes régulant les sulfatases au sein des procaryotes. Le système anSME présent chez *Klebsiella pneumoniae* semblent apte à minéraliser les 2 types de résidu cible. A l'inverse, le système FGE de *Pseudomonas aeruginosa* et celui d'*Escherchia coli* semble spécifique au résidu Cystéine

4.4.2.1. Les gènes impliqués dans l'expression de l'arylsulfatase

L'étude sur *Klebsiella pneumoniae* a permis la caractérisation de la structure de l'arylsulfatase périplasmique. L'unité catalytique de l'arylsulfatase est codée par le gène *atsA* (Murooka *et al.*, 1990 ; Szameit *et al.*, 1999). En outre, une protéine de 45 kDa est synthétisée par le produit du gène *atsB* et semble posséder un rôle d'activateur traductionnel de l'opéron bicistronic *atsBA* (Murooka *et al.*, 1996) (Figure 11). L'étude de Szameit *et al.* (1999) a montré que la régulation de l'expression de l'arylsulfatase, par le gène *atsA*, était sous la dépendance du promoteur *lac* chez *Escherichia coli*. Dans cette étude, ces auteurs ont également rapporté que l'absence du gène *atsB* induit la formation d'une arylsulfatase native (et donc inactive) qui résultait de la non modification de la sérine-72 du site formylglycine.

Les investigations concernant *Pseudomonas aeruginosa* ont permis la caractérisation de l'opéron permettant l'expression de l'arylsulfatase cytoplasmique (Figure 11). L'unité catalytique intracellulaire est codée par *atsA* dont l'activité est sous la dépendance du transporteur d'esters de sulfate dans la cellule.

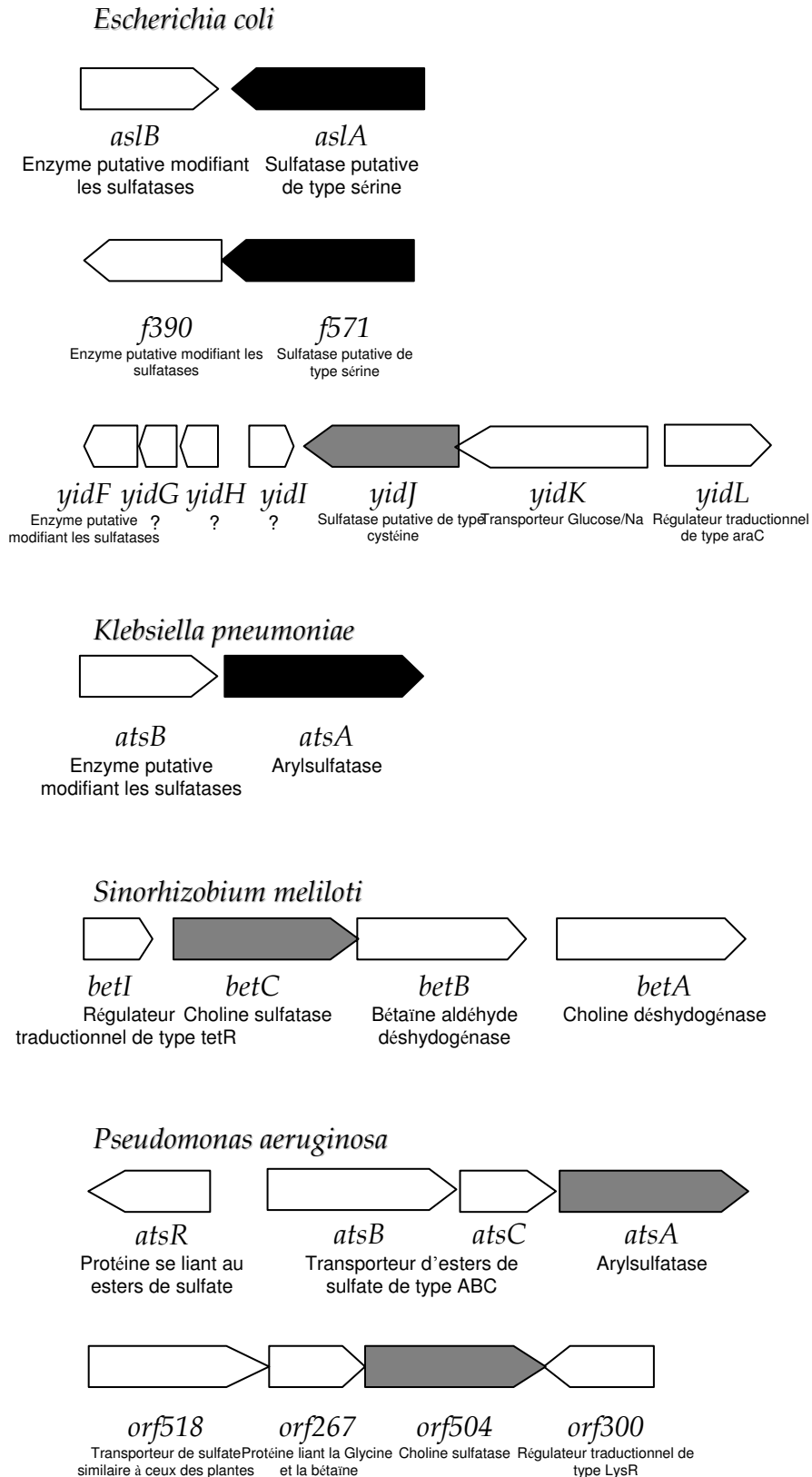


Figure 11 : Structure des clusters de gènes des sulfatases pour *Escherichia coli* (Blattner et al., 1997 ; Schirmer et Kolter, 1998) ; *Klebsiella pneumoniae* (Murooka et al., 1990 ; Szameit et al., 1999) ; *Sinorhizobium meliloti* (Osteras et al., 1998) et *Pseudomonas aeruginosa* (Beil et al., 1995). Les ORFs non caractérisés de *Pseudomonas aeruginosa* ont des fonctions de sulfatases hypothétiques obtenus par Blast (Kertesz, 1999). Le gène contenant une sulfatase de type sérine est coloré en noir et ceux encodant une sulfatase de type cystéine sont colorés en gris

4.4.2.2. Les gènes impliqués dans la régulation de l'arylsulfatase

La quasi-totalité des arylsulfatases bactériennes sont exprimées sur un milieu ne contenant qu'une source de soufre organique et sont réprimées sur un milieu de croissance contenant du soufre minéral (Dodgson *et al.*, 1982 ; Kertesz *et al.*, 1993) mais aussi de la cystéine et les différents intermédiaires de la voie de biosynthèse de cet acide aminé, comme les sulfites et les sulfides.

Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le sulfate et les métabolites dérivés de la voie de biosynthèse de la cystéine répriment l'expression des gènes codant l'arylsulfatase. La construction de mutants délétères en *cysN* et *cysI* a permis l'étude de la répression de l'arylsulfatase en fonction des différents intermédiaires à la synthèse de la cystéine. Ainsi, l'expression de *cysN* est réprimée par le sulfate minéral et l'expression du gène *cysI* est réprimée par les sulfites et les PAPS (3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate) qui sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine. De plus, l'expression de l'arylsulfatase est réprimée dans un milieu contenant des sulfides quand *cysN* et *cysI* sont défectifs, ce qui semble suggérer l'existence d'un système de régulation parallèle à celui de la cystéine (Figure 4). En effet, les investigations réalisées par Kahnert et Kertesz (2000) sur *Pseudomonas putida* S-313, qui n'a pas l'activité arylsulfatase bien qu'il en possède tous les gènes, ont révélé l'existence d'un activateur traductionnel de type LysR contrôlant l'expression des gènes *ats* et *sft* par une protéine de type SftR.

Chez *Klebsiella pneumoniae*, la synthèse d'arylsulfatase est réprimée directement par les sulfates et la cystéine intracellulaire mais pas par les sulfites et les sulfides ou même le thiosulfate qui sont les formes de soufre facilement assimilables par les microorganismes (Rammler *et al.*, 1964 ; Adachi *et al.*, 1975). Le rôle du régulon *cys* n'a pas été étudié chez cette bactérie. Cependant, à l'inverse de *Pseudomonas aeruginosa*, chez *Klebsiella pneumoniae* (comme chez les champignons filamenteux), la synthèse de l'arylsulfatase est induite par la carence en sulfate et en cystéine ou en une carence envers les différents intermédiaires de la voie « directe » de la voie de biosynthèse de la cystéine *i.e.* le sulfate ou ces intermédiaires réduits (sulfite, sulfide, cystéine) qui indirectement inhibent cette voie de biosynthèse par l'accumulation de cystéine dans la cellule (Harada et Spencer, 1962 ; Rammler *et al.*, 1964 ; Adachi *et al.*, 1975). Par ailleurs, une synthèse de l'activité arylsulfatase est également observée, lorsque ces microorganismes se développent en présence des intermédiaires de la voie « indirecte » d'assimilation des sulfates dont l'accumulation dans la cellule ne réprime pas la synthèse de l'arylsulfatase (*i.e.* la méthionine, la taurine et les cystéates), comme seule source de soufre.

Le soufre organique, tout comme le soufre élémentaire apporté par certains engrais, n'est pas disponible pour les plantes, sauf s'il est transformé en sulfates (Zhao *et al.*, 1996). En effet, les plantes ne peuvent synthétiser les molécules organiques soufrées qui leur sont nécessaires qu'à partir de soufre minéral ou d'acides aminés. Leur nature d'être vivant autotrophe astreint donc les végétaux à prélever le soufre sous sa forme minérale – les sulfates - dissous dans la solution du sol.

Ainsi, le fait que la plus grande partie du soufre dans le sol soit sous forme organique est problématique pour la biodisponibilité du soufre pour la plante. Dans ce cadre, les microorganismes jouent effectivement un rôle important pour les cultures, (i) à la fois par leur action sur la partie "minérale" du cycle du soufre, puisqu'ils favorisent notamment une accélération du turn-over du cycle du soufre et apportent au sol, lors de la lyse cellulaire, des composés assimilables par la plante (de la cystéine, de la méthionine, du sulfate et du sulfide), (ii) mais également par leur capacité à produire des enzymes (notamment les sulfatases et les sulfonatasés) nécessaires à la minéralisation du soufre organique, présent dans le sol, en sulfates.

Du fait de leur importance, l'étude des processus de transformation du soufre intéresse de plus en plus d'équipes de recherche. Ainsi, différentes équipes se sont focalisées sur l'étude des flux du soufre dans le sol et du turn-over de la matière organique. Dans ce sens, les études menées notamment par l'équipe de l'Iowa, U.S., ont été abondantes dans les années 70-90. Par ailleurs, de nombreuses unités de recherche travaillent également sur les flux de soufre mais avec davantage une finalité agronomique. C'est le cas des équipes de Rothamsted (U.K.) et d'Ithaca (U.S.) mais aussi de celle de l'INRA de Reims-Laon dont le but finalisé est notamment le développement de modèles prédictifs des flux de minéralisation du soufre.

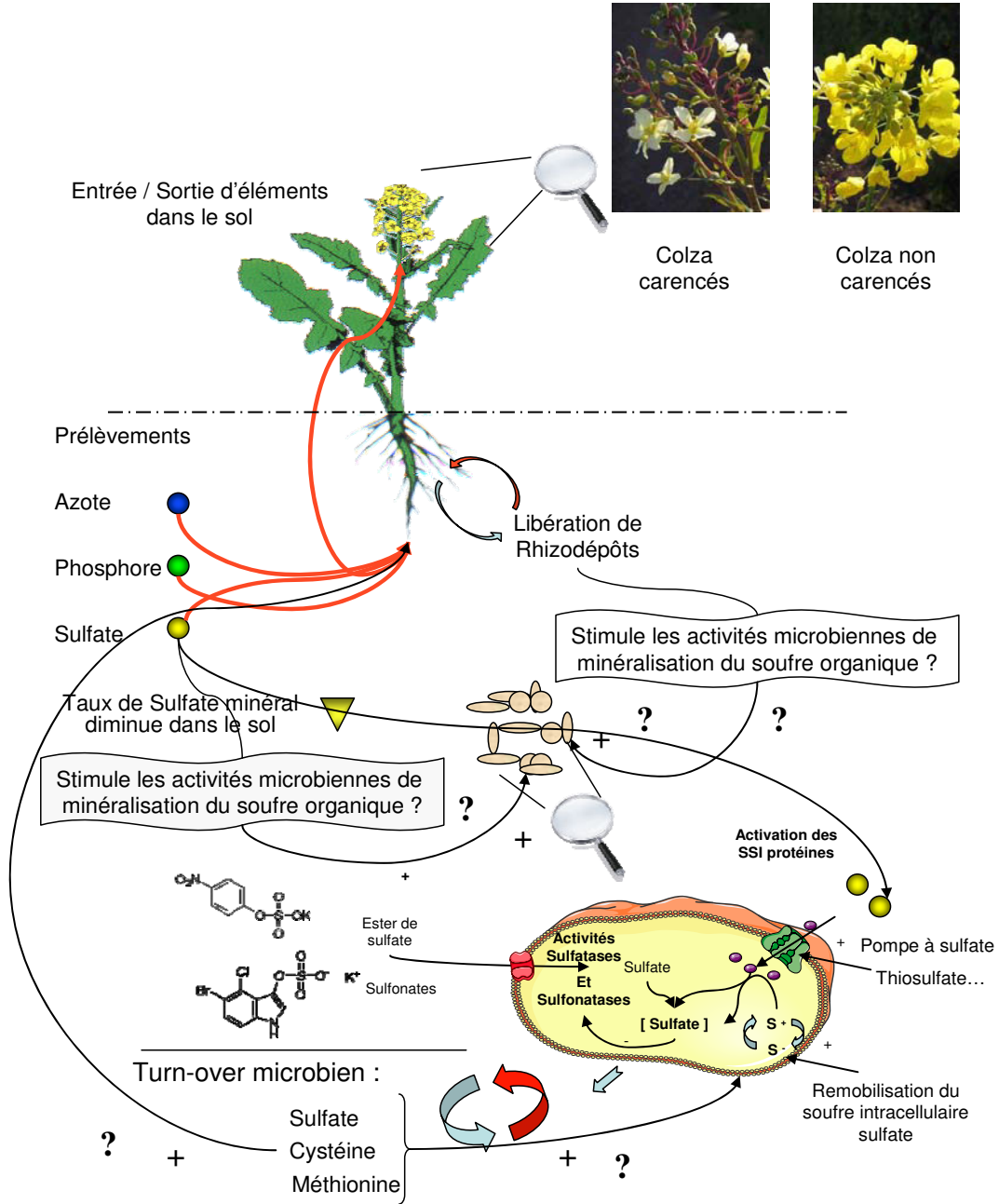
Par ailleurs, de nombreuses recherches concernant les aspects mécanistiques des enzymes minéralisant les différentes sources de soufre organique sont encore actuellement menées. Ainsi, (i) l'équipe de Jouy-en-Josas, travaille sur la régulation de l'expression des sulfatases, (ii) une équipe à Zurich (Suisse) s'intéresse à la caractérisation moléculaire des gènes et à la caractérisation biochimique des enzymes impliquées dans la dégradation des sulfonates aliphatiques, (iii) les équipes de Cardiff (U.K.), Braha (République Tchèque) et de Graz (Autriche) tentent quant à elles de déterminer, d'un point de vue mécanistique et biochimique, le fonctionnement des alkylsulfatases chez les microorganismes et leur possible rôle dans la dégradation des surfactants.

L'écologie fonctionnelle des communautés microbiennes impliquées dans le turn-over du soufre et notamment celles impliquées dans la minéralisation du soufre organique est également abordée par différentes équipes. Celle de Manchester (U.K.) s'intéresse d'une part, à la dégradation du soufre organique par les microorganismes (sulfonates et/ou esters de sulfate) notamment par des approches de biologie moléculaire et d'autre part, à la relation entre diversité des microorganismes et activité, notamment par des approches d'écologie fonctionnelle (PCR-DGGE). Enfin, l'Equipe Rhizosphère de Nancy concentre ses recherches sur l'étude des communautés microbiennes (bactériennes et fongiques) impliquées dans la minéralisation des esters de sulfate afin de mieux comprendre l'importance potentielle des flux de soufre dans la nutrition soufrée des plantes.

Dans cette optique, ces travaux de thèse se sont concentrés autour de la caractérisation de la communauté bactérienne tellurique impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate dans la rhizosphère de deux plantes montrant des besoins en soufre contrastés. Les objectifs ont consisté à (i) identifier les membres de la communautés bactérienne totale minéralisant les esters de sulfate, (ii) analyser la dynamique de la structure et la diversité de cette communauté au cours de la phénologie de ces plantes, (iii) cerner le rôle de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la minéralisation du S organique dans l'environnement rhizosphérique.

Plus globalement, ces travaux devraient permettre de cerner l'importance potentielle de la diversité de cette communauté bactérienne en lien avec l'activité de minéralisation du soufre organique dans les sols mais également, à plus ou moins long terme, d'appréhender le rôle de cette microflore fonctionnelle particulière dans le turn-over du soufre et la nutrition soufrée des plantes dans les écosystèmes agricoles.

Prédiction des phénomènes de carences en S ?



5. Références bibliographiques

- Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1975. Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 172: 2131-2140.
- Adachi T., Okamura H., Murooka Y., Harada T. 1974. Catabolite repression and derepression of arylsulfatase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 120: 880-885.
- Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1973. Derepression of arylsulfatase synthesis in *Aerobacter aerogenes* by tyramine. *Journal of Bacteriology*. 116: 19-24.
- Alvey S., Yang C.H., Buerkert A., Crowley D.E. 2003. Cereal legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. *Biology and Fertility of Soils*. 37: 73-82.
- Asmar F., Gahoonia T.S., Nielsen N.E. 1995. Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere. *Plant and Soil* 172: 117-122.
- Autry A.R., Fitzgerald J.W. 1991. Organosulfur formation in forest soils: Site comparison of kinetic parameters. *Soil Biology & Biochemistry*. 23: 689-693.
- Autry A.R., Fitzgerald J.W. 1990. Sulfonate S – A major form of forest soil organic sulfur. *Biology and Fertility of Soils*. 10: 50-56.
- Bacic H.P., Moody S.F., McComb J.A., Hinch J.M. 1987. Extracellular polysaccharides from shaken liquid cultures of *Zea mays*. *Australian Journal Plant Physiology*. 14: 633-641.
- Badalucco L., Kuikman P.J., Nannipieri P. 1996. Protease and deaminase in wheat rhizosphere and their relation to bacterial and protozoan populations. *Biology and Fertility of Soils*. 23: 99-104.
- Bandick A.K., Dick R.P. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*. 31: 1471-1479.
- Banerjee M.R., Chapman S.J. 1996. The significance of microbial biomass sulphur in soil. *Biology and Fertility of Soils*. 22: 116-125.
- Barbeyron T., Potin P., Richard C., Collin O., Kloareg B. 1995. Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology*. 141: 2897-2904.
- Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F. 1980a. Further studies on the substrate specificity and inhibition of the stereospecific CS₂ secondary alkylsulphohydrolase of *Comamonas terrigena*. *The Biochemical Journal*. 191: 467-473.
- Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F., Payne W.J. 1980b. Preliminary observations on alcohol dehydrogenases in *Comamonas terrigena* that exhibit Stereospecificity towards secondary alcohols. *The Biochemical Journal*. 187: 703-709.

- Bartholomew B., Dodgson K.S., Matcham G.W.J., Shaw D.J., White G. 1977. A novel mechanism of enzymatic ester hydrolysis. *Biochemical Journal*. 165: 575-580.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil land maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1183-1192.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*. 19: 135-145.
- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W., Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *FEBS European Journal of Biochemistry*. 229: 385-394.
- Bendjia A., Dehò G., Rabot S., Berteau O. 2007a. First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli aslB* and *ydeM* deletion mutants. *FEBS Letters*. 581: 1009-1014.
- Bendjia A., Leprince J., Guillot A., Vaudry H., Rabot S., Berteau O. 2007b. Anaerobic sulfatase-maturing enzymes: radical SAM enzymes able to catalyze *in vitro* sulfatase post-translational modification. *The Journal of American Chemical Society*. 129: 3462-3463.
- Benizri E., Nguyen C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 1230-1233.
- Benizri E., Dedourge O., Dibattista-Leboeuf C., Piutti S., Nguyen C., Guckert A. 2002. Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*. 21: 261-265.
- Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. 2006. A new type of bacterial Sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 22464-22470.
- Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1983. Sulphur cycling in soils. *In: More A.I. (Ed), Proceedings of Sulphur '82 Conference*. British Sulphur Corporation, London. Vol. 2 pp. 747-785.
- Blattner F.R., Plunkett 3rd G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado Vides J., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.M., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277: 1453-1474.
- Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. 2005. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 763-784.
- Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. 2005. Influence of nitrogen and sulfur fertilization on the alliin content of onions and garlic. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 763-784.

- Bopaiah B.M., Shetty H.S. 1991. Soil microflora and biological activities in the rhizospheres and root regions of coconut-based multi-storeyed cropping and coconut monocropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*. 23: 89-94.
- Bowen G.D., Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *In: Sparks D.L. (Ed.), Advances in Agronomy (66)*. Academic Press. pp. 1-102.
- Brady N.C. 1974. *In : The nature and properties of soils*, Macmillian, New York.. 639 p.
- Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C., Bazzicalupo M. 2000. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4785-4789.
- Castellano S.D., Dick R.P. 1991. Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soil. *Soil Science Society American Journal*. 55: 114-121.
- Chang C.W., Bandurski R.S. 1964. Exocellular enzymes of corn roots. *Plant Physiology*. 39: 60-64.
- Chapman S.J. 1987. Microbial sulphur in some Scottish soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 19: 301-305.
- CITEPA. 2008. http://www.citepa.org/emissions/nationale/Aep/aep_so2_en.htm
- Cloves J.M., Dodgson K.S., Games D.E., Shaw D.J., White G.F. 1977. The mechanism of action of primary alkylsulphohydrolase and arylsulphohydrolase from a detergent-degrading micro-organism. *The Biochemical Journal*. 167: 843-846.
- Cloves J.M., Dodgson K.S., Payne W.J., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980_a. Purification and properties of the P2 primary alkylsulphohydrolase of the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas C12B*. *The Biochemical Journal*. 185: 23-31.
- Cloves J.M., Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980_b. Specificity of P2 primary alkylsulphohydrolase induction in the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas C12B*. *The Biochemical Journal*. 185: 13-21.
- Cooper P.J.M. 1972. Arylsulfatase activity in northern Nigeria soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 4: 333-337.
- Costa R., Götz M., Mrotzek N., Lottmann J., Berg G., Smalla K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology*. 56: 236-249.
- Cowan J.M., Urbanowski M.L., Talmi M., Stauffer G.V. 1993. Regulation of the *Salmonella typhimurium metF* gene by the MetR protein. *Journal of Bacteriology*. 175: 5862-5866.
- Crescenzi A.M.V., Dodgson K.S., White G.F. 1984. Purification and some properties of the D-lactate-2-sulphatase of *Pseudomonas syringae* GG. *The Biochemical Journal*. 223: 487-494.

- Curl E.A., Truelove B. 1986. The rhizosphere. Curl E.A., Truelove B. (Eds.) Springer-Verlag. New York. 288 p..
- Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA (Ed.) 383 pp.
- David M.B., Mitchell M.J. 1985. Sulfur constituents and cycling in waters, seston, and sediments of an oligotrophic lake. *Limnology and Oceanography*. 30: 1196-1207.
- Davison J., Brunel F., Phanopoulos A., Prozzi D., Terpsstra P. 1992. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene*. 114: 19-24.
- de Hostos E.L., Togasaki R.K., Grossman A. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reihardtii*. *Journal of Cellular Biology*. 106: 29-38.
- De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 302-306.
- de Ridder-Duine A.S., Kowalchuk G.A., Klein Gunnewiek P.J.A., Smant W., van Veen J.A., de Boer W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 349-357.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science*. 55: 649-656.
- Dedourge O., Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 181-185.
- Deng S.P., Tabatabai M.A. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III - Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 141-146.
- Deslile G.J., Milazzo F.H. 1972. Characterization of arylsulfatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 18: 561-568.
- Deslile G.J., Milazzo F.H. 1970. The isolation of arylsulfatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 212: 505-508.
- Di Giovanni G.D., Watrud L.S., Seidler R.J., Widmer F. 1999. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR (ERIC-PCR). *Microbiology Ecology*. 37: 129-139.

- Dias B., Weimer B. 1998. Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacili, and brevibacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3320-3326.
- Dierks S., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M.A., von Figura K. 1998. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 25560-25564.
- Dierks T., Lecca M.R., Schlotterhose P., Schmidt B., von Figura K. 1999. Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *The EMBO Journal*. 18: 2084-2091.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatases of microbial origin. CRC Press, BocaRaton, Florida, USA. Vol. 1. pp. 103-169.
- Duineveld B.M., Kowalchuk G.A., Keijzer A., van Elsas J.D., van Veen J.A. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 172-178.
- Duineveld B.M., Rosado A.S., van Elsas J.D., van Veen J.A. 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4950-4957.
- Eichhorn E., van der Ploeg J.R., Kertesz M.A., Leisinger T. 1997. Characterization of α -ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherchia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 23031-23036.
- Elsgaard L., Vinther F.P. 2004. Modeling of the fine-scale temperature response of arylsulfatase activity in soil. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*. 167: 196-201.
- Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 1011-1016.
- Fang Q., Peng J., Dierks T. 2004. Post-translational formylglycine modification of bacterial sulfatases by the radical S-adenosymethionine protein AtsB. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 14570-14578.
- Fernandez M., Kleerebezem M., Kuipers O.P., Siezen R.J., van Kranenburg R. 2002. Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 184: 82-90.
- Fernandez M., van Doesburg W., Rutten G.A., Marugg J.D., Alting R., van Kranenburg R., Kuipers O.P. 2000. Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine β -lyase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 42-48.

- Filoux A., Bally M., Soscia C., Murgier M., Lazdunski A. 1988. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*- like genes. *Molecular and General Genetics*. 212: 510-513.
- Fitzgerald J.W. 1978. Naturally occurring organosulfur compounds in soil. *In*: Nriagu J.O. (Ed.), *Sulfur in the environment*, part 2. John Wiley and Sons, New York, pp. 391-443.
- Fitzgerald J.W., Laslie W.W. 1975. Loss of primary alkylsulfatase and secondary alkylsulfatases (S-1 and S-2) from *Pseudomonas* C12B: effect of culture conditions, cell-washing procedures, and osmotic shock. *Canadian Journal of Microbiology*. 21:59-68.
- Fitzgerald J.W., Milazzo F.H. 1970. Arylsulfatase multiplicity in *Proteus rettgeri*. *Canadian Journal of Microbiology*. 16: 1109-1115.
- Floyd R.A., Ohlrogge A.J. 1970. Gel formation on nodal root surfaces of *Zea mays*. I. Investigation of the gel's composition. *Plant and Soil*. 33: 331-341.
- Foster R.C. 1985. The biology of the rhizosphere. *In*: Ecology and management of soil borne plant pathogens. Parker C.A, Moore K.J., Wong P.T.W., Rovira A.D. et Kollmorgen J.K. (Eds.) American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, pp 75-79.
- Foster R.C. 1982. The fine structure of epidermal cell mucilages of roots. *The New Phytologist*. 91: 727-740.
- Foster R.C., Bowen G.D. 1982. Plant surfaces and bacterial growth: the rhizosphere and rhizoplane. *In*: Mount M.S., Lacy G.H. (Eds) *Phytopathogenic Prokaryotes*. Vol 1. Academic Press, New York. pp. 159-185.
- Freeman C., Liska G., Ostle N.J., Lock M.A., Reynolds B., Hudson J. 1996. Microbial activity and enzymatic decomposition processes following peatland water table draw-down. *Plant and Soil*. 180:121-127.
- Freney J.R. Melville G.E., Williams C.H. 1975. Soil organic matter fractions as sources of plant available sulfur. *Soil Biology & Biochemistry*. 7: 177-183.
- Fromageot C. 1950. Sulfatase. *In*: Summer J.B., Myrbäck K. (Eds). *The enzymes*. Vol. 1. Part 1. Academic Press, New York. pp. 517-526.
- Gadler P., Faber K. 2007. New enzymes for biotransformations : microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. *TRENDS in Biotechnology*. 25: 83-88.
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1800-1809.
- Gray K.A., Pogrebinsky O.S., Mrachko G.T., Xi L., Monticello D.J., Squires C.H. 1996. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology*. 14: 1705-1709.

- Grayston S.J., Campbell C.D., Bardgett R.D., Mawdsley J.L., Clegg C.D., Ritz K., Griffiths B.S., Rodwell J.S., Edwards S.J., Davies W.J., Elston D.J., Millard P. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology*. 25: 63-84.
- Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 30: 369-378.
- Greaves M.P., Darbyshire J.F. 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biology & Biochemistry*. 4: 443-449.
- Grundy F.J., Henkin T.M. 1998. The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 30: 737-749.
- Guckert A., Breish H., Reisinger O. 1975. Interface sol-racine. I. Etude au microscope électronique des relations mucigel-argile-microorganismes. *Soil Biology & Biochemistry*. 7: 241-250.
- Gupta V.V.S.R., Germida J.J. 1989. Microbial biomass and extractable sulphate sulfur levels in native and cultivated soils as influenced by air drying and rewetting. *Canadian Journal of Soil Science*. 69: 889-894.
- Gupta V.V.S.R., Germida J.J. 1988. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology & Biochemistry*. 20: 777-786.
- Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Kolmar L., Tümmler B., Heinz D.W., Schubert W.D. 2006. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103: 7631-7636.
- Hallman A., Sumper M. 1994. An inducible arylsulfatase of *Volvox carteri* with properties suitable for a reporter-gene system : Purification, characterisation and molecular cloning. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 221: 143-150.
- Harada T., Spencer B. 1964. Repression and induction of arylsulphatase synthesis in *Aerobacter aerogenes*. *Biochemistry Journal*. 93: 373-378.
- Harada T., Spencer B. 1962. The effect of sulphate assimilation on the induction of arylsulphatase synthesis in fungi. *Biochemistry Journal*. 82: 148-156.
- Harris P.J., Northcote D.H. 1970. Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root-tips. *Biochemistry Journal*. 120: 479-491.
- Helal H.M., Sauerbeck D.R., 1989. Carbon turnover in the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 152: 211-216.

- Helal H.M., Sauerbeck D.R. 1986. Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 149: 181-188.
- Henry S., Texier S., Hallet S., Bru D., Dambreville C., Chèneby D., Bizouard F., Germon J.C., Philippot L. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology*. 10: 3082-3092.
- Hiltner L. 1904. Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie unter besonderer nerücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten aus dem Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft*. 98: 59-78.
- Hojati S., Nourbakhsh F. 2006. Enzyme activities and microbial biomass carbon in a soil amended with organic and inorganic fertilizers. *Journal of Agronomy*. 5: 563-579.
- Hoshi M., Moriya T. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea urchins. *Developmental Biology*. 106: 29-38.
- Hsu Y.C. 1965. Detergent-splitting enzyme from *Pseudomonas*. *Nature*. 207: 385-388.
- Hummerjohann J., Kuttel E., Quadroni M., Ragaller J., Leisinger T., Kertesz M.A. 1998. Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 141: 1375-1386.
- Hryniewicz M.M., Kredich N.M. 1991. The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: Characterization of two binding sites for CysB protein, studies of *in vivo* transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *Journal of Bacteriology*. 173: 5876-5886.
- Iwanicka-Nowicka R., Hryniewicz M.M. 1995. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli cys* regulon. *Gene*. 166: 11-17.
- Iwanicka-Nowicka R., Zielak A., Cook A.M., Thomas M.S., Hryniewicz M.M. 2007. Regulation of sulphur pathways in *Burkholderia cenocepacia*: Identification of transcription factors CysB and SsuR and their role in control of target genes. *Journal of Bacteriology*. 189: 1675-1688.
- Jones D.D., Morre D.J. 1973. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. III. Control by Exogenous Sugars. *Physiologia Plantarum*. 29: 68-75.
- Jones D.L., Hodge A., Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *The New Phytologist*. 163: 459-480.
- Kahnert A., Kertesz M.A. 2000. Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *The Journal of Biological Chemistry*. 41: 31661-31667.

- Kahnert A., Mirleau P., Wait R., Kertesz M.A. 2002. The LysR-type regulator is involved in soil survival and sulphate ester metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*. 4: 225-237.
- Kandeler E., Kampichler C., Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biological and Fertility of Soils*. 23: 299-306.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Kertesz M.A. 2001. Bacterial transporters for sulphate and organosulfur compounds. *Research in Microbiology*. 152: 279-290.
- Kertesz M.A., Cook A.M., Leisinger T. 1994. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiological Reviews*. 15: 195-215.
- Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2296-2303.
- Kim D.H., Kim B., Kim H.S., Sohng I.S., Kobashi K. 1994. Sulfation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17:1326-1328.
- King J.E., Quinn J.P. 1997. The utilization of organosulphonates by soil land freshwater bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 474-478.
- Klein D.A., Frederick B.A., Biodini M., Trlica M.J. 1988. Rhizosphere micro-organisms effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil*. 110: 19-25.
- Klose S., Ajwa H.A. 2004. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1625-1635.
- Klose S., Wernecke K.D., Makeschin F. 2004. Microbial activities in forest soils exposed to chronic depositions from a lignite power plant. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1913-1923.
- Klose S., Moore J.M., Tabatabai M.A. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*. 29: 46-54.
- Knauff U., Schulz M., Scherer H.W. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*. 19: 215-223.
- Knee E.M., Gong F.C., Gao M.S., Teplitski M., Jones A.R., Foxworthy A., Mort A..J., Baur W.D. 2001. Root mucilage from pea and its utilisation by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 14: 315-322.
- Kowalchuk G.A., Buma D.S., de Boer W., Klinkhamer P.G.L., van Veen J.A., 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne

- microorganisms. AV Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 81: 509-520.
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H. 1984. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*. 16: 315-322.
- Kredich N.M. 1971. Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth on varying sulphur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 246: 3474-3484.
- Kredich N.M. 1992. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 6: 2747-2753.
- Kredich, N.M. 1996. Biosynthesis of cysteine. In: Neidhart F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Umberger K.B. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, American Society for Microbiology Press, Washington D.C. pp. 514-527.
- Kuske C.R., Ticknor L.O., Miller M.E., Dunbar J.M., Davis J.A., Barns S.M., Belnap J. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1854-1863.
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F., Lemanceau P. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2449-2456.
- Lorenz E., Stauffer G.V. 1996. MetR-mediated repression of the *glyA* gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 144: 229-233.
- Lynch J.M., Whipps J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 129: 1-10.
- Marcial-Gomes N.C., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N.G., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3758-3766.
- Mares R., Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1992. Regulation of the *Salmonella typhimurium metA* gene by the MetR protein and homocysteine. *Journal of Bacteriology*. 174: 390-397.
- Marilley J., Aragno M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*. 13: 127-136.
- Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1437-1445.

- Martin J.K. 1978. Biology of the rhizosphere. *In: Microbial Ecology*. Loutit M.W. Miles J.A.R. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 685-692.
- Martin J.K. 1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. *Soil Biology & Biochemistry*. 9: 1-7.
- Marzluf G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annual Reviews of Microbiology*. 51: 73-96.
- Marzluf G.A. 1994. Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in fungi. *Advances in Genetics*. 31: 187-206.
- Maxon M.E., Redfield B., Cai X.Y., Shoeman R., Fujita. K., Fisher W., Stauffer G.V., Weissbach H., Brot N. 1989. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*: effect of the MetR protein on the expression of the *metE* and *metA* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 85-89.
- Maynard D.G., Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1984. Sulfur cycling in grassland and parkland soils. *Biogeochemistry*. 1: 97-111.
- Mazel D., Marlière P. 1989. Adaptative eradiction of methionine and cysteine from bacterial light-harvesting proteins. *Nature* 341: 245-248.
- Mc Donald N.W., Zak D.R., Pregitzer K.S. 1995. Temperature effects on kinetics of microbial respiration and net nitrogen and sulfur mineralization. *Soil Science Society American Journal*. 59: 233-240.
- Mc Gill W.B., Cole C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*. 26: 267-286.
- McLaren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biochemistry*. 17: 73-79.
- Meharg A.A., Killham K. 1988. A comparison of carbon flow from pre-labelled and pulse-labelled plants. *Plant and Soil*. 112: 225-231.
- Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and theirs possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 162: 787-796.
- Miah M.Y., Kanazawa S., Chiu C.L. Hayashi H., Chino M. 2000. Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. *Soil Sciences and Plant Nutrition*. 46: 787-796.
- Miethling R., Wieland G., Backhaus H., Tebbe C.C. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L 33. *Microbiology Ecology*. 40: 43-56.

- Mol L. 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. II. Quantitative analysis of the luring effect of crops. *European Journal of Plant Pathology*. 101: 679-685.
- Morel J.L. Habib L., Plantureux S., Guckert A. 1991. Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant and Soil*. 136: 111-119.
- Morre D.J., Jones D.D., Mollenhauer H.H. 1967. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. I. Kinetics and secretory pathway. *Planta*. 74. 286-301.
- Mougel C., Offre P., Corberand T., Robin C., Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn cv. Jemalong J5. *The New Phytologist*. 170: 165-175.
- Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J.B., Brenner S.E., Bertozzi C.R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry & Biology*. 9: 767-776.
- Mounier E., Hallet S., Cheneby D., Benizri E., Gruet Y., Nguyen C., Piutti S., Robin C., Slezack-Deschaumes S., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology*. 6: 301-312.
- Muller S., Schmidt A. 1986. Substrate-dependent arylsulfatase activity in the cyanobacterium *Plectonema* 73110. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences*. 41: 820-824.
- Murooka Y. Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashi M. 1990. A sulfur- and tyramine- regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.
- Murooka Y., Azakami H., Yamashi M. 1996. The monoamine regulon including syntheses of arylsulfatase and monoamine oxidase in bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60: 935-941.
- Murooka Y., Adachi T., Okamura H., Harada T. 1977. Genetic control of arylsulfatase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 130: 74-81.
- Ndiaye E.L., Sandeno J.M., Mc Grath D., Dick R.P. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*. 15: 26-36.
- Nguyen C. 2007. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour la plante. Ecole Doctorale Ressources, Produits, Procédés, Environnement, Habilitation à Diriger des Recherches, Nancy. 136 pp..
- Nguyen C., Todorovic C., Robin C., Christophe A., Guckert A. 1999. Continuous monitoring of rhizosphere respiration after labelling of plant shoots with ¹⁴CO₂. *Plant and Soil*. 212: 191-201.

- Nicholls R.G., Roy A.B. 1971. Arylsulfatases. *In* : The Enzymes. Boyer, P.D., (Ed.) Academic, New York. Oades. Vol 5. pp. 21-41.
- Norton J.M., Firestone M.K. 1991. Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of Ponderosa pine seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*. 22: 449-455.
- Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., McNicol J.W., Prosser J.I. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6784-6792.
- Oades J.M. 1977. Mucilages at the root surface. *European Journal of Soil Science*. 29: 1-16.
- Osteras M., Boncompagni E., Vincent N., Poggi M.C., LeRudulier D. 1998. Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 11394-11399.
- Ostrowski J., Kredich N.M. 1989. Molecular characterization of the *cysJIIH* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by CysB protein and N-acetyl-L-serine. *Journal of Bacteriology*. 171: 130-140.
- Ostrowski J., Kredich N.M. 1990. *In vitro* interactions of CysB protein with the *cysJIIH* promoter of *Salmonella typhimurium*: inhibitory effects of sulfide. *Journal of Bacteriology*. 172: 779-785
- Parenti G., Meroni G., Ballabio A. 1997. The sulfatase gene family. *Current Opinion in Genetics and Development*. 7: 386-391.
- Paterson E., Sim A. 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and Soil*. 216: 155-164.
- Paterson E., Sim A. 2000. Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1449-1457.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 1999. *Microbiologie* (3ème Eds). DeBoeck Université (Ed.) Bruxelles Belgique. 1014 pp..
- Quadroni M., Staudenmann W., Kertesz M.A., James P. 1996. Analysis of global response by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis : Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 239: 773-781.
- Quan J.A., Schneider B.L., Paulsen I.T., Yamada M., Kredich N.M., Saier Jr M.H. 2002. Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. 148: 123-131.
- Rammler D.H., Grado C., Fowler L.R. 1964. Sulfur metabolism of *Aerobacter aerogenes*. I. A repressible sulfatase. *Biochemistry*. 3: 224-230.

- Roberts R.B., Abelson P.H., Cowie D.B., Bolton E.T., Britten R.J. 1955. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Institution Washington DC, 521 pp..
- Rouzaud G., Rabot S., Ratcliffe B., Duncan A.J. 2003. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*. 90: 395-404.
- Rovira A.D. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pesticide Science*. 4: 361-366.
- Rovira A.D. 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review*. 35: 35-55.
- Roy A.B. 1960. The synthesis and hydrolysis of sulfate esters. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. 22: 205-235.
- Saggar S., Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1981. Measurement of microbial sulphur in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 13: 493-498.
- Saint-Girons I., Parsot C., Zakin M.M., Bâzu O., Cohen G.N. 1988. Methionine biosynthesis in Enterobacteriaceae: Biochemical, regulatory, and evolutionary aspects. *Critical Reviews in Biochemistry*. 23: 1-42.
- Sands D.C., Rovira A.D. 1971. *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizosphere. *Journal of Applied Bacteriology*. 34: 261-275.
- Sardiello M., Annunziata I., Roma G., Ballabio A. 2005. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*. 14: 3203-3217.
- Scherer H.W. 2001. Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy*. 14: 81-111.
- Schirmer A., Kolter R. 1998. Computational analysis of bacterial sulfatases and their modifying enzymes. *Chemistry & Biology*. 5: 181-186.
- Schönwitz R., Ziegler H. 1989. Interactions of maize roots and rhizosphere microorganisms. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152: 217-222.
- Schönwitz R., Ziegler H. 1982. Exudation of water-soluble vitamins and of some carbohydrates by intact roots of maize seedlings (*Zea mays* L.) into a mineral nutrient solution. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 107: 7-14.57.
- Seitz A.P., Leadbetter E.R., Godchaux I.W. 1993. Utilization of sulfonates as sole sulfur source by soil bacteria including *Comamonas acidovorans*. *Archives of Microbiology*. 159: 440-444.
- Siciliano S.D., Theoret C.M., De Freitas J.R., Hucl P.J., Germida P.J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 844-851.

- Simon-Sylvestre G. 1969. Les sulfates solubles du sol. *Annales Agronomiques*. 25: 645-653.
- Singh B.K., Munro S., Potts J.M., Millard P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology*. 36: 147-155.
- Smalla K.G., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Smit E., Leeftang P., Gommans S., Van Den Broek J., Van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
- Sommer K., Sudau M., Kasten P. 1986. Stichprobenuntersuchungen zur Schwefelversorgung des Weizens in Nordhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. *Kali Briefe (Büntehof)*. 18: 1-12.
- Steer J., Harris J.A. 2000. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biology & Biochemistry*. 32: 869-878.
- Stevenson F.J., Cole M.A. 2005. The sulfur cycle. *In*: Stevenson F.J., Cole M.A. (Eds) . *Cycle of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Wiley J. and Sons, New York. pp. 333-335.
- Stevenson F.J., Cole M.A. 1999. The sulfur cycle. *In*: Stevenson F.J., Cole M.A. (Eds) . *Cycle of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Wiley J. and Sons, New York. pp. 340-348.
- Stewart J.W.B. 1984. Interrelation of carbon, nitrogen, sulfur, and phosphorus cycles during decomposition processes in soil. *In*: Reddy, C.A., Klug, M.J. (Eds). *Current Perspectives in Microbial Ecology. Proceedings of the 3rd International Symposium, American Society of Microbiology, Washington DC*. Pp. 442-446.
- Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli, India. p14.
- Suhardi. 1992. Importance du soufre organique du sol dans la nutrition soufrée du blé (*Triticum aestivum* L.). Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France, 147 p.
- Szameit C., Miech C., Balleininger M., Schmidt B., von Figura K., Dierks T. 1999. The iron sulfur proteine AtsB is required for a posttranslational formation of formylglycine in the *Klebsiella* sulfatase. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 2071-2076.
- Tabatabai M.A. 1996. Sulphur. *In*: Sparks D.L. (Ed). *Methods of soil Analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Science Society of America. Book Madison. Series 5. pp. 921-960.

- Tabatabai M.A. 1994. Soil enzymes. *In*: Weaver R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicsek D., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. (Eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America. Book Madison. Series 5. pp. 775-833
- Tabatabai M.A. 1984. Importance of sulphur in crop production. *Biogeochemistry*. 1:45-62.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970a. Forms of sulfur and carbon, nitrogen and sulfur relationships in Iowa soils. *Soil Science*. 114: 380-386.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970b. Arylsulfatase activity in soils. Factors affecting arylsulfatase activity. *Proceedings - Soil Science Society of America*. 34: 225-229.
- Thomas O.R.T., Matts P.J., White G. 1988. Localization by electron microscopy of alkylsulphatases in bacterial cells. *Journal of General Microbiology*. 134:1229-1236.
- Traoré O., Groleau-Renaud V., Plantureux S., Tubeileh A., Boeuf-Tremblay V. 2000. Effect of root mucilage and modelled root exsudates on soil structure. *European Journal of Soil Science*. 51: 575-581.
- Tscherko D., Kandeler E. 1997. Ecotoxicological effects of fluorine deposits on microbial biomass enzyme activity in grassland. *European Journal of Soil Society*. 3: 329-335.
- Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1989. Genetic and biochemical analysis of the MetR activator-binding site in the *metE metR* control region of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 171: 5620-5629.
- Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1987. Regulation of the *metR* gene of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 169: 5841-5844.
- Uren N.C. 1993. Mucilage secretion and its interaction with soil, and contact reduction. *Plant and Soil*. 155/156: 79-82.
- Vermeij P., Wietek C., Kahnert A., Wüest T., Kertesz M.A. 1999. Genetic organization of sulfur-controlled aryl desulphonation in *Pseudomonas putida* S-313. *Molecular Microbiology*. 32: 913-926.
- Vis H., Goujard O. 2005. Comprendre la place du soufre dans la fertilisation. 7èmes rencontres COMIFER/GEMAS.
- Vong P.C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Benizri E., Guckert A. 2008. Sulphur immobilization and arylsulphatase activity in two calcareous arable and fallow soils as affected by glucose additions. *Geoderma*. 148: 79-84.
- Vong P.C., Nguyen C., Guckert A., 2007_a. Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type. *European Journal of Agronomy*. 27: 35-43.
- Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007_b. Water-Soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil*. 294: 19-29.

- Vong P.C., Dedourge O., Guckert A. 2004. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. *Plant and Soil*. 258: 227-239.
- Vong P.C., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1651-1661.
- Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2002. Mobilization of labeled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizosphere soil. *Journal of Plant Nutrition*. 25: 2191-2204.
- Wanner B.L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *In*: Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaetetcher M., Umberger H.E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2nd Ed. ASM Press. Washington DC. pp. 1357-1381.
- Wardle D.A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews*. 67: 312–358.
- Warembourg F.R. 1975. Applications de techniques radioisotopiques à l'étude de l'activité biologique dans la rhizosphère des plantes. *Revue d'Ecologie et de Biologie des Sols*. 12: 261-272.
- Watwood M.E., Fitzgerald J.W., Gosz J.R. 1986. Sulfur processing in forest soil and litter along an elevational and vegetative gradient. *Canadian Journal of Forest Research*. 16:689-695.
- Weissbach H., Brot N. 1991. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 5:1593-1597.
- Wheatley R., Ritz K., Griffiths B. 1990. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. *Plant and Soil*. 127:157-167.
- Whipps J.M. 1990. Carbon economy. *In*: Lynch. J.M. (Ed.) *The Rhizosphere*. Wiley J. and Sons, Chichester. pp 59-97.
- Whipps J.M., Lynch J.M. 1983. Substrate flow and utilization in the rhizosphere of cereals. *The New Phytologist*. 95: 605-623.
- Whiteley G.M., Dexter A.R. 1984. Displacement of soil aggregates by elongating roots and emerging shoots of crop plants. *Plant and Soil*. 77: 131-140.
- Wu J., O'Donnell A.G., He Z.L., Syers J.K. 1994. Fumigation – extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biology & Biochemistry*. 26: 117-125.
- Xu J.G., Juma N.G. 1993. Above-and below-ground transformation of photosynthetically fixed carbon by two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in a typical cryoboroll. *Soil Biology & Biochemistry*. 25: 1263-1272.

- Yamada K., Akasaka K., Shimada H. 1989. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 186: 405-410.
- Yang C.H., Crowley D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 345-351.
- Young M. 1998. Biophysical interactions at the root–soil interface: a review. *The Journal of Agricultural Science*. 130: 1-7.
- Zhao F.J., Lehmann J., Solomon D., Fox M.A., McGrath S.P. 2006. Sulphur speciation and turnover in soils: evidence from sulphur K-edge XANES spectroscopy and isotope dilution studies. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 1000-1007.
- Zhao F.J., McGrath S.P., Hawkesford M.J. 2001. Sulphur nutrition and the sulphur cycle. Available at: Institute of Arable Crop. Research Report. 2000-2001.
- Zhao F.J., Hawkesford M.J., Warrilow A.G.S., McGrath S.P., Clarkson D.T. 1996. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil*. 181: 317-327.
- Zhao F.J., Withers P.J.A., Evans E.J., Monaghan J., Salmon S.E., Shewry P.R., McGrath S.P. 1997. Sulphur nutrition : An important factor for the quality of wheat and rapeseed. *Soil Science and Plant Nutrition*. 43: 1137-1142.
- Zürrer D., Cook A.M., Leisinger T. 1987. Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 1459-1463.

Chapitre 2. Caractérisation et évolution de la taille et de la structure de la communauté bactérienne totale sous couvert d'orge (*Hordeum vulgare* var. Nikel) et de colza (*Brassica napus* var. Twister)

Caractérisation et évolution de la taille et de la structure de la communauté bactérienne totale sous couvert d'orge (*Hordeum vulgare* var. Nikel) et de colza (*Brassica napus* var. Twister)

Résumé

Le processus de rhizodéposition est connu pour moduler la structure, la densité et l'activité des communautés microbiennes dans l'environnement rhizosphérique. Dans ce cadre, nous avons caractérisé la structure de la communauté bactérienne sous 2 couverts végétaux différents, celui de colza et d'orge. Ces deux plantes sont en effet connues pour moduler différemment certaines activités microbiennes et libérer des rhizodépôts de quantité et de nature différentes. L'évolution de la structure de la communauté bactérienne a été suivie par Automated-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis et celle de la densité de la communauté bactérienne a été estimée par PCR quantitative. Il ressort que la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique varie entre $6,69 \cdot 10^9$ et $3,93 \cdot 10^{10}$ copies de l'ADNr 16S g^{-1} de sol sec et entre $9,35 \cdot 10^9$ et $5,64 \cdot 10^{10}$, respectivement sous couvert de colza et d'orge au cours de leur développement. Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les densités de la communauté bactérienne rhizosphérique aux différents stades de développement et entre les plantes. Ainsi, la quantité de carbone libéré dans la rhizosphère de colza, bien que plus importante que celle de l'orge, ne semble pas stimuler davantage la densité de la communauté bactérienne rhizosphérique. Concernant, l'évolution de la structure de la communauté bactérienne rhizosphérique, analysée par A-RISA, des différences importantes sont observées entre les deux couverts. Ainsi, le couvert de colza semble exercer une pression de sélection plus importante que celui d'orge. En conclusion, il ressort de cette étude un effet rhizosphère plus marqué sous couvert de colza que d'orge et les modifications de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques semblent être davantage dues à la nature des rhizodépôts qu'à la quantité de C libérés par les racines.

Mots-clefs

A-RISA, qPCR, communauté bactérienne rhizosphérique, colza, orge, structure génétique.

1. Introduction

Parmi les nombreux facteurs susceptibles de modifier le flux des photosynthétats aux racines et donc l'apport de carbone au sol, l'espèce végétale et le stade de développement sont prépondérants (van Veen *et al.*, 1989). De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'allocation vers les racines des photosynthétats chez différentes espèces de plantes (Warembourg et Paul, 1977 ; Whipps, 1987 ; van Veen *et al.*, 1989 ; Whipps, 1990 ; Zagal, 1994). Il apparaît notamment que la quantité d'exsudats est plus importante et de nature différente chez les dicotylédones que chez les monocotylédones ainsi qu'entre différentes espèces au sein de chacune de ces deux sous-classes (Hale et Moore, 1979 ; Curl et Truelove, 1986).

Durant la croissance de la plante, les racines produisent de nombreux composés organiques qui peuvent être libérés activement ou passivement dans le sol (Lynch et Whipps, 1990). Ainsi, du fait du processus de rhizodéposition, 40 à 90 % du carbone issu de la photosynthèse peuvent être transférés dans le sol. Ce processus représente alors un flux considérable de carbone dans la région rhizosphérique (Lynch et Whipps, 1990). Le carbone, ainsi libéré dans la rhizosphère, est à l'origine d'une structuration de la communauté microbienne ainsi que d'une stimulation de l'activité et de la taille de la biomasse microbienne (Bowen et Rovira, 1999 ; Lugtenberg et Dekkers, 1999 ; Baudoin *et al.*, 2003 ; Benizri et Amiaud, 2005 ; Bais *et al.*, 2006).

La rhizosphère est une zone du sol qui se caractérise donc par une augmentation de la teneur en carbone organique mais aussi par des caractéristiques physico-chimiques différentes de celles du sol non rhizosphérique. En effet, le développement de la racine provoque des phénomènes de compaction du sol (Tubehleh *et al.*, 2003) ainsi qu'une diminution de sa porosité (Foster et Bowen, 1982 ; Young, 1998). Par ailleurs, la présence de la racine induit d'une part, une modification du pH *via* l'excrétion de protons (Hinsinger *et al.*, 2006) et d'acides organiques et d'autre part, des phénomènes de compétition au sein de la microflore pour le carbone et les nutriments, notamment le fer (Lemanceau *et al.*, 1988).

Les microorganismes rhizosphériques jouent un rôle fondamental dans le cycle des nutriments et la croissance des plantes. En effet, ils peuvent améliorer la croissance des plantes par la production d'hormones et/ou l'augmentation de la disponibilité de nutriments qui peuvent être limitants dans les sols.

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'étudier la communauté bactérienne rhizosphérique sous deux couverts végétaux différents, au champ, se développant dans le même sol et de façon simultanée, afin de limiter toutes perturbations provoquées par des

facteurs abiotiques. Zagal (1994) rapporte que l'apport de carbone au sol, par rhizodéposition, est moins important sous couvert d'orge que sous colza. Néanmoins, peu d'éléments sont connus concernant les variations de la quantité et de la qualité des rhizodépôts, durant la croissance du colza qui possède des besoins en nutriments, notamment le soufre, plus élevé que l'orge. De plus, le colza peut libérer des composés biocides dans l'environnement rhizosphérique, contenant un ou plusieurs atomes de soufre. Ces composés biocides exsudés peuvent alors affecter la communauté bactérienne rhizosphérique (Kim *et al.*, 1994). Dans ce sens, Schnug (1997) rapporte un effet biocide de certains métabolites secondaires exsudés par le colza envers la communauté microbienne potentiellement pathogène. Ainsi, ces métabolites secondaires, les glucosinolates, seraient impliqués dans la défense de la plante face à certains agents pathogènes (Schnug, 1997 ; Brader *et al.*, 2006). Toutefois, lorsque le colza subit une carence en soufre, cet effet biocide pour les microorganismes, *via* le processus de rhizodéposition, ne serait plus observé (Dubuis, 2004 ; Dubuis *et al.*, 2005).

Des études récentes montrent des différences d'activité microbienne entre les couverts d'orge et de colza. Ainsi, l'activité arylsulfatase (enzyme impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate) est supérieure dans la rhizosphère du colza par rapport à celle de l'orge (Vong *et al.*, 2002 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Dedourge *et al.*, 2004). Ceci pourrait s'expliquer par une différence qualitative et quantitative des rhizodépôts libérés par ces deux plantes.

Ainsi, les expérimentations réalisées, au cours de cette étude, ont pour but d'apprécier l'existence d'un effet structurant du colza par rapport à celui de l'orge, sur les communautés bactériennes telluriques. L'hypothèse sous-jacente est que la structuration de ces communautés est en partie due à la nature et/ou à la quantité de rhizodépôts exsudés par la plante, processus connu pour être différent entre ces deux plantes. Afin de tenir compte de la variation temporelle de la rhizodéposition, un suivi de la dynamique de la structure des communautés bactériennes telluriques, au cours de la phénologie de ces deux plantes, a été réalisé. Pour ce faire, nous avons utilisé l'outil A-RISA permettant la comparaison des structures génétiques des communautés bactériennes extraites. De plus, nous avons également appréhendé la densité des communautés bactériennes par l'outil de PCR en temps réel.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Prélèvements et Sol

Les prélèvements au champ ont été réalisés sur deux parcelles adjacentes, situées sur la commune de Martincourt (54), présentant un couvert de colza d'hiver (*Brassica napus* var. Twister) et un couvert d'orge d'hiver (*Hordeum vulgare* var. Nickel), durant une saison de culture. La rotation est colza-blé-orge dans le cas du colza et colza-orge de printemps-orge d'hiver dans le cas de l'orge. Les prélèvements de sol rhizosphérique ont été réalisés du 21 mars au 6 juin. Les cultures ont reçu d'une part, quelques jours avant le second prélèvement, en mars, un apport d'azote sous la forme d'urée et un apport soufré sous la forme de sulfate d'ammonium, respectivement de 45 kg ha⁻¹ et 18,75 kg ha⁻¹ pour le colza et de 40 kg ha⁻¹ et de 10 kg ha⁻¹ pour l'orge. Puis, un mois plus tard, 135 kg ha⁻¹ d'urée et 56,25 kg ha⁻¹ de sulfate d'ammonium ont été appliqués sur le colza et 120 kg ha⁻¹ d'urée et 30 kg ha⁻¹ de sulfate d'ammonium sur l'orge. Les apports de phosphore sous la forme de phosphate d'ammonium et de potassium sous la forme de chlorure de potassium ont été respectivement de 35 kg ha⁻¹ et 83 kg ha⁻¹ pour le colza et de 35 kg ha⁻¹ et 50 kg ha⁻¹ pour l'orge. Enfin, les traitements phytosanitaires classiques, propres à chaque culture, ont été effectués. Chaque parcelle a été subdivisée en cinq sous parcelles au niveau desquelles des plants de colza et d'orge ont été prélevés. Les prélèvements ont été réalisés de la reprise de végétation jusqu'à maturité (Tableau 1). Le sol est de type rendzine brunifié (Typic rendolls) et est représentatif des sols lorrains. Les principales caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras et sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 1 : Dates des prélèvements de sols et stades de développement des plantes.

	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5
Colza	Rosette	Boutons accolés	Boutons séparés	Floraison	Fin de floraison
Orge	Fin de tallage	Début Montaison	Courant montaison	Epiaison	Grains laitoux
	Stade végétatif		Stade reproducteur		

Tableau 2 Analyse physico-chimique du sol de Martincourt réalisée par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras.

Argile	Limon	Sable	MO	C	S	N	C/S	C/N	pH
							g kg ⁻¹ de sol		(eau)
357	301	309	38,8	28,8	0,59	3,1	48,8	9,29	8,2

2.2. Extraction et purification de l'ADN de sol

Le sol rhizosphérique, défini comme le sol adhérent aux racines vivantes, est directement prélevé, puis tamisé au laboratoire à 5 mm. Les échantillons de sol sont ensuite aliquotés à 250 mg et stockés à -20°C. L'ADN a été extrait de ces échantillons de sol selon la méthode de Martin-Laurent *et al.* (2001), par lyse mécanique dans un tampon d'extraction en présence de billes de verre (106 µm et 1 mm) dans un vibrobroyeur (pendant 30 sec à 1.600 rpm) et par différentes centrifugations successives. Les protéines, par la suite, ont été précipitées, par un ajout d'acétate de sodium à 3 M, puis ont été éliminées par une étape de centrifugation. Après précipitation à l'isopropanol à -20°C et lavage à l'éthanol 70 %, l'ADN subit plusieurs purifications successives, sur colonne de Sépharose puis sur colonne de PVPP et enfin par le kit de purification de l'ADN GeneClean, en suivant les instructions du fournisseur. Ensuite, l'ADN est congelé à -20°C jusqu'à son utilisation. L'ADN de chaque échantillon est déposé sur gel d'agarose à 1 % afin d'évaluer sa qualité. Il est ensuite dosé à 260 nm à l'aide d'un BioPhotometer (Eppendorf, Hambourg, Germany). Chaque échantillon d'ADN est dilué dans de l'eau Ultrapur à une concentration finale de 10 ng µl⁻¹.

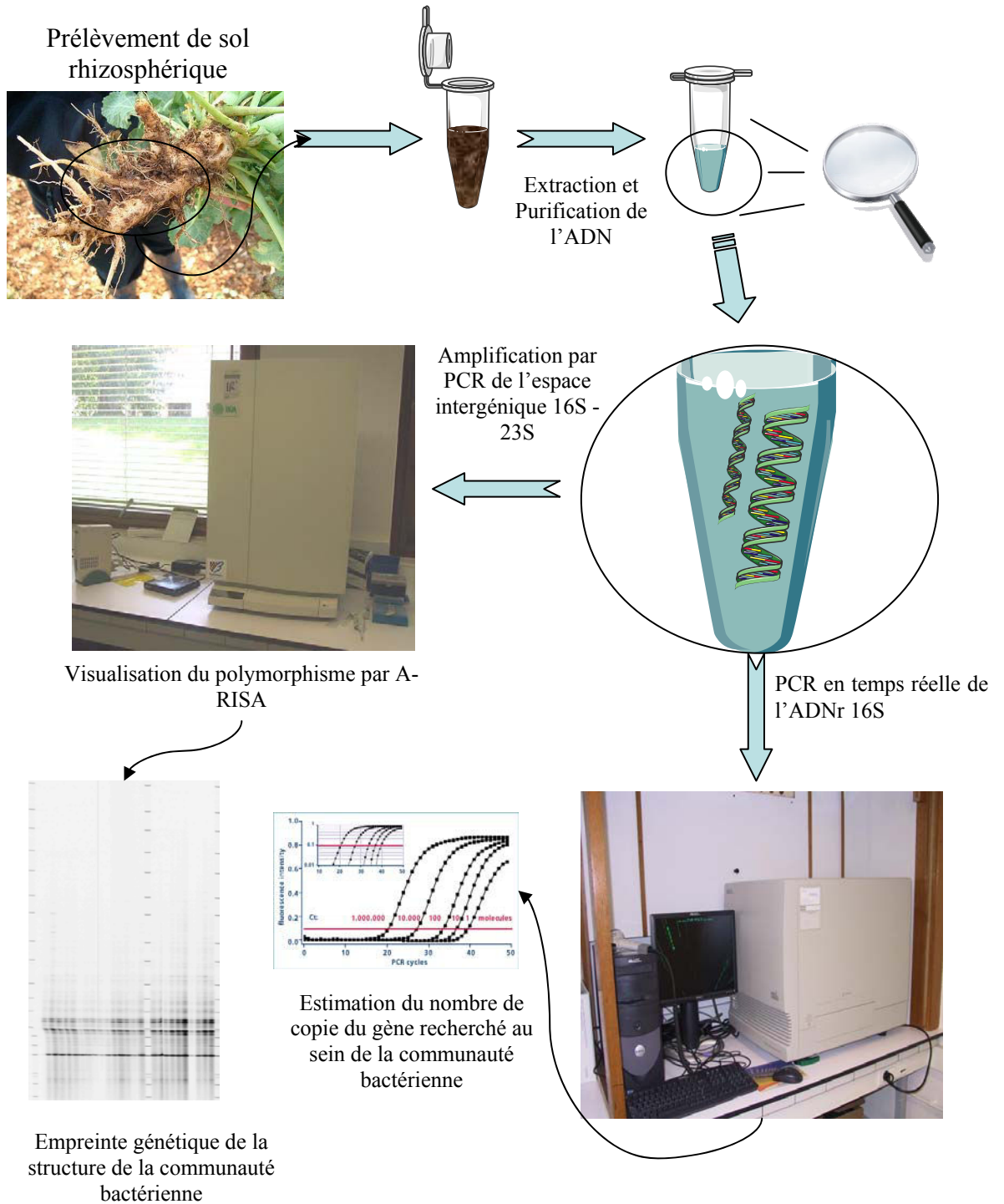
2.3. Quantification du gène de l'ARNr 16S par PCR en temps réel

Une quantification de l'ADNr 16S est réalisée, par PCR en temps réel, pour chaque échantillon, afin d'estimer le nombre de copies de gènes 16S présent et par conséquent d'approximer le nombre de bactéries présentes par µg d'ADN extrait. Une amplification de l'ADNr 16S est réalisée par PCR en temps réel, pour chaque échantillon à l'aide des amorces 341F (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3') et 515R (5' ATTCCGCGGCTGCTGGCA 3'). Le mélange réactionnel est effectué pour un volume final de 25 µl dans lequel 12,5 ng d'ADN sont mis en présence de 10 ng de QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Fr), de 40 ng µl⁻¹ de T4gp₃₂ et d'1µM de chaque amorce. Afin d'activer la Taq HotStar, le cycle se déroule à 95 °C pendant 15 min, puis 35 cycles de 15 sec à 95 °C, 30 sec à 60 °C, 15 sec à 72 °C et 30 sec à 80 °C (pour l'acquisition des données) sont effectués. Enfin, une étape de dissociation finale par un passage de 60 à 95 °C permet l'obtention d'une courbe de dénaturation spécifique de l'échantillon. La pureté des amplifiats est alors vérifiée par l'observation d'un unique pic de dénaturation (Henry *et al.*, 2004).

Un test de normalité de la distribution des échantillons est réalisé (test de Kolmogorov-Smirnov) à l'aide du logiciel Statbox pro (Grimmersoft, Fr). Enfin, une analyse statistique de type ANOVA est appliquée sur le jeu de données à l'aide du logiciel Statbox pro

(Grimmersoft, fr) afin de déterminer s'il existe des différences du nombre de copies de l'ADNr 16S entre les différents couverts et selon les dates de prélèvements.

Chapitre 2. Caractérisation et évolution de la taille et de la structure de la communauté bactérienne totale sous couvert d'orge et de colza



2.4. Analyse de la structure génétique des communautés bactériennes par A-RISA

Cette technique consiste à révéler le polymorphisme de longueur, par amplification de la région intergénique de l'opéron ribosomique, comprise entre les deux gènes de l'ADNr 16S et de l'ADNr 23S. En effet, contrairement à l'ADNr 16S et 23S codant les ARNm constituant les ribosomes, la région intergénique 16S-23S n'est pas soumise à une pression de sélection et présente, par conséquent, un polymorphisme de longueur qui permet une étude de la structure génétique de la communauté bactérienne. Un couple d'amorces universelles 1522-F (TGCGGCTGGATCCCCTCCTT) et 132-R (GCCGGGTTTCCCCATTCGG), ciblant respectivement les régions S-D-bact-1522-b-s-20 (fin de l'extrémité 3' du 16 S) et L-D-bact-132-aA-18 (fin de l'extrémité 3' du 23 S) a été utilisé. L'amorce reverse est marquée par un fluorochrome photosensible, l'IRD 800, qui permet la détection du brin d'ADN sur le gel de polyacrylamide. Le mélange réactionnel est effectué dans un volume final de 50 μ l avec 1 μ M de chaque amorce, 200 μ M de dNTPs, 5 μ M de tampon $MgCl_2$, 25 $ng\ \mu l^{-1}$ de T4gp₃₂ et 3 U de Taq polymérase (Mp Biomedicals, Fr) et 50 ng d'ADN. Le cycle défini est de 94 °C pendant 3 min, puis 25 cycles de 1 min à 94 °C, 30 sec à 55 °C et 1 min à 72 °C et enfin une élongation terminale est réalisée pendant 5 min à 72 °C. La vérification de l'amplification est effectuée sur un gel d'agarose à 1,5 %, qui est révélé, après migration à 80 V durant 1h, dans un bain de Bromure d'éthidium. A l'issue de l'amplification, les produits PCR relatifs à chaque échantillon de sol sont purifiés à l'aide du kit Minelute (Qiagen, Fr) en suivant les instructions du fournisseur. Par la suite, une quantification des amplifiats est réalisée, à l'aide du logiciel d'analyse d'images, ImageQuant (Amersham Biosciences), par l'intégration de la fluorescence des échantillons marqués au Bromure d'éthidium comparée à la fluorescence émise par une gamme étalon connue. Pour ce faire, les amplifiats à quantifier et une gamme de concentrations d'ADN connues sont révélés dans un bain de Bromure d'éthidium, après migration à 80 V durant 1h sur gel d'agarose à 1,5 %. Finalement, les échantillons sont dilués à une concentration de 10 $ng\ \mu l^{-1}$ dans de l'eau Ultrapur.

Enfin, les échantillons sont déposés et mis à migrer 12h à 1500V/80W sur un gel LiCor de polyacrylamide à 3,7 % en conditions dénaturantes. Les empreintes génétiques, obtenues suite à la migration électrophorétique, ont été traitées informatiquement (logiciel prepRISA) en tenant compte de la taille de chaque bande, de leur présence/absence et de leur intensité respective. Nous avons enfin, à partir de la matrice obtenue effectué une Analyse en Composantes Principales comme l'a rapporté Ranjard *et al.*, (2003) à l'aide du logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.*, 1997).

3. Résultats et discussion

3.1. Estimation de la taille de la communauté bactérienne rhizosphérique sous couvert de colza et d'orge

Les techniques de PCR en temps réel se sont, ces dernières années, imposées comme des techniques de références pour la mesure de la densité des communautés microbiennes dans les échantillons environnementaux, tels les sols, l'eau ou les sédiments (Stults *et al.*, 2001 ; Bach *et al.*, 2002 ; Dionisi *et al.*, 2003 ; Harms *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2006).

Une quantification de l'ADNr 16S a été réalisée par PCR en temps réel, afin de déterminer le nombre de copies du gène 16S présent dans les échantillons de sols prélevés. Afin de limiter l'effet des nombreux facteurs, en particulier abiotiques, comme la température, le pH et l'humidité qui pourraient moduler la densité de la communauté bactérienne du sol, nous avons réalisé les prélèvements de sol simultanément sous les deux couverts végétaux.

Dans le sol, sous colza, le nombre de copie de l'ADNr 16S varie entre $6,69.10^9$ et $3,93.10^{10}$ copies de gènes g^{-1} de sol sec, au cours des différents stades de développement de la plante, avec une moyenne de $2,29.10^{10}$ copies g^{-1} de sol sec (Figure 1). Sous orge, le nombre de copie de l'ADNr 16S est estimé entre $9,35.10^9$ et $5,64.10^{10}$ copies de gènes par g^{-1} de sol sec, au cours de la phénologie de la plante, avec une moyenne de $3,28.10^{10}$ copies de gènes par g^{-1} de sol sec. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles déjà mentionnées par Henry *et al.* (2006) à partir d'échantillons de sol provenant du site de Champs Noël (35) dont le ratio C/N est proche de celui du sol de Martincourt.

Il ressort de nos travaux qu'aucune différence significative d'abondance du nombre de copies de gènes 16S n'a pu être mise en évidence sous un couvert donné, au cours du temps. De plus, l'ANOVA n'a pas mis en évidence de différence significative du nombre de copies de gènes 16S entre les deux couverts ($P < 0,05$) et ceci quel que soit le stade de développement. Or, il est connu que l'apport de C au sol, issu du processus de rhizodéposition, diminue avec l'âge de la plante (Curl et Truelove, 1986). De plus, certains auteurs (Vong *et al.*, 2007) ont montré que le colza, dicotylédone, contient dans ses racines davantage de composés carbonés hydrosolubles (et pouvant être considérés comme étant, en partie, à l'origine de la rhizodéposition (Dilkes *et al.*, 2004)) que l'orge qui est une monocotylédone. Ainsi, nous aurions pu nous attendre à observer une densité bactérienne plus importante sous le couvert de colza comparée à celle observée sous couvert d'orge. Par conséquent, le fait qu'aucune différence significative du nombre de copies de gène n'ait été mise en évidence d'une part

entre les deux couverts et d'autre part pour chaque couvert entre les différents stades de développement est un résultat plutôt surprenant.

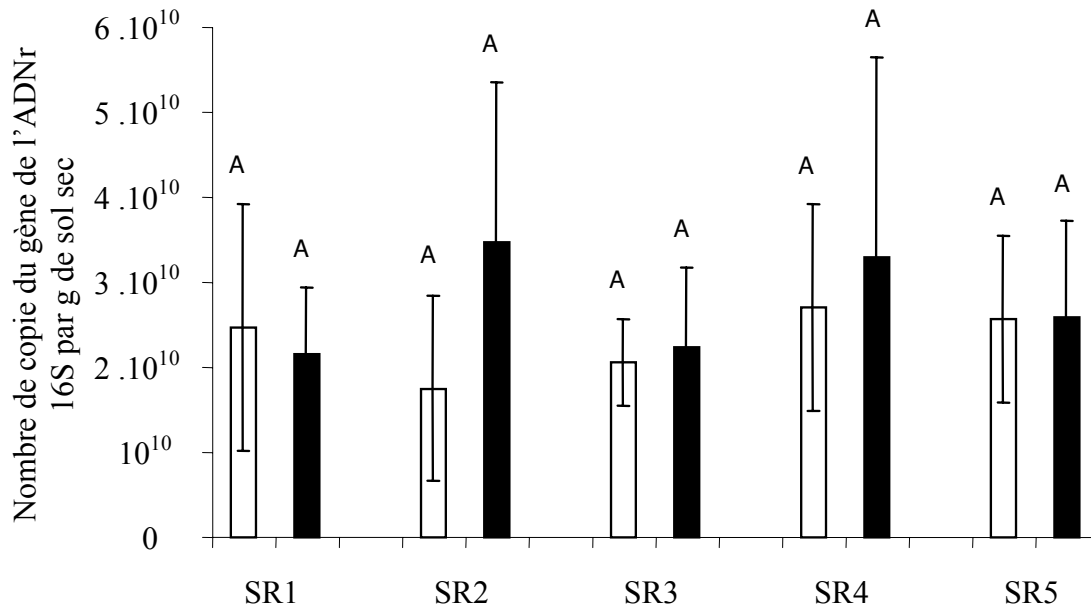


Figure 1 : Quantification du gène de l'ADNr 16S d'origine bactérienne, pour les sols rhizosphériques sous couvert de colza (barres blanches) et d'orge (barres noires) par gramme de sol. Les barres ($n = 5$) avec une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0.05$, (Test de Newman Keuls). Les points de prélèvements SR1 correspondent au stade Rosette et Fin de tallage, SR2 : à Boutons accolés et Début Montaison, SR3 : Boutons séparés et Courant Montaison, SR4 : Floraison et Epiaison et enfin SR5 : Fin de floraison et Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge

Toutefois, le fait de ramener une quantité de copie du gène 16S à un volume défini de sol peut biaiser la quantification. En effet, un biais dans la quantification peut notamment être induit par des rendements d'extraction d'ADN, variables entre les échantillons, qui pourraient notamment masquer des différences du nombre de copies de gènes de l'ADNr 16S (Martin-Laurent *et al.*, 2001). Ainsi, nous avons alors analysé l'évolution du nombre de copie du gène de l'ADNr 16S, ramené à une quantité définie d'ADN extrait pour chaque échantillon de sol (Figure 2) et non plus par g de sol. Il ressort de cette analyse que dans le sol rhizosphérique sous couvert de colza, le nombre de copies de gène 16S varie entre $2,6 \cdot 10^8$ et $1,42 \cdot 10^{10}$ copies de gènes μg^{-1} d'ADN extrait, au cours des différents stades de développement de la plante, avec une moyenne de $7,6 \cdot 10^8$ copie μg^{-1} d'ADN. Dans le sol rhizosphérique sous couvert d'orge, le nombre de copies de gène 16S est estimée entre $5,6 \cdot 10^8$ et $1,5 \cdot 10^9$ copies de gènes par μg^{-1} d'ADN extrait, au cours des différents stades de développement, avec une moyenne

de $9,7.10^8$ copies de gènes par μg^{-1} d'ADN de sol extrait. L'ANOVA met en évidence un nombre de copies de gènes 16S significativement supérieur sous couvert d'orge par rapport au colza ($P < 0,05$) et ceci à tous les stades de développement de la plante. Par contre, pour un même couvert, nous ne constatons aucune différence significative du nombre de copies de gènes 16S, au cours du temps. Ainsi, de manière globale et tous temps confondus, il ressort que le nombre de copies de l'ADNr 16S μg^{-1} d'ADN extrait sous couvert de colza est significativement moins important que celui déterminé sous couvert d'orge. Ce résultat suggère la présence d'une communauté bactérienne plus importante sous orge par unité d'ADN extrait ou une structure de communautés bactériennes différente entre les deux couverts. En effet, cette différence de structure pourrait notamment provenir de la présence d'une communauté bactérienne possédant plus de copies de 16S sous couvert d'orge que sous couvert de colza. Ainsi, les différences de nombre de copies de l'ADNr 16S entre les deux couverts pourraient résulter de la sélection de certains genres bactériens possédant un nombre de copies de 16S différent.

Ces différences entre les deux couverts pourraient être expliquées par la nature contrastée des rhizodépôts libérés par les deux plantes plutôt que par l'apport de C au sol. En effet, selon Klappenbach *et al.* (2000), le nombre de copies d'ADNr 16S varierait, au sein d'un microorganisme, suivant sa capacité de croissance. Ainsi, des bactéries, possédant une stratégie de développement dite « rapide », pourraient être favorisées du fait d'un nombre de copie de 16S élevé. Ce taux élevé de copie de 16S leur permettrait alors une croissance rapide dans un environnement eutrophe. Toutefois, le coût énergétique de production de nombreux ARNm codant pour le 16S induirait une limitation de l'efficacité du développement de ces microorganismes dans des environnements plus difficiles, comme les milieux oligotrophes. Ainsi, dans ces environnements oligotrophes, des bactéries, à stratégie dite « lente » avec peu de copie de 16S, pourraient être favorisées. Or, l'environnement rhizosphérique du colza est reconnu pour sa richesse en éléments carbonés et azotés et pouvant être à l'origine d'une stimulation d'activités microbiennes génériques telles la respiration ou notamment le turnover du soufre (Zagal, 1994 ; Dedourge *et al.*, 2003; Vong *et al.*, 2007). Ainsi, sous couvert de colza, qui semble libérer des quantités plus importantes de carbone et d'azote, nous aurions pu nous attendre à obtenir des concentrations de copies de gènes codant pour l'ADNr 16S par μg d'ADN extrait plus importantes que sous orge. Ces concentrations plus importantes auraient pu alors être expliquées par la richesse, en terme d'éléments carbonés et azotés, de l'environnement rhizosphérique du colza comparativement à celui de l'orge. Or, nos observations montrent une tendance inverse. Ainsi, la nature des rhizodépôts et non leur

quantité semblerait jouer un rôle déterminant dans la modulation du nombre d'ADNr 16S par μg d'ADN extrait. Afin de confirmer cette hypothèse, il conviendrait de caractériser les rhizodépôts du colza et de l'orge, même s'il est connu que l'orge ne produit pas de composés biocides potentiellement toxiques pour les microorganismes à la différence du colza.

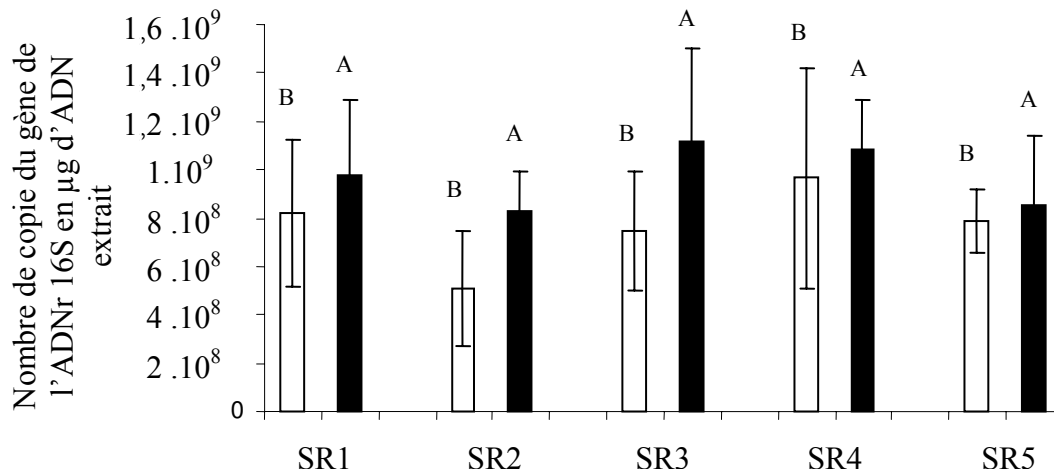


Figure 2 : Quantification du gène de l'ADNr 16S, pour les sols rhizosphériques sous couvert de colza (barres blanches) et d'orge (barres noires). Les barres ($n = 5$) avec une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0.05$, (Test de Newman Keuls). Les points de prélèvements SR1 correspondent au stade Rosette et Fin de tallage, SR2 : à Boutons accolés et Début Montaison, SR3 : Boutons séparés et Courant Montaison, SR4 : Floraison et Epiaison et enfin SR5 : Fin de floraison et Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge

En conclusion, le couvert de colza, qui possède une rhizodéposition différente de celle du couvert d'orge (Zagal, 1994 ; Vong *et al.*, 2002 ; Vong *et al.*, 2007), exercerait une pression de sélection se traduisant par un « effet couvert spécifique » plus marqué. Cet effet particulier du colza pourrait ainsi expliquer le nombre de copie d'ADNr 16S par μg d'ADN extrait moins important en comparaison avec l'orge. De plus, nous avons émis l'hypothèse que cet effet, sous couvert de colza, pouvait être davantage lié à la nature des rhizodépôts de la plante qu'à leur quantité. En effet, les racines de colza peuvent libérer des composés biocides provenant potentiellement de la dégradation des glucosinolates libérés dans le sol lors de la desquamation et la lyse des cellules racinaires (Osborn, 1996 ; Brader *et al.*, 2001). En outre, l'observation d'une différence du nombre de copie d'ADNr 16S par μg d'ADN entre les couverts (Figure 2) semble traduire le fait que la plante sélectionnerait des microorganismes différents qui sous orge, possèderaient plus de copies de 16S que sous colza. Ceci pourrait aboutir à une structure et/ou une diversité de la communauté bactérienne différente entre les

deux couverts. Afin de mieux interpréter, cet effet « couvert spécifique » et tenter d'appréhender l'influence de la nature de la rhizodéposition sur la communauté bactérienne, la caractérisation de la structure génétique de la communauté bactérienne sous chaque couvert a été réalisée par A-RISA.

3.2. Evolution de la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique sous couvert d'orge et de colza

Des amplifications de l'espace intergénique 16S-23S ont été conduites sur l'ADN directement extrait des échantillons de sols rhizosphériques de colza et d'orge à différents stades de développement. Les profils génétiques (Figure 3) obtenus sur les échantillons apparaissent complexes, à en juger par le nombre de bandes présentes. Les cinq répétitions d'un même traitement montrent des profils très similaires. De plus, elles rendent compte de la bonne reproductibilité de la méthode d'analyse choisie qui résulte à la fois de l'extraction d'ADN et de son amplification par PCR. L'observation visuelle des profils génétiques révèle l'existence de différences mineures entre les dates d'échantillonnage pour un même couvert (Figure 3). Ces différences sont principalement caractérisées par l'apparition ou la disparition de certaines bandes. Par ailleurs, la taille des bandes obtenues, sur le profil *b*-RISA, se situe entre 200 et 1600 paires de bases ce qui est en accord avec le polymorphisme de taille connu pour le fragment de l'espace intergénique bactérien 16S-23S (Mougel *et al.*, 2006).

L'effet spécifique des couverts de *Brassica napus* var. Twister et d'*Hordeum vulgare* var. Nikel a été analysé par une comparaison de la structure génétique des communautés bactériennes, présentes dans la rhizosphère (Figures 4, 5-A et 5-B). Pour cela, une matrice a été construite sur la base de la présence/absence des bandes, de leur poids moléculaire et de leur intensité à partir des gels LiCORS de polyacrylamide. Par la suite, la matrice a été traitée afin de réaliser une Analyse en Composantes Principales.

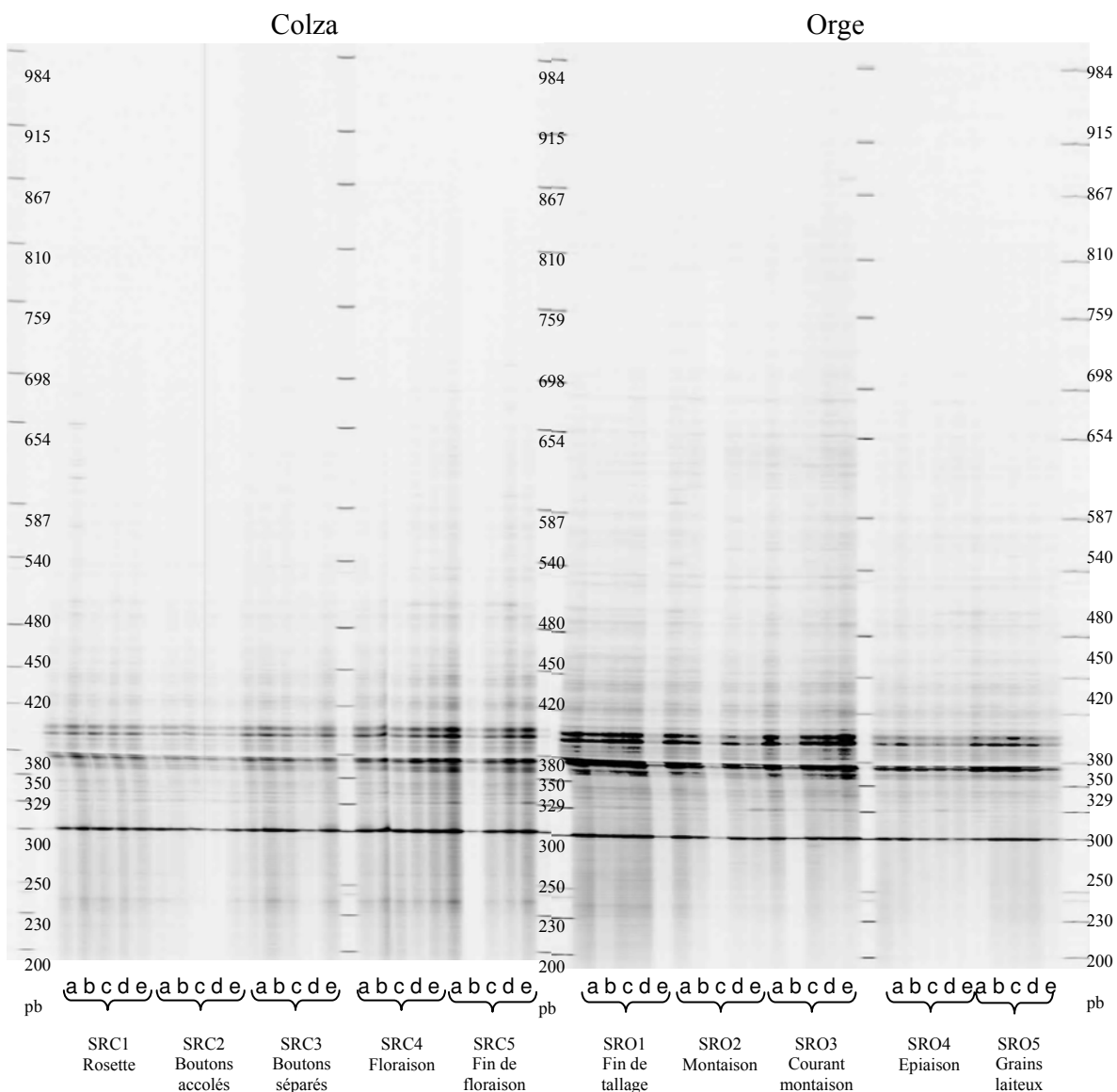


Figure 3 : Profil b-RISA (*bacterial-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) réalisé à partir de l'ADN extrait des sols rhizosphériques durant la phénologie du colza et de l'orge. Les points de prélèvements correspondent aux stades SRC1: Rosette et SRO1: Fin de tallage, SRC2 : aux Boutons accolés et SRO2 : Début Montaison, SRC3 : aux stades Boutons séparés et SRO3 : Courant Montaison, SRC4 : aux stades Floraison et SRO4 : Epiaison et enfin SRC5 au stade Fin de floraison et SRO5 Grains laitieux respectivement pour le colza et l'orge

Une première ACP a été réalisée afin de comparer la structure génétique des communautés bactériennes extraites sous les deux types de couverts. Les axes PC 1 et PC 2 représentent respectivement 42,19 % et 15,64 % de la variabilité totale (Figure 4). Cette ACP révèle l'influence de l'environnement rhizosphérique sur la structuration de la communauté bactérienne tellurique. Ainsi, il apparaît notamment que seule la structure génétique de la communauté bactérienne tellurique sous couvert de colza en fin de floraison est proche de la structure génétique de la communauté bactérienne tellurique sous couvert d'orge. Par ailleurs,

sous couvert d'orge, la structure génétique de la communauté bactérienne tellurique évolue peu au cours de la phénologie. Toutefois, pour chaque couvert végétal, les différences observées, entre les différentes dates de prélèvements, ne sont pas assez prononcées pour déterminer une influence spécifique de la plante au cours du temps. Ainsi, une Analyse en Composantes Principales pour chaque couvert a été réalisée afin de suivre l'évolution temporelle de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques, indépendamment.

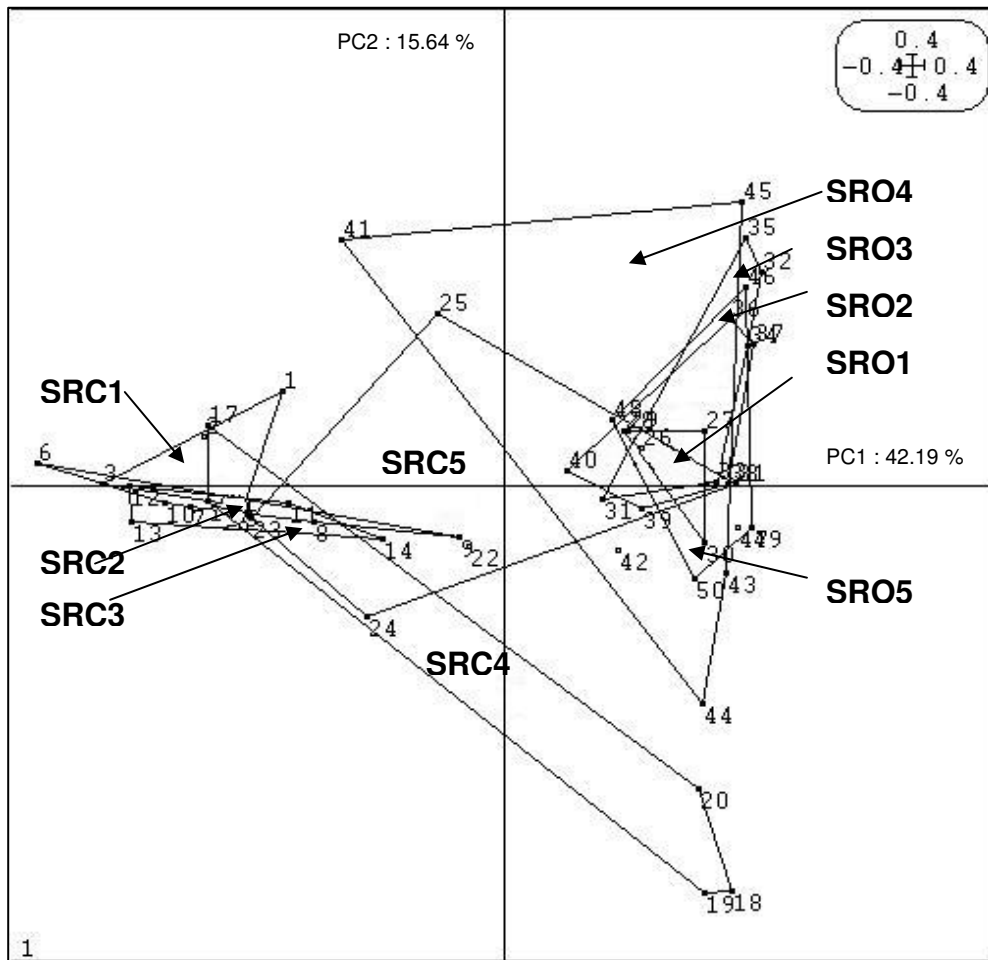


Figure 4 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza et d'orge. Les points de prélèvements correspondent aux stades SRC1: Rosette et SRO1: Fin de tallage, SRC2 : aux Boutons accolés et SRO2 : Début Montaison, SRC3 : aux stades Boutons séparés et SRO3 : Courant Montaison, SRC4 : aux stades Floraison et SRO4 : Epiaison et enfin SRC5 au stade Fin de floraison et SRO5 Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge (n=5)

Les Analyses en Composantes Principales semblent indiquer l'existence d'une évolution temporelle de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques différente

entre les deux couverts végétaux. Le plan principal de l'Analyse en Composantes Principales (plan F_1 - F_2) explique 79 % de l'inertie totale pour les deux premiers axes sous couvert de colza et contre 55 % sous couvert d'orge.

Sous couvert de colza (Figure 5-A), l'axe PC 1, qui explique 66,66 % de l'inertie totale, semble discriminer fortement la structure génétique de la communauté bactérienne présente lors de la floraison *i.e.* stade floraison (coordonnées positives sur l'axe PC 1) de celles observées avant et après floraison *i.e.* stades : rosette, boutons accolés, boutons séparés et fin de floraison (coordonnées négatives sur l'axe PC 1). L'axe PC 2, représente 12,88 % de l'inertie totale et discrimine fortement la structure génétique des communautés bactériennes sous couvert de colza lors du stade floraison (coordonnées positives sur l'axe PC 2) de celle présente lors de la fin de floraison (coordonnées négatives sur l'axe PC 2). Enfin, les structures génétiques des communautés bactériennes rhizosphériques relatives aux stades rosette, boutons accolés et boutons séparés qui précèdent la période de floraison se superposent dans la mesure où leurs points représentatifs montrent des coordonnées proches dans le plan principal. Ainsi, aucune évolution temporelle marquée de la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique sous couvert de colza ne peut être établie avant le stade de floraison. Cette structuration n'apparaît qu'au stade floraison et ensuite, la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique montre un profil proche de celui observé à l'état initial.

Sous couvert d'orge, le plan principal de l'Analyse en Composantes Principales (plan F_1 - F_2) explique 55 % de l'inertie totale (Figure 5-B). Cette analyse montre une évolution de la structure génétique de la communauté bactérienne au cours du temps, relativement similaire à ce qui a été observé sous couvert de colza. En effet, sur l'axe PC 2 (17 % de l'inertie totale) les points correspondant à la structure génétique des communautés bactériennes avant l'épiaison *i.e.* stades fin tallage, début montaison et courant montaison (coordonnées négatives sur l'axe PC 2) s'opposent clairement à ceux correspondant à la structure génétique de la communauté bactérienne lors de l'épiaison (coordonnées positives sur l'axe PC 2). Enfin, les communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert d'orge lors du stade des grains laiteux semblent présenter une structuration génétique intermédiaire à celles des communautés bactériennes rhizosphériques avant et au cours de l'épiaison. Par contre, l'axe PC 1 (38,4 % de l'inertie totale) n'apparaît rendre compte que de la variabilité intra répétitions sans pour autant discriminer de structures génétiques particulières entre les différents stades phénologiques.

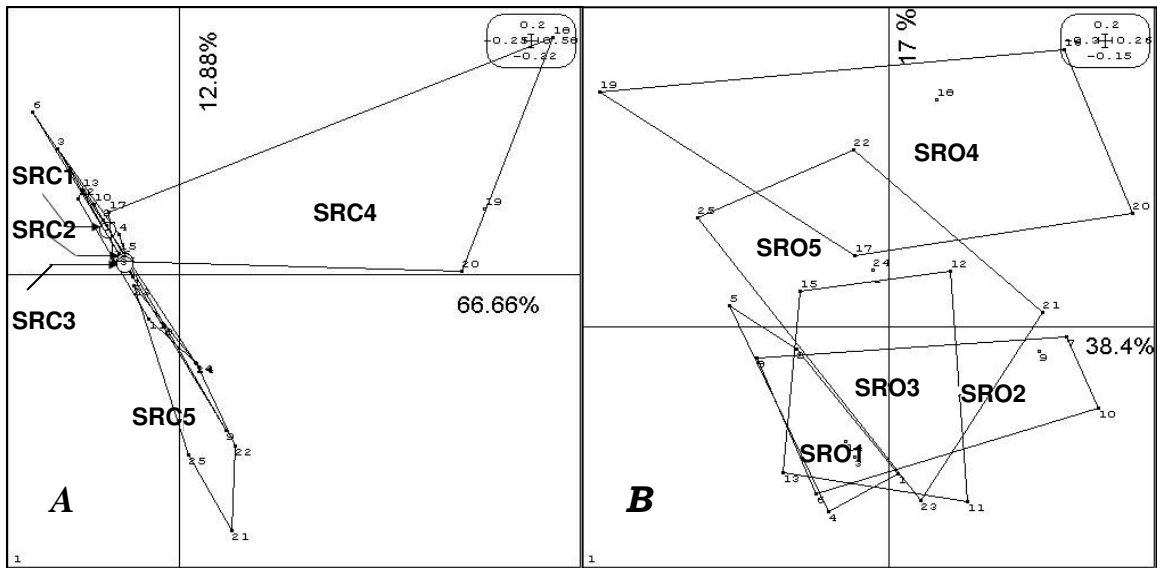


Figure 5: Analyses en Composantes Principales de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza (A) et d'orge (B). Les points de prélèvements SRC1 et SRO1 correspondent aux stades Rosette et Fin de tallage, SRC2 et SRO2 : aux stades Boutons accolés et Début Montaison, SRC3 et SRO3 : aux stades Boutons séparés et Courant Montaison, SRC4 et SRO4 : aux stades Floraison et Epiaison et enfin SRC5 et SRO5 : aux stades Fin de floraison et Grains laitex respectivement pour le colza et l'orge (n=5)

Ainsi, les Analyses en Composantes Principales semblent indiquer l'existence d'une évolution temporelle différente de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza et d'orge. En effet, nous constatons que la dynamique de la structure génétique de la communauté bactérienne rhizosphérique, sous couvert d'orge, apparaît moins marquée que celle sous couvert de colza. De plus, sous orge, il est à noter une certaine variabilité entre les différents prélèvements réalisés à un même stade, qui masque, en partie, la discrimination liée à la phénologie de la plante. A l'inverse, sous colza, le phénomène de structuration de la communauté bactérienne rhizosphérique semble plus marqué au cours du développement de la plante. Or, il est connu que la nature et la quantité des composés exsudés varient au cours du temps et diminuent en particulier lors des stades reproducteurs des végétaux (Kuzyakov et Domanski, 2000). En effet, lors de la période reproductrice, les composés organiques solubles sont redirigés vers les organes reproducteurs. Ainsi, la part de carbone alloué au sol provenant des photosynthétats diminue, au cours du temps, avec l'âge de la plante (Kuzyakov et Domanski, 2000). Cette diminution pourrait donc expliquer la discrimination nette de la structure des communautés bactériennes observées entre les dates de prélèvement SR4 et SR5, ceci pour les deux couverts (avec pour SR4 floraison et épiaison et pour SR5 fin de floraison et grains laitex, respectivement pour le colza et l'orge). Par

contre, il semble que la nature des rhizodépôts soit sans doute également à l'origine de la structuration génétique plus marquée de la communauté bactérienne issue de la rhizosphère de colza. En effet, l'exsudation de composés, propres au colza, pourrait expliquer cette évolution plus marquée sur la structure génétique de cette communauté microbienne rhizosphérique (Tierens *et al.*, 2001 ; Brader *et al.*, 2001, 2006). Ainsi, la plante, par son effet rhizosphère, pourrait ainsi modifier spécifiquement la structure, la densité mais aussi certaines activités de la communauté bactérienne selon le type de couvert.

Nous constatons également, à partir des Analyses en Composantes Principales, un phénomène particulier et commun pour les deux couverts que Gunderson (2000) a défini comme étant le phénomène de résilience. Il s'agit de la capacité d'un système à retourner à son état de stabilité initial après perturbation. Cet effet a également été observé par Mougel *et al.*, (2006) sur *Medicago truncatula* cv. Jemalong J5, en conditions contrôlées. Ainsi, ce phénomène de résilience, qui apparaît plus marqué sous colza que sous orge dans notre étude, pourrait donc s'expliquer en partie par un apport de carbone au sol différentiel au cours du temps. En effet, les rhizodépôts, dont la composition varie au cours du temps, sont connus pour modifier la structure (diversité et abondance) des communautés microbiennes rhizosphériques (Smalla *et al.*, 2001). Or, lors de la floraison, les composés organiques solubles sont redirigés vers les organes reproducteurs et la part de carbone alloué au sol diminue ainsi avec l'âge de la plante (Kuzyakov et Domanski 2000). Ainsi, l'apport de rhizodépôts au sol, moins important en fin de floraison, semble induire une structuration des communautés bactériennes rhizosphériques proche de celle observée lors du repos végétatif (sortie hiver, SR1). En conclusion, la diminution de la rhizodéposition de la plante, après la floraison, semble induire une restructuration de la communauté bactérienne rhizosphérique semblable à celle observée lorsque la plante est en phase du repos végétatif.

En conclusion, le colza est à l'origine d'un effet rhizosphère plus marqué et en conséquence d'une structuration de la communauté bactérienne totale du sol différente de celle sous couvert d'orge. Cet effet structurant semble davantage s'expliquer par la nature des rhizodépôts que par leur quantité. Par contre, il ressort de nos travaux que cet effet rhizosphère est à l'origine d'une réorganisation de la structure génétique de la communauté microbienne plus marquée sous colza que sous orge sans pour autant avoir de conséquence sur la densité de la communauté bactérienne totale, estimée par qPCR (et ramenée par g^{-1} de sol sec), ceci au cours du temps. Toutefois, cette densité, exprimée en nombre de copies de l'ADNr 16S μg^{-1} d'ADN extrait, apparaît plus faible sous rhizosphère de colza que sous celle

d'orge. Ainsi, malgré une rhizodéposition plus riche en C que celle de l'orge, le colza semblerait exercer une pression de sélection plus importante sur la communauté bactérienne rhizosphérique. En conclusion, l'effet rhizosphère du colza, à l'origine de la libération de composés biocides semble limiter l'augmentation de la taille de la communauté bactérienne, comparativement à celle observée sous orge. Enfin, cette étude est à notre connaissance, la première à mettre en évidence un effet proche d'un phénomène de résilience au sein de la communauté bactérienne rhizosphérique, lors du développement de la plante *in situ*, en conditions de plein champ.

Demeure, par contre, la question de savoir si cette structuration particulière, plus marquée chez le colza, est liée notamment aux besoins que montrent cette plante en certains nutriments comme le soufre (Vong *et al.*, 2002 ; 2007). En effet, le colza sélectionnerait-il par sa rhizodéposition, une communauté microbienne plus favorable à son développement et assurant, comme cela a déjà été montré par Vong *et al.* (2002 ; 2007) un meilleur turn-over du soufre par comparaison avec un couvert d'orge ? Pour répondre à cette question, nous avons voulu appréhender l'impact potentiel de ces deux plantes sur la communauté bactérienne fonctionnelle impliquée dans la minéralisation du soufre organique. Ainsi, une première approche portant sur le développement d'un milieu de culture sélectionnant la communauté bactérienne minéralisant la source de soufre organique majoritaire des sols agricoles a été réalisée. Puis, ce milieu de culture a été utilisé pour caractériser la communauté bactérienne cultivable minéralisant le soufre organique.

4. Références bibliographiques

- Bach H.J., Tomanova J., Schloter M., Munch J.C. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*. 49: 235-245.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with Plants and other Organisms. *The Annual Review of Plant Biology*. 57: 233–266.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil land maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1183-1192.

- Benizri E., Amiaud B. 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 2055-2064.
- Bowen G.D., Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *In: Sparks D.L., (Ed.), Advances in Agronomy, Vol. 66. Academic Press, New York. pp. 1-102.*
- Brader G., Tas E., Palva E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*. 126: 849-860.
- Brader G., Dalgaard Mikkelsen M., Halkier B.A., Palva .E.T. 2006. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *The Plant Journal*.46:758-767.
- Curl E.A., Truelove E. (Eds.). 1986. *The rhizosphere*, Springer-Verlag, New York. pp. 228.
- Dedouge O., Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 181-185.
- Dedouge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Gukert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science*. 55: 649-656.
- Dilkes N.B., Jones L.D., Farrar J.F. 2004. Temporal dynamic of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology*. 134: 706-715.
- Dionisi H.M., Harms G., Layton A.C., Gregory I.R., Parker J., Hawkins S.A., Robinson K.G., Sayler G.S. 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6597-6604.
- Dubuis P.H. 2004. Effect of sulfur deficiency on the resistance of oilseed rape to fungal pathogens and expression profiling of the glutathione Stransferase family of *Arabidopsis thaliana*. Institute of Plant Biology University of Fribourg (Switzerland) Thesis No. 1442.
- Dubuis P.H., Marazzi C., Städler E., Mauch F. 2005. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *Journal of Phytopathology*. 153: 27–36.
- Foster R.C., Bowen G.D. 1982. Plant surfaces and bacterial growth: the rhizosphere and rhizoplane. *In: Mount M.S., Lacy G.H. (Eds) Phytopathogenic prokaryotes, vol 1. Academic Press, New York. pp. 159–185.*
- Gunderson L.H. 2000. Ecological resilience- in theory and application. *Annual Review Ecology Systematics*. 31: 425-439.
- Hale M.G., Moore L.D. 1979. Factors affecting root exudation II: 1970-1978. *In Advances in Agronomy. Brady N.C. (Ed.),. Academic Press, London Vol. 31. pp. 93-124.*

- Harms G., Layton A.C., Dionisi H.M., Gregory I.R., Garrett V.M., Hawkins S.A., Robinson K.G., Saylor G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*. 37: 343-351.
- Henry S., Baudoin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 54: 327-335.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5181-5189.
- Hinsinger P., Plassard C., Jaillard B. 2006. Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. [Journal of Geochemical Exploration](#). 88: 210-213.
- Kim D.H., Kim B., Kim H.S., Sohng I.S., Kobashi K. 1994. Sulfation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17:1326-1328.
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. 2000. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1328-1333.
- Kuzyakov Y., Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163: 421-431.
- Lemanceau P., Samson R., Alabouvette C. 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies.XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*. 8: 243-249.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C. 1999. What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*. 1: 9-13.
- Lynch J.M., Whipps J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 129: 1-10.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C. Soulas G, Catroux G. 2001. DNA extraction from Soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2354-2359.
- Mougel C., Offre P., Corberand T., Robin C., Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn cv. Jemalong J5. *The New Phytologist*. 170: 165-175.
- Osbourn A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant and Cell*. 8: 1821-1831.
- Ranjard L., Lejon D.P.H., Mougel C., Scherer L., Merdinoglu D., Chaussod R. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA

- fingerprint analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*. 5: 1111-1120.
- Schnug E. 1997. Significance of sulphur for the nutritional and technological quality of domesticated plants. *In* Cram W.J., De Kok L.J., Stulen I., Brunold C., Rennenberg H. (Eds). Sulfur metabolisms in higher plants - molecular, ecophysiological and nutritional aspects. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp.109-130.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Stults J.R., Snoeyenbos-West O., Methe B., Lovley D.R., Chandler D.P. 2001. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2781-2789.
- Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., Olivier J. M.. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistic and Computing*. 7: 75-83.
- Tierens K.F.M.J., Bart T.P.H.J., Brouwer M., Schmidt J., Kistner K., Porzel A., Mauch-Mani B., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology*. 125: 1688-1699.
- Tubeileh A., Groleau-Renaud V., Plantureux S., Guckert A. 2003. Effect of soil compaction on photosynthesis and carbon partitioning within a maize-soil system. *Soil and Tillage Research*. 71: 151-161.
- van Veen J.A., Merckx R., van de Geijn C. 1989. Plant- and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant and Soil*. 115: 197-188.
- Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2002. Mobilization of labeled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizosphere soil. *Journal of Plant Nutrition*. 25: 2191-2204.
- Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007. Water-soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil*. 294:19-29.
- Warembourg F.R., Paul E.A. 1977. The use of C¹⁴O₂ canopy techniques for measuring carbon transfer through the plant-soil system. *Plant and Soil* 38: 331-345.
- Whipps J.M. 1990. Carbon economy. *In*: The Rhizosphere., Lynch J.M. Mitchell J.M. (Eds) Wiley and Sons., Chichester. pp. 59-97.
- Whipps J.M. 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedlings grown in soil. *Plant and Soil*. 103: 95-100.

- Young M. 1998. Biophysical interactions at the root–soil interface: a review. *The Journal of Agricultural Science*. 130: 1-7.
- Zagal E. 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system (*Hordeum vulgare* L.), ryegrass (*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a ¹⁴CO₂-atmosphere. *Plant and Soil*. 166: 63-74.

Chapitre 3. Caractérisation de la communauté bactérienne cultivable minéralisant les esters de sulfate par des approches de microbiologie pasteurienne

Chapitre 3-1. Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate

Notre objectif est double : isoler des bactéries capables de produire l'enzyme arylsulfatase, mais aussi, développer un test rapide permettant l'étude de cette activité chez des bactéries cultivables, provenant d'échantillons environnementaux. Pour cela, nous avons développé dans un premier temps un milieu de culture gélosé sélectif et dans un second temps un test de mesure d'activité en milieu liquide.

A selective differential medium for detection and enumeration of arylsulfatase bacteria in soil. Séverine Piutti, **Mickael Cregut**, Sophie Slezack-Deschaumes, Isabelle Crovisier, Phuy Chhoy Vong and Emile Benizri. En préparation

Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate

Résumé

L'activité arylsulfatase est utilisée comme un indicateur de la qualité biologique des sols. Toutefois, si cette activité est d'origine microbienne, peu de travaux se sont intéressés à la caractérisation des microorganismes du sol possédant cette activité. Un milieu de culture sélectif désigné M9-X-Sulf a été développé afin de dénombrer et d'isoler des bactéries du sol et de la rhizosphère possédant cette activité. Les bactéries possédant l'activité arylsulfatase et capables de minéraliser les esters de sulfate ont pu être mises en évidence sur ce milieu sélectif par leur coloration bleue provenant du clivage du substrat chromogénique (X-Sulf) possédant une liaison ester-sulfate. Nos travaux ont concerné la rhizosphère du colza dans la mesure où diverses recherches réalisées au laboratoire ont mis en évidence une activité arylsulfatase importante sous ce couvert végétal. Nos résultats mettent en évidence une densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable variant entre 10^6 et 10^7 CFU g^{-1} de sol sec, sur la période de culture allant d'avril à juin. En outre, la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable présente une densité significativement plus importante en fin de saison comparée à celle observée en période de végétation. De plus, c'est durant cette même période que l'activité arylsulfatase augmente de façon significative dans le sol rhizosphérique. Ainsi, il semble exister un lien entre la densité de cette communauté bactérienne cultivable et l'activité arylsulfatase potentielle mesurée au champ. Par ailleurs, l'isolement et la caractérisation taxonomique des souches bactériennes, présentant une activité arylsulfatase, ont révélé une large diversité de bactéries affiliées aux Gram- (notamment des *Klebsiella sp.* et des *Pseudomonas sp.*) et affiliés aux Gram+ (notamment des *Microbacterium sp* et des *Rhodococcus sp.*).

Mots -clefs

Activité arylsulfatase, bactéries, rhizosphère de colza, milieu sélectif, minéralisation des esters de sulfate

1. Introduction

Les communautés bactériennes du sol sont fortement impliquées dans les cycles biogéochimiques des éléments minéraux. Parmi ces éléments, le soufre (S) est indispensable pour les crucifères, comme le colza. Dans les sols, le S est majoritairement présent sous forme organique (> 95 %), et est indisponible pour les organismes supérieurs comme les plantes. Les phénomènes de minéralisation du S organique dans les sols agricoles, qui résultent pour partie de l'activité arylsulfatase, sont responsables du clivage des esters de sulfate en sulfate (Tabatabai et Bremner, 1970). En outre, les esters de sulfate sont considérés comme une forme très labile et représentent également la forme majoritaire de S dans les sols agricoles (Bettany et Stewart, 1982 ; McLaren *et al.*, 1985). Ainsi, dans la mesure où dans les sols, l'élément S est fréquemment limitant pour la croissance des plantes, l'identification des microorganismes capables de synthétiser l'enzyme arylsulfatase semble importante afin de prédire la biodisponibilité potentielle du S.

Les souches bactériennes déjà caractérisées comme possédant l'enzyme arylsulfatase sont majoritairement des bactéries isolées d'environnements cliniques (Kertesz, 1999). Ainsi, l'identification de la communauté bactérienne tellurique possédant cette fonction arylsulfatase n'a jamais été abordée dans la littérature alors que de nombreuses études font état du suivi de cette activité comme indicateur de la qualité biologique des sols (Ndiaye *et al.*, 2000 ; De la Paz Jimenez *et al.*, 2002). Les milieux de culture traditionnellement utilisés en microbiologie sont des milieux non limitants, qui contiennent du S sous une forme minérale. Aussi, l'abondance et la diversité des bactéries possédant cette activité arylsulfatase obtenues après étalement de suspensions-dilutions de sol, sur ces milieux non limitants, pourraient être sous estimées. En effet, la quasi-totalité des arylsulfatases bactériennes sont réprimées sur des milieux de croissance contenant du sulfate alors qu'elles sont exprimées sur milieux ne contenant qu'une source de S organique (Dodgson *et al.*, 1982 ; Kertesz *et al.*, 1993).

Au cours de cette étude, un milieu de culture gélosé sélectif a été développé afin d'isoler, de dénombrer et de purifier, à partir d'échantillons de sol, des bactéries capables d'hydrolyser les esters de sulfate *via* l'activité arylsulfatase. Le milieu de culture est composé d'un milieu minéral M9 (Maniatis *et al.*, 1982) modifié afin d'exclure la présence de S minéral. Comme l'arylsulfatase clive la liaison entre le sulfate et l'oxygène du groupement aryl, cette activité est mise en évidence par l'addition d'un substrat chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate (X-Sulf) (100 mg l⁻¹) au milieu M9 gélosé. L'activité arylsulfatase est alors révélée par la coloration bleue de la colonie bactérienne (Wyss, 1989). Ce milieu minimal

standard M9-X-Sulf sans sulfate contient : 12,8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ l⁻¹, 3 g l⁻¹ de KH_2PO_4 , 0,5 g l⁻¹ de NaCl , 1 g l⁻¹ de NH_4Cl , 2,5 g l⁻¹ de glucose, 0,4 g l⁻¹ de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1,47 \cdot 10^{-2}$ g l⁻¹ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5 \cdot 10^{-6}$ g l⁻¹ de biotine, $5 \cdot 10^{-6}$ g l⁻¹ de thiamine, 100 mg l⁻¹ de cycloheximide, 0,1 g l⁻¹ de X-Sulf et 15 g l⁻¹ d'agar.

Dans l'objectif de valider l'utilisation de ce milieu pour la détection et le dénombrement de bactéries possédant l'activité arylsulfatase, des échantillons de sols rhizosphériques de colza ont été collectés d'avril à juin. Le choix de considérer le sol rhizosphérique de colza s'est imposé du fait que ce sol montre une forte activité arylsulfatase par comparaison à celle mesurée dans d'autres rhizosphères, comme l'orge (Vong *et al.*, 2004) ou dans un sol non cultivé.

2. Matériel et Méthodes

La densité des bactéries fonctionnelles a été déterminée par un comptage des colonies bleues (*i.e.* exprimant une activité arylsulfatase) après 10 jours d'incubation à 28 °C et exprimée en log de CFU g⁻¹ de sol sec.

Afin de confirmer la présence d'une activité arylsulfatase chez ces colonies, les souches bleues ont été isolées, purifiées et mises en culture dans 10 ml d'un milieu liquide de type M9 modifié, (même composition que précédemment mais sans agar et supplémenté en *p*-nitrophénylsulfate à 250 µM, une forme de S organique).

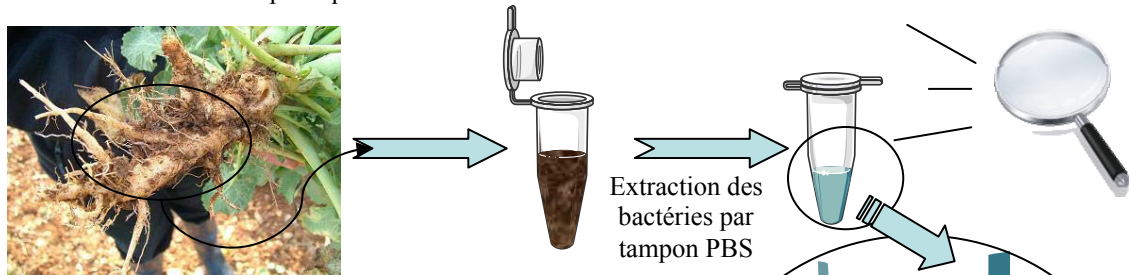
Après 96h de culture, l'activité arylsulfatase a été mesurée sur la suspension cellulaire. Pour ce faire, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 5000 g pendant 15 min et à 4 °C, puis le milieu de culture a été éliminé et le culot cellulaire a été rincé dans un milieu M9 stérile sans aucune source de S. L'opération a été réalisée à trois reprises afin d'éliminer toutes traces de S. Les cellules bactériennes ont finalement été reprises dans 1 ml de milieu M9 sans S. Puis, 25mM de *p*-nitrophénylsulfate (*p*-NPS) dans 4 ml tampon acétate à pH 5,8 ont été ajoutés à la suspension et mis à incuber à 37°C durant 2h. Après quoi, les cellules bactériennes ont été lysées par plusieurs chocs thermiques : à trois reprises la suspension cellulaire a été congelée 30 secondes dans l'azote liquide puis décongelée dans un bain marie à 30 °C. Les membranes cellulaires ont alors été éliminées par centrifugation durant 15 min à 13000 g et à 4 °C. Puis, le surnageant, contenant le cytoplasme et le milieu extracellulaire, a été filtré (Whatman, 0,22µm) afin de clarifier la solution.

Un dosage des protéines a été effectué, parallèlement à la mesure de l'activité arylsulfatase, afin de rapporter les valeurs de l'activité arylsulfatase obtenues à une concentration de

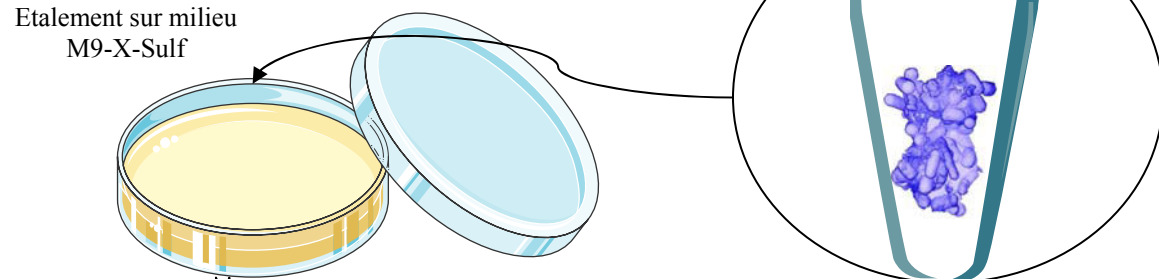
protéines totales. Pour ce faire, le dosage des protéines totales a été effectué par le test de micro-Bradford, où 250 µl de réactif de Bradford (Protein Assay Reagent, BioRad, Fr) ont été

Chapitre 3-1. Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquées dans la minéralisation des esters de sulfate

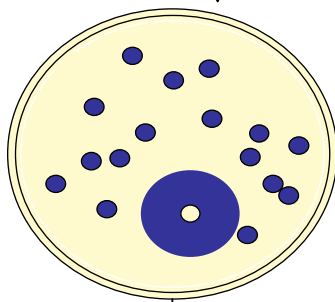
Prélèvement de sol rhizosphérique



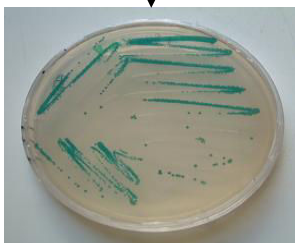
Étalement sur milieu M9-X-Sulf



Culture après 21 j



Purification des bactéries bleues par repiquage



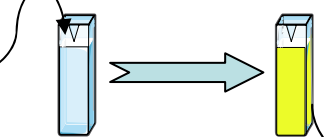
Amplification de l'ADNr 16S



Séquençage des amplifiats PCR et affiliation phylogénétique

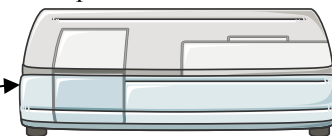


Test de l'activité arylsulfatase



(Tabatabai et Bremner, 1970)

Mesure de l'activité potentielle à 400 nm



mis en présence de 15 µl de la solution de lyse complétée dans 990 µl d'eau Ultrapur. Le mélange réactionnel a alors été mis à incuber 15 min à température ambiante. Puis, l'absorbance de la solution a été déterminée par dosage en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm (Varian, Fr). Enfin, la concentration en protéines a alors été estimée en rapportant l'absorbance mesurée à une gamme étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA) (Sigma, Fr) ayant des concentrations comprises entre de 10 µg et 150 µg de protéine ml⁻¹.

Concernant l'activité arylsulfatase, celle-ci a été déterminée par la quantification du *p*-nitrophénol (*p*-NP), qui est un des produits de l'hydrolyse de la liaison O-S du *p*-NPS catalysée par l'arylsulfatase. La quantification du *p*-NP libéré a été réalisée par une mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 400 nm correspondant à son absorbance maximale. Par la suite, la concentration de *p*-NP libéré a été estimée en rapportant l'absorbance mesurée à une gamme de concentration de *p*-nitrophénol connue. Enfin l'activité arylsulfatase mesurée a été exprimée en µg de *p*-nitrophénol produit mg⁻¹ de protéine h⁻¹.

3. Résultats et discussion

Les résultats mettent en évidence des densités de bactéries fonctionnelles cultivables de l'ordre de 10⁶ à 10⁷ CFU g⁻¹ de sol sec quelle que soit la date d'échantillonnage. La densité des bactéries fonctionnelles évolue au cours de la saison (Figure 1). En effet, la densité des

bactéries fonctionnelles augmente au fur et à mesure que la saison progresse, jusqu'à atteindre des valeurs maximales en juin. Par conséquent, il apparaît que l'utilisation du milieu M9-X-Sulf semble permettre un suivi de la densité de la communauté bactérienne cultivable minéralisant les esters de sulfate. En effet, les densités de la communauté bactérienne cultivable minéralisant les esters de sulfate sont significativement différentes au cours des différentes dates de prélèvements. Ainsi, l'analyse de variance met en évidence une densité de

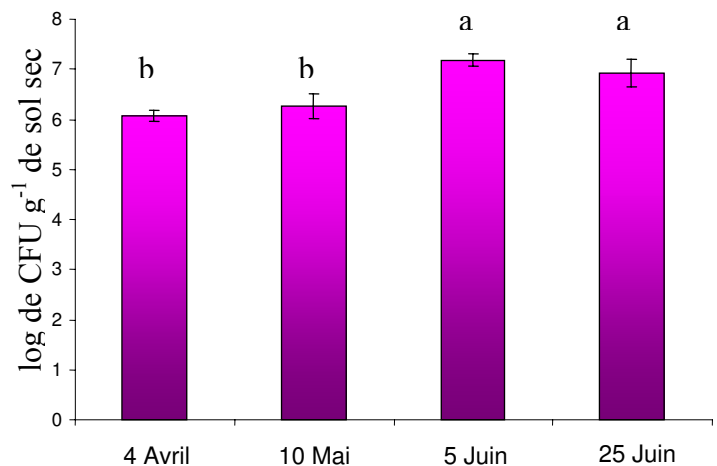


Figure 1 : Évolution de la densité des bactéries fonctionnelles cultivables au cours de la saison de culture du colza. Les moyennes (n=5) avec différentes lettres sont significativement différentes à P < 0.05

la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable statistiquement supérieure en fin de saison (juin) comparée à celle observée en période de végétation (avril-mai). L'utilisation de

ce milieu de culture semble donc intéressante pour étudier les variations de la densité de cette communauté bactérienne minéralisant les esters de sulfate. Afin de confirmer l'intérêt de l'utilisation de ce milieu de culture pour estimer la biomasse bactérienne minéralisant les esters de sulfate, des expérimentations du même type ont été réalisées pour d'autres sols ayant des propriétés physico-chimiques différentes. Il ressort de ces résultats que nous avons pu également estimer des densités de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable comprises entre 10^5 et 10^7 CFU g^{-1} de sol sec, ce qui souligne la robustesse de ce milieu, quel que soit le type de sol.

Les valeurs moyennes de l'activité arylsulfatase mesurées sur les échantillons de sol varient de 61 à 108 μg de *p*-nitrophénol g^{-1} sol sec h^{-1} , valeurs qui sont en accord avec celles obtenues lors de précédentes études (Chen *et al.*, 2001 ; Dedourge *et al.*, 2004 ; Vong *et al.*, 2003, 2004). De manière générale, les valeurs de l'activité arylsulfatase augmentent au cours du temps ($P < 0.05$), avec les valeurs les plus faibles mesurées en avril et les plus fortes lors des derniers points de prélèvements (Figure 2). Une régression linéaire effectuée entre la densité

des bactéries fonctionnelles et l'activité arylsulfatase mesurée au champ met en évidence un coefficient de détermination significatif ($R^2 = 0,589$, $P < 0,0001$). Même si ce coefficient de détermination n'est que de 0,589, dans la mesure où l'activité arylsulfatase potentielle, mesurée dans le sol, englobe à la fois l'activité liée à la microflore bactérienne et fongique mais aussi l'activité résiduelle extracellulaire (due notamment à la stabilisation de cette enzyme dans le

sol), ce résultat sous entend malgré tout un lien entre le nombre de bactéries cultivables fonctionnelles et l'activité arylsulfatase mesurée dans les échantillons de sol prélevés au champ. Ainsi, même si les bactéries fonctionnelles cultivables ne représentent probablement qu'une faible part de la communauté bactérienne fonctionnelle totale, leur densité, dans la rhizosphère du colza, apparaît bien corrélée à l'activité arylsulfatase potentielle mesurée sur les échantillons de sol.

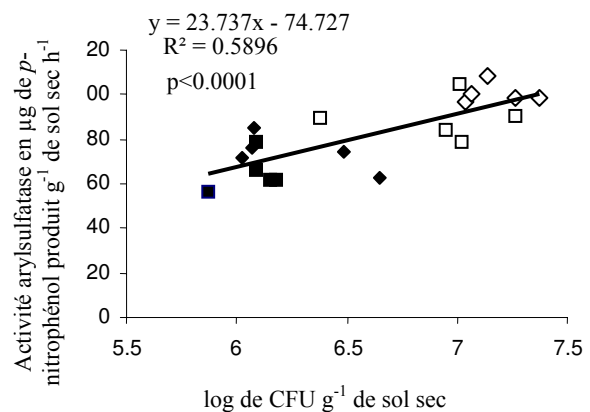


Figure. 2. Régression linéaire entre l'activité arylsulfatase en μg *p*-nitrophénol g^{-1} de sol h^{-1} et la densité bactérienne fonctionnelle en log de CFU g^{-1} de sol sec ■ 4 Avril, ◆ 10 Mai, □ 5 juin, ◇ 25 juin.

Par ailleurs, le substrat utilisé dans le milieu M9-X-Sulf, étant différent de celui utilisé pour la mesure de l'activité potentielle sur les échantillons de sol, nous avons décidé de tester le même substrat (*p*-nitrophénylesulfate) afin de vérifier que les souches bactériennes, isolées sur le milieu M9-X-Sulf, expriment l'activité arylsulfatase. Ainsi, ces dernières ont été mises en culture sur le milieu liquide M9 contenant comme seule source de soufre du *p*-nitrophénylesulfate. Les résultats mettent en évidence que les différents isolats testés expriment une activité arylsulfatase. En outre, ces isolats ont été caractérisés d'un point de vue taxonomique par le séquençage d'une partie de leur ADNr 16S. Les bactéries fonctionnelles isolées sur le milieu M9-X-sulf, sont affiliées à différents genres bactériens, (Gram + et Gram -) (Tableau 1). L'affiliation taxonomique des souches bactériennes possédant l'activité arylsulfatase semble en accord avec de précédentes études menées sur des isolats d'environnements cliniques (Tomioka *et al.*, 1990 ; Beil *et al.*, 1995). Ainsi, des γ -protéobactéries comme *Pseudomonas sp.* ou des Enterobactéries comme *Klebsiella sp.* et des Actinobactéries comme *Rhodococcus sp.* ont pu être isolées de la rhizosphère et présentent une activité arylsulfatase. Toutefois, au cours de cette expérimentation, aucune bactérie affiliée aux β -protéobactéries n'a pu être isolée de la rhizosphère du colza alors que ce groupe est fréquemment retrouvé dans cette zone du sol (Jenkins *et al.*, 2006). Si l'on se réfère aux travaux de Whitehead *et al.* (1952), l'activité arylsulfatase est faible chez les β -protéobactéries ce qui pourrait expliquer qu'aucun individu appartenant à ce groupe phylogénétique n'ait été isolé sur le milieu sélectif alors que ces bactéries sont largement répandues dans le sol et dans la rhizosphère (Di Cello *et al.*, 1997).

Parmi les β -protéobactéries, seule *Burkholderia cepacia* a été caractérisée comme capable de synthétiser une enzyme arylsulfatase. Sur cette souche, l'activité a été mesurée par l'utilisation d'un substrat autre que le X-Sulf, à savoir le 4-methylumbelliferyl sulfate (MUS). Avec ce substrat fluorogénique, les

Genre taxonomique	Activité arylsulfatase
<i>Klebsiella sp.</i>	+++
<i>Pseudomonas sp.</i>	+++
<i>Streptomyces sp.</i>	++
<i>Nocardia sp.</i>	++
<i>Rhodococcus sp.</i>	+++
<i>Ochrobactrum sp.</i>	++++
<i>Cryobacterium sp.</i>	+++
<i>Oerskavia sp.</i>	++
<i>Microbacterium sp.</i>	+++
<i>Sinorhizobium sp.</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	+++

Tableau 1 : Activité arylsulfatase des souches bactériennes. ¹*Pseudomonas aeruginosa* a été utilisé comme contrôle positif pour l'activité arylsulfatase : activité ARS +++++ > 10 ; 10 > +++ > 5 ; 5 > ++ > 1 ; 1 > + > 0,5 μ g de *pNP* libéré par heure et par mg de protéine

valeurs d'activité arylsulfatase mesurées pour *Burkholderia cepacia* sont 20 fois inférieures à celles mesurées chez *Pseudomonas aeruginosa* (Jansen *et al.*, 1999). Ainsi, différents substrats peuvent être utilisés pour révéler l'activité arylsulfatase. Parmi ces substrats, le substrat fluorogénique MUS semble être le plus sensible. Néanmoins, ce substrat ne peut être utilisé dans le milieu que nous avons mis au point du fait d'une diffusion trop importante de la 4-methylumbelliférolone (Wyss, 1989). Ainsi, un substrat de type MUS ne semble pas d'une utilisation aisée pour le dénombrement et l'isolement de bactéries fonctionnelles sur milieu solide d'une part, du fait de la diffusion de la 4-methylumbelliférolone dans le milieu et d'autre part, de la contrainte de comptage sous rayonnement UV, indispensable pour révéler la fluorescence.

En conclusion, le milieu sélectif que nous avons mis au point, et dont la spécificité semble validée pour d'autres types de sol, permet (i) d'estimer la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle qui apparaît de plus corrélée avec l'activité arylsulfatase potentielle mesurée dans des échantillons de sol prélevés au champ, (ii) d'isoler et de caractériser d'un point de vue taxonomique et fonctionnel des souches bactériennes impliquées dans la minéralisation du S organique des sols.

4. Références bibliographiques

- Beil S., Kehrl H., James P., Staudenmann W, Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). FEBS European Journal of Biochemistry. 229: 385-394.
- Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli, India. pp. 14.
- Chen C.R., Condon L.M., Davis M.R., Sherlock R.R. 2001. Effects of land-use change from grassland to forest on soil sulfur and arylsulfatase activity in New Zealand. Australian Journal of Soil Research. 39: 749-757.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Gukert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. European Journal of Soil Science. 55: 649-656.
- De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. Biology and Fertility of Soils. 35: 302-306.

- Di Cello F., Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tavacchioni S., Dalmastrì C. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4485-4493.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatases of microbial origin. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. Vol. 1. pp 103-169.
- Jansen H.J., Hart C.A., Rhodes J.M., Saunders J.R., Smalley J.W., 1999. A novel mucin-sulphatase activity found in *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 48: 551-557.
- Jenkins M.B., Franzluebbers A.J., Humayoun S.B. 2006. Assessing short-term responses of prokaryotic communities in bulk and rhizosphere soils to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*. 289: 309-320.
- Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2296-2303.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Vol. 3 pp A2.2.
- McLaren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biochemistry*. 17: 73-79.
- Ndiaye E.L., Sandeno J.M., Mc Grath D., Dick R.P. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*. 15: 26-36.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Arylsulfatase activity in soils. Factors affecting arylsulfatase activity. *Proceedings - Soil Science Society of America*. 34: 225-229.
- Tomioka H., Saito H., Katsumasa S., Dawson D.J. 1990. Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2104-2106.
- Vong P.C., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1651-1661.
- Vong P.C., Dedourge O., Guckert A. 2004. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. *Plant and Soil*. 258: 227-239.
- Whitehead J.E.M., Morrison A.R., Young L. 1952. Bacterial arylsulfatase. *Biochemical Journal*. 51: 585-594.

Wyss C. 1989. *Campylobacter-Wolinella* group organisms are the only oral bacteria that form arylsulfatase-active colonies on a synthetic indicator medium. *Infection and Immunity*. 57: 1380-1383.

Chapitre 3-2. Densité, structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza

Le milieu de culture de M9-X-Sulf, mis au point précédemment, a été utilisé afin d'estimer la densité et caractériser la structure et la diversité de la communauté bactérienne rhizosphérique minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza, ceci au cours d'une saison de culture.

Ces travaux ont été acceptés pour publication dans la revue *Soil Biology & Biochemistry*. 41 : 704-710.

Density, structure and diversity of the arylsulfatase bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. **Mickael Cregut**, Séverine Piutti, Sophie Slezack-Deschaumes, Isabelle Crovisier, Phuy Chhoy Vong and Emile Benizri.

Densité, structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza

Résumé

La caractérisation de la communauté microbienne tellurique minéralisant les esters de sulfate, *via* l'activité arylsulfatase, n'a pas été, jusqu'à présent, réalisée. Toutefois, l'activité de cette communauté fonctionnelle contribue en grande partie à la minéralisation du pool de soufre organique des sols. Ainsi, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la composante bactérienne de cette communauté fonctionnelle présente dans l'environnement rhizosphérique de deux plantes connues pour avoir des exigences en soufre différentes. Cette première investigation, portant sur la communauté bactérienne fonctionnelle rhizosphérique synthétisant l'activité arylsulfatase, a mis en évidence une corrélation positive entre l'activité arylsulfatase et la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable. En outre, la densité de cette communauté, corrélativement à l'activité arylsulfatase, augmente au cours du développement des deux plantes étudiées. Enfin, la structure et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle semblent spécifiques à chaque couvert végétal. En effet, la rhizosphère de colza semble exercer une pression de sélection différente que celle de l'orge sur la communauté bactérienne fonctionnelle. Par ailleurs, pour tous les temps de prélèvement confondus, il ressort que certains microorganismes, comme les *Pseudomonas sp.*, semblent spécifiques à la rhizosphère du colza avec une représentativité plus importante par rapport à celle sous couvert d'orge. En conclusion, nos résultats suggèrent que la plante, probablement par l'intermédiaire des rhizodépôts, induit une stimulation de l'activité arylsulfatase et des modifications de la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable, notamment par une augmentation de sa densité.

Mots-cléfs

Soufre, arylsulfatase, communauté bactérienne fonctionnelle rhizosphérique, esters de sulfate, orge, colza

1. Introduction

Le soufre (S) joue un rôle essentiel dans le métabolisme des plantes (Ceccotti, 1996). Or, depuis 30 ans, des carences en S ont été observées chez certaines grandes cultures, en particulier chez le colza qui possède des besoins élevés en S (15 à 30 kg de S ha⁻¹). Ces carences, qui affectent à la fois le rendement et la qualité des récoltes (Zhao *et al.*, 1999), ont pour principales origines (i) l'utilisation d'engrais synthétiques pauvres en S libre, (ii) la culture de génotypes ayant de fortes exigences en S, (iii) et la réduction du SO₂ atmosphérique émis par les industries (Eriksen *et al.*, 1995 ; Zhao *et al.*, 1996). Par ailleurs, en Europe de l'Ouest, des phénomènes de carences en S ont également été signalés chez les céréales. Ces phénomènes de carences en soufre ont alors des conséquences sur le rendement et la qualité des farines (Zhao *et al.*, 1999).

Les esters de sulfate représentent la forme majoritaire de S dans les sols agricoles (Bettany et Stewart, 1982). Ce pool de S organique est considéré comme très labile, car rapidement disponible pour les plantes, après transformation microbienne (McLaren *et al.*, 1985). Toutefois, dans certains sols agricoles de nombreuses carences en S ont été constatées à la reprise de végétation, à la sortie de l'hiver. Ces carences pourraient ainsi être attribuées à des pertes en sulfates par lessivage pendant l'hiver (Suhardi, 1992) ou à une minéralisation limitée du S dans le sol, au début du printemps.

L'arylsulfatase (arylsulfate sulfohydrolase, CE. 3.1.6.1) (ARS) est considérée comme l'enzyme clef de la minéralisation du S organique dans les sols (De la Paz Jimenez *et al.*, 2002). En effet, l'ARS hydrolyse les esters de sulfate en sulfates (Tabatabai et Bremner, 1970). Cette enzyme appartient à la famille des sulfatases (EC. 3.1.6) qui ont fait l'objet de nombreuses études et ont été isolées chez de nombreux microorganismes (Yamada *et al.*, 1989 ; Paietta, 1989 ; Beil *et al.*, 1995 ; Barbeyron *et al.*, 1995 ; Parenti *et al.*, 1997 ; Goodwin *et al.*, 2000).

Selon Kertesz (1999), les sulfatases présentes dans le sol ont une origine microbienne. Du fait de l'hétérotrophie des microorganismes, le taux de carbone (C) et sa disponibilité sont des facteurs clefs régissant les transformations du S dans les sols (Knights *et al.*, 2001), dans la mesure où ils régulent fortement l'activité et la croissance microbienne. Ainsi, l'activité ARS, la biomasse microbienne soufrée et l'immobilisation du S semblent modulées par les rhizodépôts qui constituent une source de C organique labile pour la microflore tellurique et qui, en outre, modifient les propriétés physico-chimiques du sol rhizosphérique (Dedourge *et*

al., 2004). Ces observations suggèrent fortement que le cycle du S est modulé par la quantité et la qualité du C organique libéré par le processus de rhizodéposition plutôt que par le C organique total (DeLuca et Keeney, 1994). Par conséquent, le niveau d'activité ARS dans la rhizosphère différerait en fonction du type de plante (Knauff *et al.*, 2003). De la même manière, l'activité ARS pourrait être modulée au cours des différents stades phénologiques des plantes dans la mesure où la rhizodéposition est connue pour varier en qualité et en quantité, au cours du temps, en fonction des stades de développement des végétaux (Hamlen *et al.*, 1972 ; Whipps, 1987 ; Gregory et Atwell, 1991 ; Swinnen *et al.*, 1994 ; Waschütza *et al.*, 1992 ; Cheng *et al.*, 1996 ; Quian et Doran, 1996 ; Gransee et Wittenmeyer, 2000 ; Warembourg et Estelrich, 2001).

Dans la littérature, différentes souches de bactéries ont été caractérisées pour leur capacité à hydrolyser les esters de sulfate *via* l'activité ARS (Kertesz, 1999). Il ressort de ces études, réalisées en conditions contrôlées et en cultures gnotobiotiques, que la majorité des activités ARS bactériennes sont réprimées sur un milieu contenant du sulfate minéral comme source de S et sont exprimées dans des milieux ne contenant que des formes organique de S (Dodgson *et al.*, 1982 ; Kertesz *et al.*, 1993). Aujourd'hui, aucune étude ne s'est intéressée à la caractérisation de la communauté bactérienne du sol possédant l'activité ARS, ni à la dynamique de la structure génétique de cette communauté bactérienne fonctionnelle au cours de la croissance des plantes. Ainsi, l'objectif général de cette étude est de caractériser la communauté bactérienne fonctionnelle tellurique impliquée dans le processus de minéralisation de la forme la plus importante de S organique des sols agricoles : les esters de sulfate. Notre objectif principal est de suivre l'évolution de la densité et de la structure de cette communauté bactérienne fonctionnelle, *in situ*, sous couverts de deux cultures ayant des besoins en S contrastés : le colza et l'orge. En parallèle, un suivi de l'activité ARS potentielle est réalisé, comme décrit par Tabatabai et Bremner (1970), à partir de prélèvements de sols rhizosphériques, afin d'appréhender, le rôle et l'importance potentielle de cette communauté bactérienne et de son activité ARS dans l'environnement rhizosphérique.

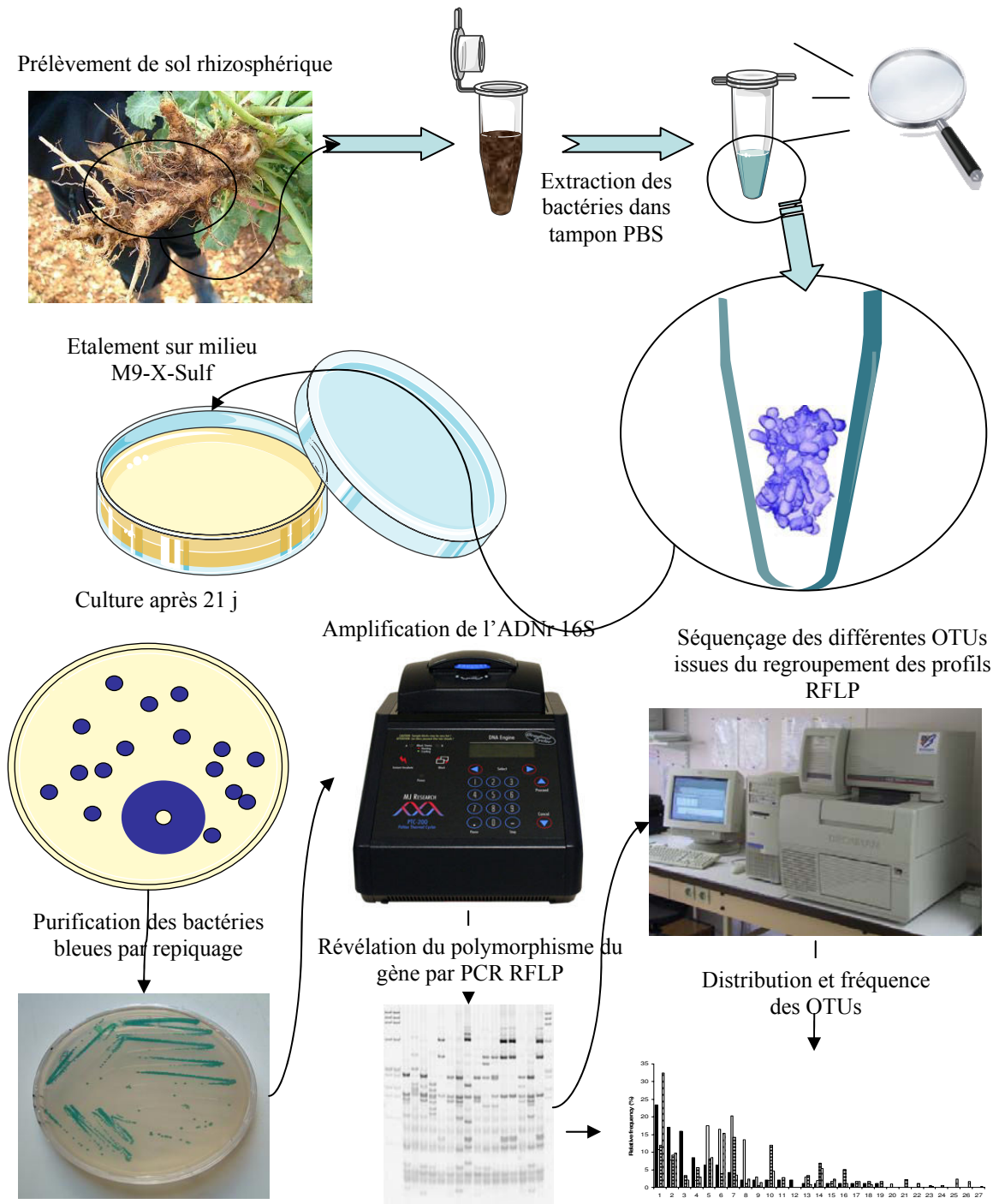
2. Matériel et Méthodes

2.1. Prélèvements du sol rhizosphérique

Le sol calcaire (sol de type rendzine brunifié ; Typic rendolls) utilisé dans cette étude a été prélevé sur deux parcelles adjacentes de 12500 m², cultivées soit avec du colza d'hiver

(*Brassica napus* var. Twister), soit avec de l'orge d'hiver (*Hordeum vulgare* var. Nickel) sur la commune de Martincourt (54). Il s'agit d'un sol représentatif des sols Lorrains. Ce sol

Chapitre 3-2. Densité, structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza



contient 357, 301, 309, 28,8, 3,1 et 0,59 g kg⁻¹ de sol respectivement d'argile, de limon, de sable, de carbone organique, d'azote organique et de soufre organique. Le pH est alcalin (pH mesuré à l'eau : 8,2). La rotation dans le cas du colza était : colza-blé-orge de printemps et pour l'orge : colza-orge de printemps-orge d'hiver.

Chaque parcelle (de colza et d'orge) a été divisée en cinq sous parcelles de 2500 m² (100 x 25 m). Les prélèvements ont été réalisés de manière aléatoire en cinq points au sein de ces sous parcelles. Ainsi, à chaque date de prélèvement, 5-7 pieds de colza et 25-35 pieds d'orge ont été prélevés. Quatre dates de prélèvement, correspondant à différents stades de développement des plantes, ont été considérées : rosette (le 21 Mars), formation des boutons floraux (le 19 avril), floraison (le 10 Mai) et maturation des siliques (le 5 Juin) pour le colza, et fin de tallage (le 21 Mars), courant montaison (le 19 Avril), épiaison (le 10 Mai), grains pâteux (le 5 Juin) pour l'orge. Au laboratoire, le système racinaire de chaque plante a été délicatement agité et le sol rhizosphérique a été défini comme la fraction de sol adhérent aux racines.

2.2. L'activité arylsulfatase

L'activité ARS a été déterminée à partir de prélèvements de sol (1g) incubés 1 h à 37 °C dans 4 ml de tampon acétate à 0,5 M (pH 5,8), 0,25 ml de toluène et 2,5 mM de *p*-nitrophényl sulfate comme décrit par Tabatabai et Bremner (1970). Après incubation, 1 ml de CaCl₂ à 0,5 M et 4 ml de NaOH à 0,5 M ont été ajoutés à la solution qui a alors été filtrée (Whatman 2V). L'activité ARS a été déterminée par lecture de l'absorbance à la longueur d'onde de 400 nm correspondant à l'absorbance du *p*-nitrophénol (*p*-NP). Par la suite, la concentration de *p*-NP libéré a été estimée en comparant l'absorbance mesurée à une gamme de concentration de *p*-nitrophénol. Enfin, l'activité ARS a été exprimée en µg *p*-nitrophénol g⁻¹ de sol sec h⁻¹.

2.3. Caractérisation de la densité, de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle

La densité, la structure et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate ont été appréhendées à partir d'une approche basée sur la culture des microorganismes. Ainsi, 5 g de sol rhizosphérique ont été placés sous agitation (agitateur orbital à 120 rpm, durant 30 min) dans un tampon phosphate (Tampon PBS : 8 g l⁻¹ de NaCl, 1,44 g l⁻¹ de Na₂HPO₄ et 0,24 g l⁻¹ de KH₂PO₄ à pH 7,2). Les suspensions ont été

diluées en séries et ont été étalées sur un milieu M9-X-Sulf (Piutti *et al.*, en préparation) : $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 12,8 g l⁻¹, KH_2PO_4 3 g l⁻¹, NaCl 0,5 g l⁻¹, NH_4Cl 1 g l⁻¹, Glucose 4 g l⁻¹, $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g l⁻¹, $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ $1,47 \cdot 10^{-2}$ g l⁻¹, biotine $5 \cdot 10^{-6}$ g l⁻¹, thiamine $5 \cdot 10^{-6}$ g l⁻¹, 100 mg l⁻¹ cycloheximide, 15 g l⁻¹ agar et 0,1 g l⁻¹ de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate (X-Sulf)). Le X-Sulf est une forme de S organique possédant un groupement chromogène. Ainsi, les bactéries capables de minéraliser les esters de sulfate prennent une coloration bleue (Wyss, 1989).

La taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable a été estimée par comptage des colonies bleues, après 10 jours d'incubation à 28 °C, et a été exprimée en log CFU g⁻¹ de sol sec. Par la suite, les colonies bactériennes bleues ont été isolées et purifiées, pour les différents réplicats de colza et d'orge et à chaque date de prélèvement, à la dilution 10⁻³. Enfin, les isolats purifiés ont été stockés à -80 °C en présence de 12,5 % de glycérol.

Une PCR ciblant le gène de l'ADNr 16S a été réalisée pour chaque isolat dans un volume final de 25 µl contenant 2,5 µl de tampon 10X de la Taq polymérase (MP Biomedicals, Fr), 200 µM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,5 µM des amorces 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', en position 8-27 de l'ADNr 16S d'*Escherichia coli*) et 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTTCAG-3', en position 1492-1513 de l'ADNr 16S d'*Escherichia coli*) (Gürtler et Stanisich, 1996), 0,625 U de Taq Polymérase (MP Biomedicals, Fr). L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur (i-cycler, Biorad) dans les conditions suivantes : 4 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 55 °C et 2 min à 72 °C et enfin un cycle d'élongation terminale de 15 min à 72 °C. Par la suite, l'amplifiat de l'ADNr 16S a été digéré par l'enzyme de restriction *AluI* (MP Biomedicals, Fr). Puis, les fragments de restriction ont été séparés par une migration sur un gel de polyacrylamide natif à 6 % durant 4h à 15 mA. Enfin, l'ADN contenu dans le gel a été marqué au SYBRGreen II (1/10000) (Roche Molecular). Les profils de restriction identiques ont alors été regroupés en OTU (avec OTU pour Operational Taxonomic Unit).

Par la suite, deux représentants de chaque OTU ont été séquencés chez Genome Express (Cogenics division of Clinical Data, Inc, Meylan, Fr). Puis, les séquences partielles de l'ADNr 16S ont été comparées avec les séquences répertoriées dans la GenBank en utilisant le logiciel Blast.

2.4. Analyses statistiques

La taille des communautés bactériennes ainsi que les mesures de l'activité ARS ont été comparées par une analyse de variance de type ANOVA à 2 facteurs, à l'aide du logiciel StatBox pro (Grimmersoft, Fr).

Une matrice a été construite à partir des fréquences relatives de chaque OTU, ceci sous les deux couverts et pour chaque date de prélèvement. A partir de cette matrice, des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées afin de comparer d'une part, la structure des communautés bactériennes fonctionnelles entre les deux couverts et d'autre part, la structure des communautés bactériennes fonctionnelles pour chaque couvert, en fonction du temps.

Une Analyse MOléculaire de VAriance (AMOVA) a été effectuée pour estimer la variance des profils de restriction entre les plantes et au cours du temps pour une même plante. L'AMOVA est une méthode permettant l'estimation de la variance basée sur la corrélation d'une diversité haplotypique à différents niveaux hiérarchiques (Excoffier *et al.*, 1992 ; Picard *et al.*, 2004). L'AMOVA a été réalisée à l'aide du logiciel Arlequin (arlequin ver. 3.1, CMPG University of Berne, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>).

3. Résultats

3.1. Taille et activité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable

Les valeurs moyennes de la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable sont significativement plus importantes sous rhizosphère de colza ($6,3 \log \text{CFU g}^{-1}$ de sol sec) que sous rhizosphère d'orge ($5,5 \log \text{CFU g}^{-1}$ de sol sec), ($P < 0,05$). De plus, la densité des bactéries capables de synthétiser l'activité ARS est faible en début de saison et augmente au cours du temps dans les deux environnements rhizosphériques, pour atteindre une valeur maximale aux stades de la floraison et de l'épiaison, respectivement pour le colza et l'orge (5 Juin), ($P < 0,001$).

Une relation linéaire est observée entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable à la fois dans la rhizosphère de colza et d'orge (respectivement : $R^2 = 0,43$ à $P < 0,002$ et $R^2 = 0,24$ à $P < 0,05$; Figures 1A et 1B). En outre, les pentes des droites de régression sont respectivement de 21,4 et 16,7 pour le colza et l'orge. Ainsi, l'activité ARS est plus importante, lorsque la densité de la communauté bactérienne cultivable est plus élevée. De plus, cette corrélation montre un coefficient de détermination

supérieur dans la rhizosphère de colza comparativement à celui déterminé dans celle d'orge. Enfin, les valeurs de l'activité ARS, qui évoluent de 51 à 100 μg de $p\text{-NP}$ g^{-1} de sol sec h^{-1} , sont significativement supérieures dans la rhizosphère de colza que dans celle d'orge ($P < 0,05$). Par ailleurs, au cours du développement de la plante, l'activité ARS augmente significativement, ceci dans la rhizosphère de colza et d'orge. Ainsi, les valeurs les plus faibles de l'activité ARS ont été mesurées, respectivement pour le colza et l'orge, au stade rosette et fin de tallage (21 Mars), alors que les valeurs les plus importantes ont été mesurées à la maturation des siliques et la formation des grains pâteux (5 Juin) ($P < 0,001$).

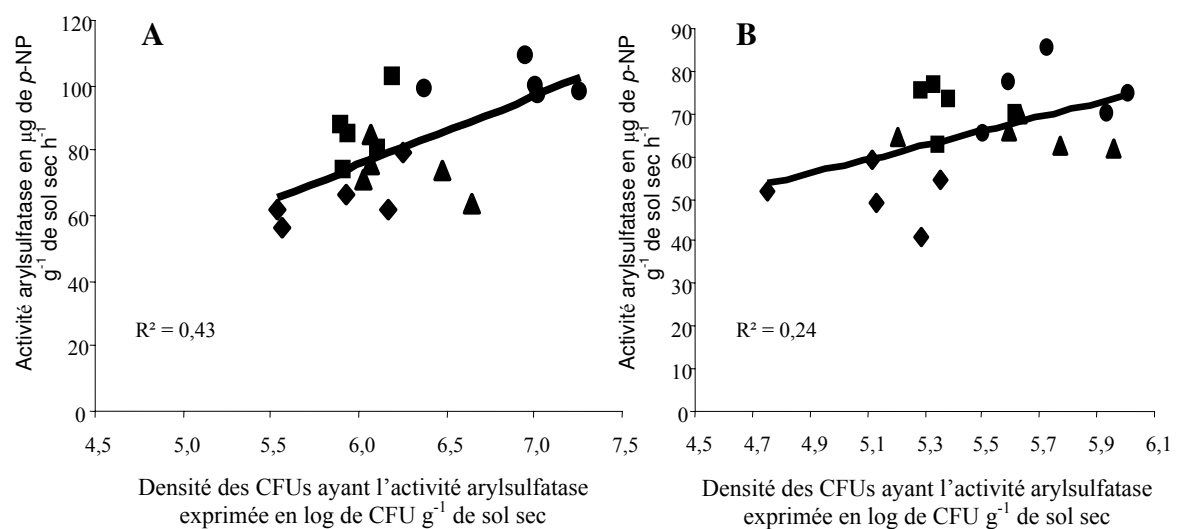


Figure 1 : Relation linéaire observée entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable sous rhizosphère de colza (A) et d'orge (B) au cours des différents stades phénologiques des plantes avec \blacklozenge correspondant au 21 Mars, \blacksquare correspondant au 19 Avril, \blacktriangle correspondant au 10 Mai et \bullet correspondant au 5 Juin

3.2. Structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle

La structure de la communauté bactérienne fonctionnelle a été déterminée, pour chaque sol rhizosphérique et pour chaque date de prélèvement, par une analyse de type RFLP ciblant l'ADNr 16S. Un total de 2000 souches bactériennes a ainsi été analysé et a permis l'identification de 27 OTUs différentes. Globalement, le nombre d'isolats est plus important dans la rhizosphère de colza que dans celle d'orge. De plus, le nombre d'OTUs déterminé diffère non seulement entre les rhizosphères mais également entre les différents stades phénologiques des plantes.

A partir de la fréquence relative de chaque OTU, une matrice a été construite et a été analysée par Analyse en Composantes Principales (ACP). Ainsi, une première ACP a été réalisée afin de comparer la structure des communautés bactériennes fonctionnelles cultivables isolées sous les 2 types de couverts. Les axes PC 1 et PC 2 représentent respectivement 16 et 10 % de la variabilité totale (Figure 2). Il ressort de cette analyse que l'ensemble des points représentatifs des échantillons issus de la rhizosphère de colza (abscisses positives) s'oppose sur l'axe PC 1 à ceux représentatifs des échantillons issus de la rhizosphère d'orge (abscisses négatives). Ainsi, cette ACP révèle l'influence de l'environnement rhizosphérique sur la fréquence relative des différentes OTUs. Enfin, nous avons réalisé une AMOVA qui met clairement en évidence un effet plante sur la structure des communautés bactériennes fonctionnelles cultivables ($P < 0,0001$ à $\alpha = 0,05$). Ainsi, chaque couvert semble influencer la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable du sol. Par contre, pour chaque couvert, les différences observées entre les différentes dates de prélèvements ne sont pas assez prononcées pour mettre en évidence une évolution temporelle de la structure génétique, propre à chaque couvert.

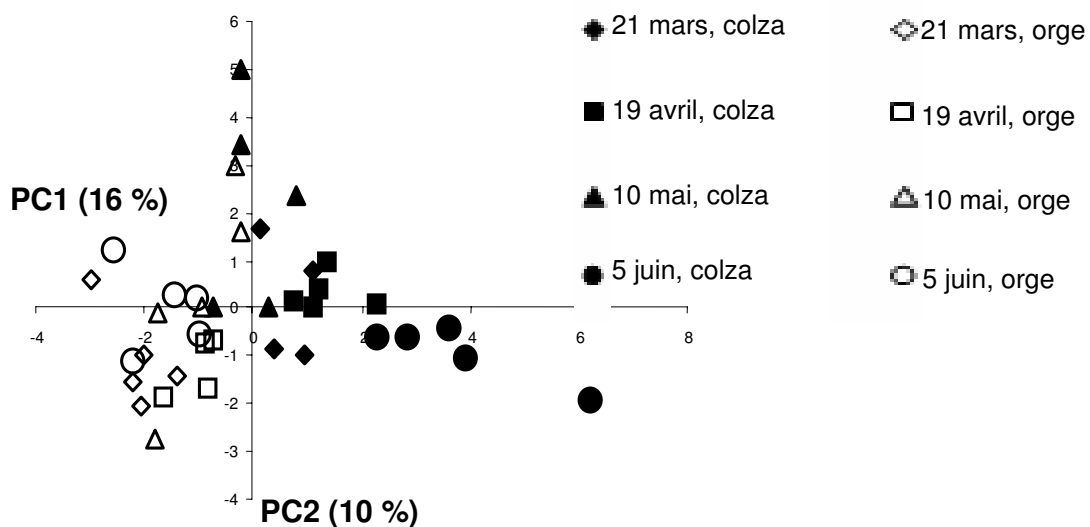


Figure 2 : Comparaison, par Analyse en Composantes Principales, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère d'orge et de colza, au cours des différents stades de développement des plantes

Deux autres ACPs ont été réalisées afin d'appréhender l'évolution, au cours du temps, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable sous couvert de colza (Figure 3A) d'une part, et sous couvert d'orge, d'autre part (Figure 3B). Concernant le

couvert de colza, l'ACP basée sur la fréquence relative des OTUs représente 34 % de la variabilité totale sur les 2 premiers axes. Cette ACP discrimine sur l'axe 1 (PC 1), la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable au cours du temps. En effet, le point représentant la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable isolée de la rhizosphère de colza au stade de floraison (le 10 Mai) s'oppose à celui correspondant à la structure génétique de celle présente lors de la maturation des siliques (le 5 Juin). De plus, sur l'axe 2 (PC 2), la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable lors du stade de formation des boutons floraux (le 19 Avril) s'oppose à celle présente lors du stade rosette (le 21 Mars). Ainsi, sous colza, la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable subit d'importantes modifications au cours de la phénologie. L'ACP basée sur la fréquence relative des OTUs sous couvert d'orge explique 30 % de la variabilité totale sur les deux premiers axes. Sur l'axe 1 (PC 1), expliquant 15 % de la variabilité totale, nous notons une opposition entre les échantillons correspondant à la fin de tallage (le 21 Mars) et ceux correspondant aux autres dates de prélèvement. L'axe 2 (PC 2) discrimine, quant à lui, la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable isolée courant montaison (le 19 Avril) de celles présentes lors de l'épiaison (le 10 Mai) et au stade grains pâteux (le 5 Juin).

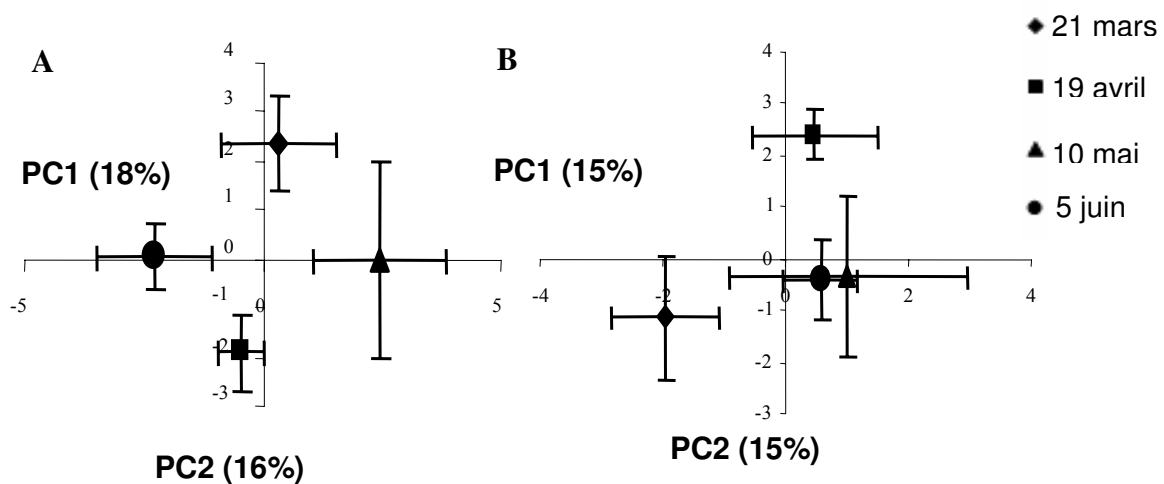


Figure 3 : Comparaison, par Analyse en Composantes Principales, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza (A) et d'orge (B) au cours des différents stades de développement de la plante (les valeurs présentées sont les valeurs moyennes auxquelles est associé l'écart type correspondant pour n=5)

En conclusion, l'évolution, au cours du temps, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable dans la rhizosphère de colza semble plus marquée que celle présente dans la rhizosphère d'orge. Pour confirmer cette observation, une AMOVA a été réalisée sur la structure des communautés bactériennes fonctionnelles cultivables au cours du temps pour une même plante. Cette analyse met en évidence une évolution de la structure de la communauté bactérienne, au cours des différents stades phénologiques des plantes. Ainsi, la plante et les conditions climatiques associées contribuent à structurer la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable ($P < 0,0001$ à $\alpha = 0,05$ et $P < 0,0215$ à $\alpha = 0,05$, respectivement sous couvert de colza et d'orge).

L'évolution des fréquences relatives des OTUs dans les deux rhizosphères durant le développement des plantes est présentée en Figure 4. Dans la rhizosphère de colza (Figure 4A), les OTUs n° 1, 2 et 3 représentent 50 % de l'ensemble des isolats qui ont été répertoriés au stade rosette (le 21 Mars). A l'opposé, pour la rhizosphère d'orge les OTUs n° 3, 8 et 10 sont dominantes à la même date (Figure 4B). La fréquence relative des OTUs varie au cours de la phénologie des plantes. Ainsi, concernant la rhizosphère de colza, nous avons constaté une augmentation des fréquences relatives des OTUs n° 6, 7, 8 et 10. Toutefois, quel que soit le stade de développement, l'OTU n°1 semble être dominante et spécifique de la rhizosphère de colza (Figure 4A). Dans le sol rhizosphérique d'orge, la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable est différente de celle du colza, avec une dominance des OTUs n° 2, 4, 8, 10 et une faible représentativité de l'OTU n° 1 (Figure 4B). Ainsi, globalement, l'évolution de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable au cours de la phénologie des plantes semble plus liée à des changements de représentativité de certaines OTUs entre les deux couverts qu'à l'apparition ou la disparition de certaines OTUs.

Suite au séquençage de deux représentants de chaque OTU, les affiliations phylogénétiques des principales OTUs ont été établies. Ainsi, dans la rhizosphère de colza, environ 23 % des isolats étaient affiliés au genre *Pseudomonas* (OTU n°1). De plus, une représentativité importante d'Actinobactéries a été notée dans la rhizosphère de colza. Les Actinobactéries isolées appartenaient à différents genres bactériens : 11,3 % de *Microbacterium sp.*, 11 % de *Cryobacterium sp.*, 10,2 % de *Rhodococcus sp.*, 9,9 % de *Streptomyces sp.*, 8,8 % d'*Arthrobacter sp.* et 4,6 % de *Nocardia sp.* (respectivement les OTUs n° 4, 2, 7 et 10, 3, 6 et

9, 8). Sous couvert d'orge, nous avons constaté une forte représentativité des Actinobactéries affiliées notamment aux *Arthrobacter sp.* (21,7 %), aux *Rhodococcus sp.* (19,5 %), aux *Nocardia sp.* (16 %) et aux *Streptomyces sp.* (12,3 %) (respectivement les OTUs n° 6 et 9, 7 et 10, 8, 3). Enfin, contrairement à la rhizosphère de colza où les *Pseudomonas sp.* étaient fortement représentés (23 %), ceux-ci ne représentaient que 2 % de la diversité bactérienne sous rhizosphère d'orge.

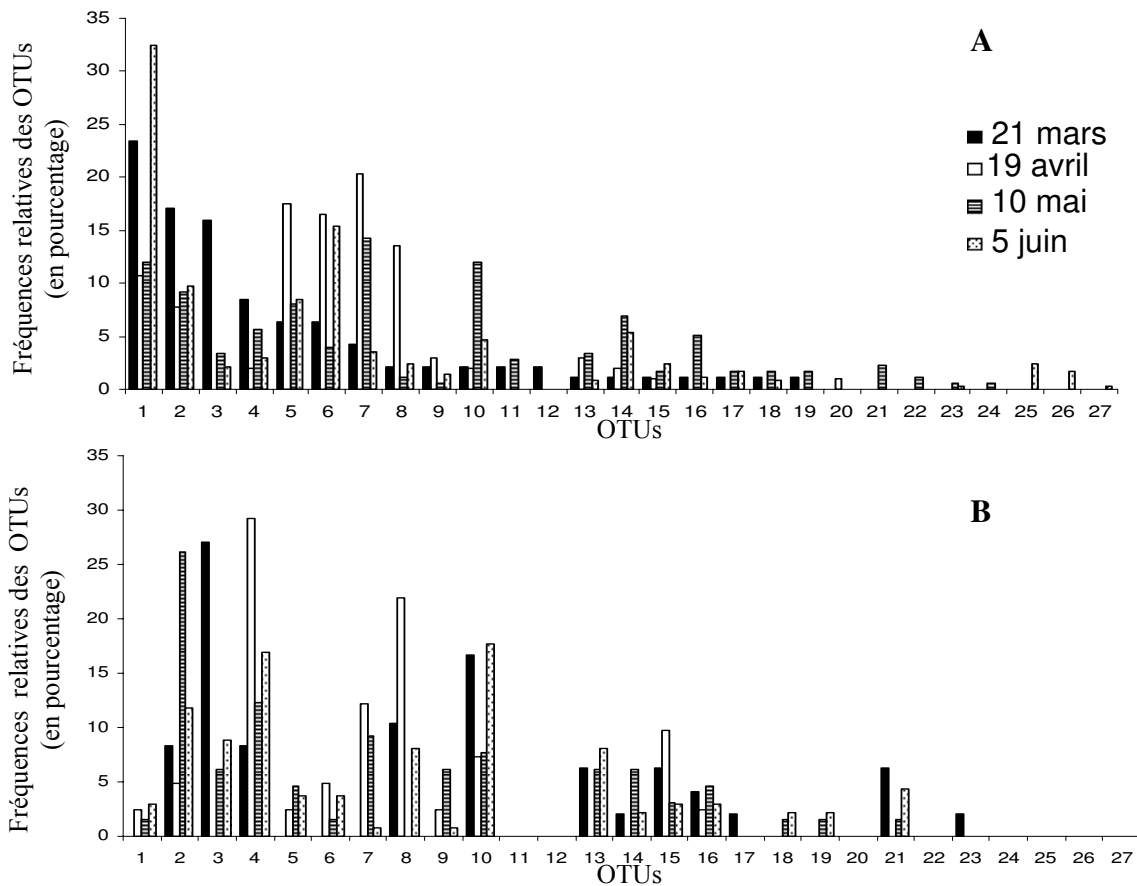


Figure 4 : Distribution des OTUs isolées de la rhizosphère de colza (A) et de la rhizosphère d'orge (B) au cours des quatre stades phénologiques de la plante

4. Discussion

Le principal objectif de ce travail était de suivre l'évolution de la densité et de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable en relation avec les changements d'activité ARS potentielle, au cours du développement du colza et de l'orge. En effet, l'ARS, enzyme clef du cycle du S, permet la transformation des esters de sulfate (*i.e.* la forme de S labile majoritaire dans les sols agricoles) et contribue ainsi à la minéralisation du S

organique. Cette enzyme est, en outre, souvent utilisée comme un des indicateurs de la qualité biologique des sols, notamment dans un contexte de changement d'occupation des sols et des pratiques culturales (Bandick et Dick, 1999).

4.1 Evolution de l'activité ARS et de la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable

Au cours de cette étude, nous avons suivi l'évolution de l'activité ARS dans les sols ainsi que l'évolution de la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable minéralisant les esters de sulfate. Les valeurs observées de l'activité ARS varient de 51 à 89 $\mu\text{g } p\text{-nitrophénol g}^{-1}$ de sol sec h^{-1} et semblent en accord avec celles issues de nombreuses études antérieures (Chen *et al.*, 2001 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2003, 2004). En comparant l'activité ARS sous différentes plantes, la littérature rapporte que selon les espèces végétales et leurs besoins en S, l'activité ARS est variable (Knauff *et al.* 2003 ; Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2003, 2004). En effet, les espèces de *Brassica*, qui ont des exigences en S importantes d'environ 30 kg de S ha^{-1} (Malhi *et al.*, 2007), montrent une activité ARS plus importante que les céréales qui ont des besoins modérés en cet élément, de l'ordre de 15 à 20 kg de S ha^{-1} .

Les régressions linéaires que nous avons réalisées suggèrent un lien entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable. Par conséquent, l'augmentation de l'activité ARS pourrait être liée à l'augmentation de la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle (Figure 1). De plus, le coefficient de détermination est plus important pour la corrélation entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza (Figure 1A) que dans celle d'orge (Figure 1B). Ce résultat semble en accord avec de précédentes études, qui rapportent une stimulation de la biomasse soufrée et un meilleur turn-over du S dans la rhizosphère de colza comparée à celle d'orge (Dedourge *et al.*, 2003). Toutefois, les coefficients de détermination que nous avons obtenus sont relativement faibles. En effet, la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable ne représente qu'une faible part de la communauté bactérienne fonctionnelle totale. De plus, l'activité ARS peut avoir d'autres origines, comme provenir notamment de la communauté fongique du sol et/ou d'une activité résiduelle provenant d'arylsulfatase stabilisée dans la matière organique. En outre, nous avons pu observer que l'activité ARS était plus importante dans la rhizosphère de colza que d'orge. A ce sujet, la littérature a mis en évidence que l'activité ARS, enzyme exclusivement d'origine microbienne

(Kertesz, 1999), est notamment stimulée par l'apport de glucose (Dedourge *et al.*, 2004). Par conséquent, la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable et l'activité ARS pourraient être stimulées du fait de rhizodépôts plus riches en composés carbonés accessibles pour la microflore, ceci plutôt dans la rhizosphère de colza que dans celle l'orge (Zagal, 1994 ; Dilks *et al.*, 2004). Ainsi, comme la plupart des microorganismes du sol sont hétérotrophes, le C organique labile libéré par le processus de rhizodéposition semblerait être un facteur clef pour le développement microbien (densité et activité), (Bowen et Rovira, 1999 ; Lugtenberg et Dekkers, 1999). Par ailleurs, le colza est une plante ayant de forts besoins en S. Ainsi, la limitation en cet élément dans la rhizosphère pourrait entraîner une activité ARS plus importante chez la communauté bactérienne fonctionnelle (Kertesz, 1999). Cette augmentation de l'activité pourrait être liée à une augmentation de la taille de la communauté fonctionnelle (notamment du fait de la libération de C par les racines) et/ou à une limitation des sulfates due à un prélèvement plus important par la plante. Dans ce sens, nous avons observé un lien entre l'augmentation de l'activité ARS et celle de la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable qui coïncide avec un accroissement des besoins en S de la plante. En effet, l'activité ARS est maximale après le stade de développement boutons séparés du colza, stade phénologique qui coïncide avec la période où la plante a de forts besoins en S (Matula et Pechova, 2002). Ainsi, une limitation en sulfate dans l'environnement rhizosphérique pourrait avoir lieu, dès ce stade phénologique et au fur et à mesure que la saison progresse, du fait de prélèvements en sulfate, plus important par la plante (Blake-Kalff *et al.*, 2000). Cette limitation en sulfate, dans l'environnement rhizosphérique, induirait alors une stimulation de l'activité ARS microbienne pour satisfaire la demande en S des microorganismes du sol.

En outre, nous avons observé que la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable varie au cours du temps avec des valeurs maximales lors de la période de reproduction. Ce résultat est conforme à celui de Smalla *et al.* (2001) qui ont constaté, par comparaison de l'abondance relative de l'ADNr 16S, que la densité des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza était plus importante à la période de la floraison. Ainsi, cette stimulation de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable pourrait également s'expliquer par la présence, à ce stade phénologique tardif, de résidus végétaux qui, dégradés par la communauté microbienne, permettraient une augmentation de sa taille.

4.2 Evolution de la structure et de la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable

Les ACPs révèlent un effet structurant de l'espèce végétal sur la structure génétique de communauté bactérienne fonctionnelle. Il ressort de ces analyses que les rhizosphères de colza et d'orge structurent différemment la communauté bactérienne rhizosphérique (Figure 3 et Figures 4A et 4B), bien que ces deux plantes aient été cultivées sur le même sol. En effet, même si la structure de la communauté bactérienne dans la rhizosphère semble être déterminée, dans une large mesure, par la composition physico-chimique du sol (Latour *et al.*, 1996 ; de Ridder-Duine *et al.*, 2005), l'effet du couvert végétal a été également mis en évidence, par de nombreuses études, comme un facteur structurant les communautés totales ou fonctionnelles (Smalla *et al.*, 2001 ; Marschner *et al.*, 2004 ; Costa *et al.*, 2006). Ainsi, de nombreuses études ont eu pour objectif la comparaison de la structure des communautés microbiennes provenant de différentes rhizosphères. Ces études ont mis en évidence que les modifications de structure des communautés microbiennes étaient, en partie, liées à la nature et à la quantité des rhizodépôts propres à chaque espèce végétale (Zak *et al.*, 1994 ; Grayston et Campbell, 1996 ; Grayston *et al.*, 1998 ; Yang et Crowley, 2000). En outre, des travaux concernant le maïs ont montré une structuration des communautés bactériennes différente d'un point de vue quantitatif (densité) et qualitatif (potentialités métaboliques, structure génétique), selon les stades de développement de la plante et donc selon la nature des rhizodépôts (Baudoin *et al.*, 2001 ; Baudoin *et al.*, 2002 ; Mounier *et al.*, 2004 ; Benizri *et al.*, 2007). De même, des études antérieures semblent indiquer l'existence de variations saisonnières de la structure des communautés microbiennes (Di Cello *et al.*, 1997 ; Smalla *et al.*, 2001 ; Smit *et al.*, 2001). Ces observations sont également en partie liées aux différences de rhizodéposition (quantité et la qualité) au cours du temps, mais aussi aux variations climatiques.

Nos résultats montrent également que l'activité ARS et la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle évoluent différemment et au cours du temps sous couvert de colza et d'orge (Figures 4A et 4B). Des résultats similaires, concernant un effet temporel sur la structure de la communauté bactérienne fonctionnelle nitrate réductrice et/ou sur son activité potentielle ont été observés par Philippot *et al.*, (2006) pour différents cultivars de maïs.

L'analyse de la diversité des isolats bactériens a révélé que, dans les deux sols rhizosphériques, les isolats appartenaient à des taxons bactériens présents dans les sols, tels que *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*. Beaucoup de bactéries ont déjà été identifiées pour leur capacité à exprimer l'activité ARS comme les Mycobactéries (Mougous *et al.*, 2002), les Entérobactéries (Yamada *et al.*, 1978), les Pseudomonads (Fitzgerald et George, 1977; Beil *et al.*, 1995) et les Cyanobactéries (Muller et Schmidt, 1986). Toutefois, la plupart des souches caractérisées génétiquement et/ou biochimiquement sont des isolats cliniques, pour lesquels l'aptitude à synthétiser l'activité ARS dans un environnement comme le sol n'est pas connue. Comme la disponibilité du S, dans le sol, dépend principalement de la minéralisation microbienne des formes de S organiques (c'est-à-dire principalement les esters de sulfate et les sulfonates), l'étude et la caractérisation des communautés bactériennes telluriques possédant ces activités enzymatiques nous semble de première importance pour mieux comprendre le cycle du S. Dans ce sens, de récentes investigations ont portées sur la caractérisation des communautés bactériennes fonctionnelles minéralisant les sulfonates dans la rhizosphère d'orge (Schmalenberger et Kertesz, 2007 ; Schmalenberger *et al.*, 2008). Toutefois, les sulfonates constituent une forme minoritaire de S organique dans les sols agricoles comparativement aux esters de sulfate (Kertesz, 1999). De plus, le rôle des enzymes dégradant les sulfonates n'a toujours pas été clairement établi. En effet, les sulfonatasés semblent apte à minéraliser les sulfonates principalement lors de situations de carences en carbone plutôt que de S (Kertesz, 1999). Par ailleurs, le turn-over des sulfonates dans les sols agricoles semble plus faible que celui observé dans les sols forestiers. C'est pourquoi, afin de mieux cerner la disponibilité du S dans les sols agricoles, nos investigations ont abordé la minéralisation microbienne des esters de sulfate dans l'environnement rhizosphérique. Dans ce cadre, nos travaux montrent une forte représentativité des Actinobactéries dans les deux rhizosphères et plus spécifiquement dans celle d'orge. Parmi les Actinobactéries, *Arthrobacter sp.* est bien représenté dans les deux rhizosphères. Par contre, quel que soit le stade phénologique des plantes, *Pseudomonas sp.* semble dominant mais davantage spécifique à la rhizosphère du colza. Ce résultat est conforme à celui de Misko et Germida (2002) qui, par une analyse FAME, ont constaté qu'environ 35 % des isolats bactériens de 6 variétés de *Brassica* étaient affiliés aux *Pseudomonas sp.* De même, de nombreuses études ont confirmé que les *Pseudomonas sp.* sont bien représentés dans la rhizosphère du genre *Brassica* (Glick *et al.*, 1997 ; Siciliano et Germida, 1999 ; Achouak *et al.*, 2000 ; Bertrand *et al.*, 2001). Globalement, nos résultats mettent en évidence au sein de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable issue des rhizosphères d'orge et de colza davantage de bactéries

Gram+ que de Gram-. Ainsi, les Actinobactéries semblent plus abondantes dans la rhizosphère, au cours de la saison de culture, comme cela a déjà été mentionné dans d'autres études (Smalla *et al.*, 2001 ; Smit *et al.*, 2001 ; Costa *et al.*, 2006).

Pour conclure, cette étude représente la première investigation *in situ*, portant sur la communauté bactérienne rhizosphérique possédant l'activité ARS. Elle met en évidence une corrélation positive et significative entre l'activité ARS et la taille de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable. Il ressort, en outre, que la densité, corrélativement à l'activité, augmente au cours du développement des deux plantes étudiées. La structure génétique et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle semblent, de plus, spécifique à chaque couvert végétal avec, en particulier, une prédominance des bactéries du genre *Pseudomonas* sous couvert de colza. L'évolution de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle au cours de la phénologie a également été suivie. Nos résultats suggèrent que la plante, probablement du fait de variation de la nature et de la quantité des rhizodépôts, induit des modifications de la structure génétique, au cours du temps.

5. Références bibliographiques

- Achouak W., Sutra L., Heulin T., Meyer J.M., Fromin N., Degraeve S., Christen R., Gardan L. 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 9-18.
- Bandick A. K. Dick R. P. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biology & Biochemistry. 31: 1471-1479.
- Barbeyron T., Potin P., Richard C., Collin O. Kloareg B. 1995. Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora*. Microbiology. 141: 2897-2904.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. Applied Soil Ecology. 19: 135-145.

- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology*. 37: 85-93.
- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W., Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *European Journal of Biochemistry*. 229: 385-394.
- Benizri E., Nguyen C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 1230-1233.
- Bertrand H., Nalin R., Bally R., Cleyet-Marel J.C. 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and Fertility of Soils*. 33: 152-156.
- Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli, India. pp. 14.
- Blake-Kalff M.M.A., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 2000. Diagnosing sulphur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*. 225: 95-107.
- Bowen G.D., Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *In: Sparks D.L. (Ed.), Advances in Agronomy (66)*. Academic Press. pp. 1-102.
- Ceccotti S.P. 1996. Plant nutrient sulphur: a review of nutrient balance, environment impact and fertilizers. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 43: 117-125.
- Chen C.R., Condon L.M., Davis M.R., Sherlock R.R. 2001. Effects of land-use change from grassland to forest on soil sulfur and arylsulfatase activity in New Zealand. *Australian Journal of Soil Research*. 39: 749-757.
- Cheng W., Zhang Q., Coleman D.C., Ronald Carroll C., Hoffman C.A. 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology & Biochemistry*. 28: 1283-1288.

- Costa R., Götz M., Mrotzek N., Lottmann J., Berg G., Smalla K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology*. 56: 236-249.
- De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 302-306.
- de Ridder-Duine A.S., Kowalchuk G.A., Klein Gunnewiek P.J.A., Smant W., van Veen J.A., de Boer W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 349-357.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility of Soils*. 38, 181-185.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science*. 55: 649-656.
- DeLuca T.H., Keeney D.R. 1994. Soluble carbon and nitrogen pools of prairie and cultivated soils: seasonal variation. *Soil Science Society of America Journal*. 58: 835-840.
- Di Cello F., Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tavacchioni S., Dalmastri C., 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4485-4493.
- Dilks N.B., Jones L.D., Farrar J.F. 2004. Temporal dynamic of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology*. 134: 706-715.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatases of microbial origin. CRC Press, Boca Raton , Florida, USA. Vol. 1. pp 103-169.

- Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 1011-1016.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Fitzgerald J.W., George J.R. 1977. Localization of arylsulfatase in *Pseudomonas* C12B. *Applied and Environmental Microbiology*. 34: 107-108.
- Glick B.R., Liu C., Ghosh S., Dumbroff E.B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology & Biochemistry*. 29: 1233-1239.
- Goodwin P.H., Li J., Jin S. 2000. Evidence for sulfate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 169-176.
- Gransee A., Wittenmeyer L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences*. 163: 381-385.
- Grayston S.J., Campbell C.D. 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology*. 16: 1031-1038.
- Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 30: 369-378.
- Gregory P.J., Atwell B.J. 1991. The fate of the carbon in pulse-labelled crops of barley and wheat. *Plant and Soil*. 136: 205-213.
- Gürtler V., Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.

- Hamlen R., Lukezic F., Bloom J. 1972. Influence of age and stage development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. *Canadian Journal of Plant Science*. 52: 633-642.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfates esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Kertesz M.A., Leisinger T., Cook A.M. 1993. Protein Induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 175: 1187-1190.
- Knauff U., Schulz M., Scherer H.W. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*. 19: 215-223.
- Knights J.S., Zhao F. J., McGrath S.P., Magan N. 2001. Long-term effects of land use and fertiliser treatments on sulphur transformations in soils from the Broadbalk experiment. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1797-1804.
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F., Lemanceau P. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2449-2456.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*. 1: 9-13.
- Malhi S.S., Gan Y., Raney J.P. 2007. Yield, seed quality, and sulfur uptake of *Brassica* oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal*. 99: 570-577.
- Marschner P., Crowley D., Yang C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*. 261: 199-208.
- Matula J., Pechova M. 2002. Sulfur and sulphate concentrations in leaves of oilseed rape under field conditions. *Rostlinná Výroba*. 48: 433-440.
- McLaren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biochemistry*. 17: 73-79.

- Misko A.L., Germida J.J. 2002. Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the root of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*. 42: 399-407.
- Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J.B., Brenner S.E., Bertozzi C.R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry and Biology*. 9: 767-776.
- Mounier E., Hallet S., Cheneby D., Benizri E., Gruet Y., Nguyen C., Piutti S., Robin C., Slezack-Deschaumes S., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology*. 6: 301-312.
- Muller S., Schmidt A. 1986. Substrate-dependent arylsulfatase activity in the cyanobacterium *Plectonema* 73110. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences*. 41: 820-824.
- Paietta J.V. 1989. Molecular cloning and regulatory analysis of the arylsulfatase structural gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*. 9: 3630-3637.
- Parenti G., Meroni G., Ballabio A. 1997. The sulfatase gene family. *Current Opinion in Genetics and Development*. 7: 386-391.
- Philippot L., Kuffner M., Chèneby D., Depret G., Laguerre G., Martin-Laurent F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. *Plant and Soil*. 287: 177-186
- Picard C., Frascaroli E., Bosco M. 2004. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbred lines and their hybrid. *FEMS Microbiology Ecology*. 49: 207-215.
- Piutti S., Cregut M., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., Vong P.C., Benizri E. A selective differential medium for detection and enumeration of arylsulfatase bacteria in soil (en preparation).
- Quian J.H., Doran J.W. 1996. Available C released from crop roots during growth as determined by C-13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal*. 14: 828-831.

- Schmalenberger A., Hodge S., Bryant A., Hawkesford M.J., Singh B.K., Kertesz M.A. 2008. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environmental Microbiology*. 10: 1486-1500.
- Schmalenberger A., Kertesz M.A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. *Environmental Microbiology*. 9: 535-545.
- Siciliano S.D., Germida J.J. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology*. 29: 263-272.
- Smalla K.G., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Smit E., Leeftang P., Gommans S., Van Den Broek J., Van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
- Suhardi. 1992. Importance du soufre organique du sol dans la nutrition soufrée du blé (*Triticum aestivum* L.). Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France, pp. 147.
- Swinnen J., van Veen J.A., Merckx R. 1994. Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: model calculations based on ¹⁴C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 211-217.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Arylsulphatase activity in soils. Factors affecting arylsulfatase activity. *Proceedings - Soil Society of America*. 34: 225-229.
- Vong P.C., Dedourge O., Guckert A. 2004. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. *Plant and Soil*. 258: 227-239.

- Vong P.C., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1651-1661.
- Warembourg F.R., Estelrich H.D. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1291-1303.
- Waschütza S., Hofman N., Nieman E.G., Fendrich I. 1992. Investigations on root exsudates of Korean rice. *Symbiosis*. 13: 181-189.
- Whipps J.M. 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedlings grown in soil. *Plant and Soil*. 109: 95-100.
- Wyss C. 1989. *Campylobacter-Wolinella* group organisms are the only oral bacteria that form arylsulfatase-active colonies on a synthetic indicator medium. *Infection and Immunity*. 57: 1380-1383.
- Yamada K., Akasaka K., Shimada H. 1989. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene. *European Journal of Biochemistry*. 186: 405-410.
- Yamada T., Murooka Y., Harada T. 1978. Comparative immunological studies on arylsulfatase in bacteria of the family Enterobacteriaceae: occurrence of latent arylsulfatase protein regulated by sulfur compounds and tyramine. *Journal of Bacteriology*. 133: 536-541.
- Yang C.H., Crowley D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 345-351.
- Zagal E. 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system with barley (*Hordeum vulgare* L.), ryegrass (*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a ¹⁴CO₂-atmosphere. *Plant and Soil*. 166: 63-74.
- Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry*. 26: 1101-1108.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., Warrilow A.G.S., McGrath S.P., Clarkson D.T. 1996. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil*. 181: 317-327.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science*. 30: 1-17.

Chapitre 4. Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

La caractérisation de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable a permis de mettre en évidence une diversité de bactéries, impliquées dans la minéralisation des esters de sulfate. Parmi ces bactéries, les Actinomyceteaceae sont apparues majoritaires. Au cours de cette étude nous nous sommes donc focalisés sur l'étude des conditions d'induction de l'activité arylsulfatase chez différentes espèces affiliées à ce groupe phylogénétique.

Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

Résumé

L'induction de l'activité arylsulfatase a été largement étudiée dans la littérature chez des microorganismes isolés d'environnements cliniques. Si l'activité arylsulfatase joue un rôle majeur dans le cycle du soufre des sols, peu d'éléments sont actuellement disponibles concernant les conditions d'induction de cette activité chez les microorganismes telluriques selon la nature et la disponibilité en S du milieu.

Notre objectif est de caractériser d'un point de vue fonctionnel (niveau d'activité et conditions d'induction) différentes bactéries isolées de la rhizosphère (chapitre 3.2.) appartenant notamment à un phylum bactérien connu pour son rôle majeur dans le turn-over de la matière organique du sol : les Actinomyceteaceae. Les résultats mettent en évidence une activité arylsulfatase intracellulaire et/ou associée aux membranes cellulaires chez les Actinobactéries. De plus, chez certaines de ces Actinomyceteaceae, l'activité arylsulfatase ne semble pas uniquement corrélée à la disponibilité en sulfates mais semble être induite directement par la présence d'un substrat de l'enzyme.

Mots-clefs

Activité arylsulfatase, régulation, localisation cellulaire, Actinomyceteaceae

1. Introduction

Les substrats préférentiels de croissance peuvent être définis comme des substrats facilement assimilables par un microorganisme et assurant un développement optimal de ce dernier (croissance spécifique, concentration en cellule de la culture) (van den Bogaard *et al.*, 2000). A titre d'exemple, des travaux, réalisés chez *Escherichia coli*, mettent en évidence que le glucose constitue une source de C préférentielle (Inada *et al.*, 1996). A l'inverse, chez des Actinobactéries telle que *Streptococcus thermophilus*, la source préférentielle de carbone est le lactose (van den Bogaard *et al.*, 2000). Ainsi, la nature des substrats préférentiels est variable selon l'organisme étudié et dépendrait notamment de l'adaptation du microorganisme vis-à-vis de la niche écologique qu'il occupe (Brückner et Titgemeyer, 2002).

Le soufre (S) est un élément essentiel pour la croissance des microorganismes du sol. Le sulfate représente l'une des sources préférentielles de soufre pour la majorité des bactéries (Seitz *et al.*, 1993). Ces sulfates sont absorbés par les cellules bactériennes par l'intermédiaire de perméases à sulfates liées à la membrane plasmique. Par ailleurs, dans des conditions de limitation en S, des transporteurs de haute affinité peuvent être induits pour faciliter l'absorption des sulfates (Kredich, 1996). Les sulfates sont ensuite réduits en sulfides. Puis, la synthèse de la cystéine, première molécule de la voie d'assimilation de S, est catalysée par une cystéine synthétase, à partir de sulfide et d'O-acétyl-L-sérine (Grundy et Henkin, 1998). La cystéine peut, par la suite, être convertie en méthionine (en présence d'homosérine) ou en taurine ou être directement utilisée pour la synthèse des protéines.

D'autres sources préférentielles de S peuvent être distinguées chez les bactéries. Ainsi, la cystéine, les intermédiaires directs dans sa voie de biosynthèse, les cystéates et les thiosulfates sont également considérés comme des substrats préférentiels pour la croissance bactérienne (Kredich, 1992 ; Kredich 1996 ; Grundy et Henkin, 1998 ; Seitz *et al.*, 1993). Pour certaines bactéries *i.e.* *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa.*, la cystathionine, la méthionine et la taurine peuvent également représenter des sources de S préférentielles (Kredich, 1996 ; Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999).

En l'absence de l'une ou l'autre de ces sources de S ou en conditions limitantes en ces éléments, des formes alternatives de S peuvent être utilisées par les bactéries pour assurer leur croissance. Il s'agit notamment des esters de sulfates, des sulfamates et des sulfonates.

Un ensemble de protéines appelées Sulfur Starvation Induced proteins ou SSI protéines sont impliquées dans l'assimilation de ces formes alternatives de S. Ces protéines ont été identifiées, par des approches de protéomique, chez différentes espèces bactériennes telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Staphylococcus aureus* (Quadroni *et al.*, 1999 ; Kertesz *et al.*, 1993). Un ensemble de SSI protéines sont des enzymes impliquées dans l'hydrolyse de formes organiques de S et permettent ainsi la libération de S-sulfates. Parmi ces enzymes, nous pouvons citer les alkylsulfatases (EC 3.1.6.-), les arylsulfonatases (EC 3.10.1.) et les alkylsulfonatases (EC 3.10.-) et les arylsulfatases (EC 3.1.6.1)

Les arylsulfatases catalysent l'hydrolyse des esters de sulfate (C-O-S) (Tabatabai et Bremner, 1970). Ces enzymes ont jusqu'alors été étudiées principalement chez des protéobactéries (Gram⁻) isolées d'environnements cliniques comme *Klebsiella pneumoniae* (Harada et Spencer, 1962 ; Adachi *et al.*, 1975 ; Murooka *et al.*, 1977, 1990) et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Beil *et al.*, 1995 ; Quadroni *et al.*, 1999). Chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, la synthèse d'une arylsulfatase cytosolique est induite par des conditions limitantes en sulfates et en intermédiaires de la voie d'assimilation de S (sulfite, sulfide, cystéine, méthionine, taurine...) (Kredich, 1992 ; Beil *et al.*, 1995) . Par ailleurs, pour *Klebsiella pneumoniae*, la synthèse de l'arylsulfatase, dans le périplasma, est induite en présence des intermédiaires de la voie « indirecte » d'assimilation des sulfates (*i.e.* la méthionine, la taurine et les cystéates) (Harada et Spencer, 1962 ; Adachi *et al.*, 1975). Chez ces souches, la synthèse de ces enzymes est régulée positivement au niveau transcriptionnel. Leur activité est quant à elle régulée au niveau post-traductionnel par formylation d'un résidu glycine localisé au niveau du site catalytique de l'enzyme (Murooka *et al.*, 1990 ; Kertesz, 1999°; Dierks *et al.*, 1998°; 2003 ; Berteau *et al.*, 2006).

Actuellement, peu d'informations sont disponibles concernant les conditions d'induction (en fonction de la quantité et de la forme de S dans le milieu) de l'activité arylsulfatase chez des bactéries isolées du sol, et en particulier chez les Actinobactéries, qui sont relativement bien représentées au sein de la communauté bactérienne cultivable que nous avons isolée des rhizosphères de colza et d'orge (Chapitre 3-2.). Nous avons retenu les souches affiliées à *Microbacterium sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*. Ces souches ont été mises en culture en conditions gnotobiotiques, dans des milieux contenant des quantités et des formes de soufre (sulfates, acides aminés ou esters de sulfate) différentes et nous avons déterminé (*i*) la

cinétique de croissance de ces microorganismes en présence de ces différentes sources de soufre, (ii) le niveau d'activité arylsulfatase et (iii) la compartimentation cellulaire de cette activité enzymatique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Conditions d'induction de l'arylsulfatase selon la nature de S présent dans le milieu de culture

Dans un premier temps, nous avons précisé les conditions d'induction de l'activité arylsulfatase selon la nature des sources de S présentes dans le milieu de culture. Pour cela, la croissance bactérienne et l'activité arylsulfatase ont été suivies.

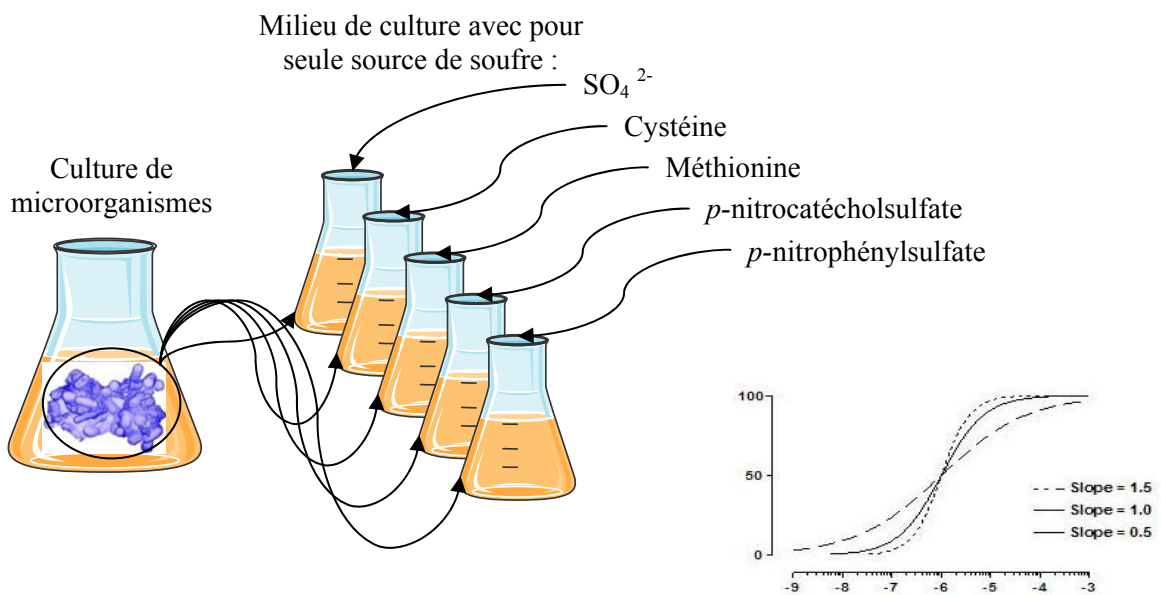
Les souches bactériennes utilisées au cours de cette expérimentation ont été isolées de la rhizosphère de colza (Chapitre 3-2.) et appartiennent au phylum des Actinobactéries. Trois souches affiliées à *Rhodococcus sp.* PLL-1, *Microbacterium sp.* 5 et *Streptomyces sp.* ont été retenues. Ces souches appartiennent à différents sous ordres des Actinobactéries *i.e.* au sous-ordre des Micrococccinae pour *Microbacterium sp.*, au sous-ordre des Corynebacterinae pour *Rhodococcus sp.* et au sous-ordre des Streptomycinae pour *Streptomyces sp.* Nous avons également retenu une souche appartenant aux γ -protéobactéries, affiliée à *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7 et isolée également de la rhizosphère du colza. En effet, cette souche appartient aux protéobactéries et est donc proche phylogénétiquement des bactéries modèles *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 étudiée respectivement par Beil *et al.*, (1995) et Quadroni *et al.*, (1999).

Nous avons établi la cinétique de croissance de chaque souche bactérienne et effectué une mesure de l'activité arylsulfatase totale (après éclatement du culot cellulaire) durant le développement des bactéries. Pour cela, les cellules bactériennes sont mises en culture pendant 96 h à 28 °C, sous agitation, à 220 rpm, dans un milieu liquide riche NB (Difco Nutrient Broth, France) permettant une croissance optimale sans limitation, *a priori*, en S. Les suspensions bactériennes sont ensuite centrifugées 15 min à 5000 g, à 4 °C et les culots cellulaires sont lavés à 3 reprises dans un milieu minéral M9 modifié (NaH_2PO_4 12.8 g l⁻¹, KH_2PO_4 3 g l⁻¹, NaCl 0.5 g l⁻¹, NH_4Cl 1 g l⁻¹, Glucose 5 g l⁻¹, MgCl_2 0,4 g l⁻¹, CaCl_2 1,47.10⁻² g l⁻¹, de biotine 5.10⁻⁶ g l⁻¹, de thiamine 5.10⁻⁶ g l⁻¹) ne contenant aucune source de S. La concentration en cellules est déterminée par mesure de l'absorbance à la densité optique de 600 nm puis ajustée à une DO de 0,2 dans 100 ml de milieu minéral M9 modifié contenant différentes sources de S. Cinq formes de S ont été utilisées : 1. sulfate (forme minérale), 2.

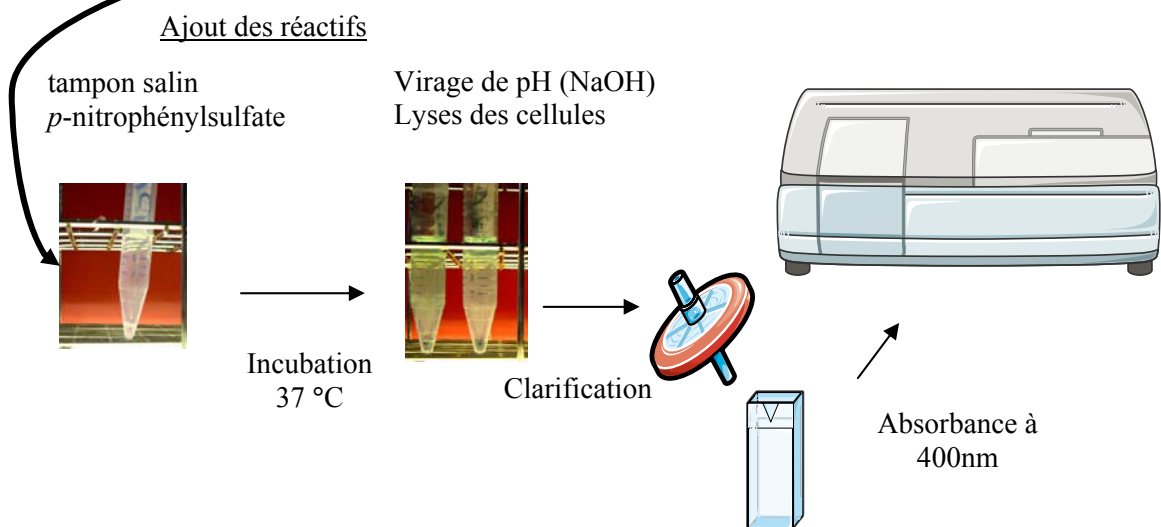
cystéine (première forme organique de la voie d'assimilation de S), 3. méthionine, 4. *p*-nitrocatécholsulfate (*p*-NCS) et 5. *p*-nitrophénylsulfate (*p*-NPS), ces deux dernières formes étant des esters de sulfate utilisés

Chapitre 4. Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

1 - Croissance bactérienne et synthèse de l'activité arylsulfatase



- Modélisation de la croissance bactérienne
- Mesure de l'activité arylsulfatase



couramment comme substrats synthétiques de l'arylsulfatase. Quelle que soit la forme de S retenue, la concentration finale est de 250 μM de S, correspondant à des conditions *a priori* non limitantes en S. Les cultures sont placées sous agitation à 220 rpm, à 28 °C et des prélèvements sont effectués à 0, 3, 6, 9, 12/13, 20/21, 24/27 et 29h après mise en incubation. A chaque temps de prélèvement, sont réalisées (i) une mesure d'absorbance à la densité optique de 600 nm de façon à suivre la cinétique de croissance bactérienne, (ii) une mesure de l'activité arylsulfatase potentielle que nous avons adaptée du test de Tabatabai et Bremner (1970) (Chapitre 3-1.).

Un ml de suspension bactérienne est lysé par choc thermique. Pour ce faire, la suspension bactérienne est congelée dans l'azote liquide 30 sec puis décongelée dans un bain marie à 20 °C, à 3 reprises. Après ajout de 4 ml de tampon acétate à pH 5.8 et 2,5 mM *p*-NPS, le lysat est incubé à 37°C pendant 2h. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de 4 ml de NaOH, 0,5 M. Le lysat cellulaire est alors centrifugé (13000 g durant 30 min à 4°C). Le surnageant est filtré sur filtre Whatman à 0,22 μm (pour éliminer les corps microbiens susceptibles de fausser la lecture de densité optique). Enfin, l'activité arylsulfatase est mesurée par une lecture de l'absorbance à la longueur d'onde de 400 nm. L'activité arylsulfatase est exprimée en μg de *p*-nitrophénol (NP) libéré par h par Unité de $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

Trois répétitions sont réalisées par traitement.

2.2.2. Compartimentation de l'activité arylsulfatase et induction selon la disponibilité en sulfates

2.2.1. Compartimentation de l'activité arylsulfatase en limitation en sulfate

Nous avons déterminé la compartimentation cellulaire de l'activité arylsulfatase (extracellulaire, intracellulaire, membranaire) en condition de limitation en sulfates.

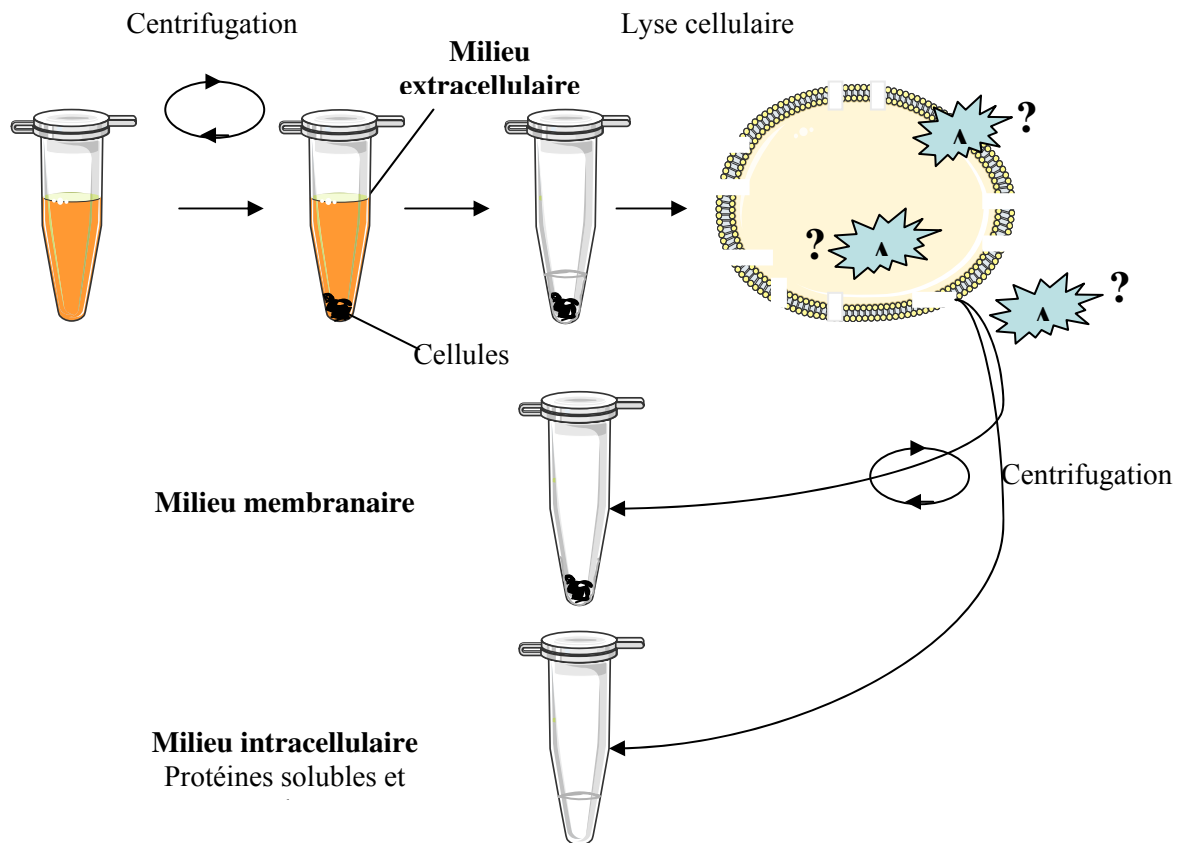
Pour ce faire, la compartimentation cellulaire de l'activité arylsulfatase a été appréhendée à partir de cultures en phase stationnaire de croissance. Ainsi, les cellules bactériennes, issues de cultures préalablement réalisées sur un milieu riche de type NB, ont été inoculées dans un milieu M9 modifié avec une source de S organique, le *p*-NPS. Ces cultures sont incubées, durant 9h, avec pour objectif de mesurer l'activité arylsulfatase sur chaque fraction cellulaire.

Différentes fractions (extracellulaire, intracellulaire et membranaire) sont isolées à partir des suspensions cellulaires. Pour ce faire, une étape de centrifugation (15 min à 5000 g, à 4°C) a permis de séparer les culots bactériens du milieu extracellulaire qui a ensuite été filtré (Whatman à 0,22 μm) afin d'éliminer les éventuels corps microbiens. Puis, les culots

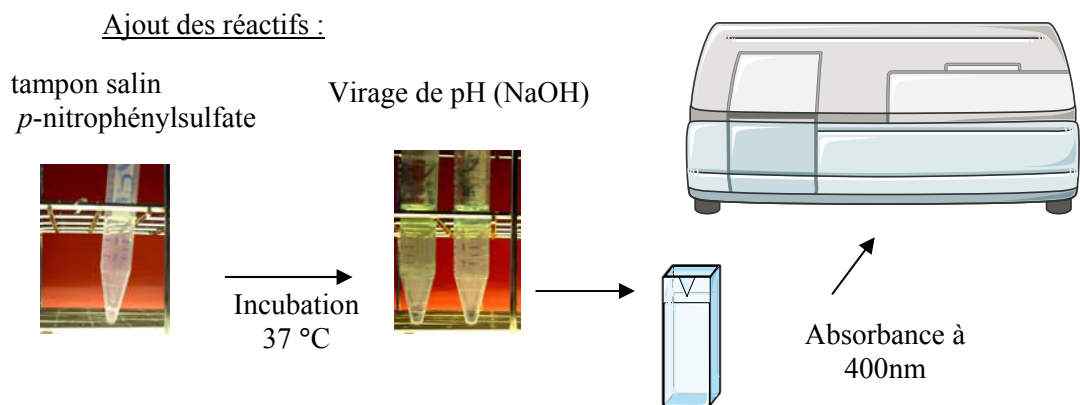
bactériens sont lavés à trois reprises dans du milieu M9 sans S et les cellules sont lysées par choc

Chapitre 4. Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

2 - Compartimentation de l'arylsulfatase



Mesure de l'activité ARS sur chaque fraction cellulaire



thermique (de la même manière que précédemment), afin d'obtenir un lysat cellulaire contenant notamment le cytoplasme des cellules et les membranes cellulaires. Ce lysat est re-suspendu dans 1 ml de tampon acétate à pH 5,8 à 0,5M puis est centrifugé à 13000 g durant 30 min, à 4 °C, afin de «culotter» les membranes (Beil *et al.*, 1995). Après centrifugation, la fraction soluble, contenant notamment le cytoplasme (et le périplasme chez les bactéries Gram-), est récupérée et définie comme la fraction intracellulaire. Les résidus membranaires, lavés par trois lavages successifs dans un tampon acétate (pH 5,8 à 0,5M) puis repris dans 1 ml de ce même tampon, constituent alors la fraction membranaire. Les mesures de l'activité arylsulfatase sont réalisées par un dosage colorimétrique, comme précédemment.

2.2.2. Conditions d'inductions selon la disponibilité en sulfate du milieu

Durant cette expérimentation, nous avons tenté de déterminer dans quelle mesure l'activité arylsulfatase était induite en présence de différentes concentrations en sulfates. Pour ce faire, les cultures ont été incubées comme précédemment avec une gamme de concentration en sulfates de 0 µM, 25 µM, 125 µM, 250 µM et 2500 µM de S-sulfates, à laquelle a été systématiquement ajouté du *p*-NPS à une concentration de 250 µM. Nous avons d'une part, déterminé la compartimentation cellulaire de l'activité arylsulfatase (extracellulaire, intracellulaire, membranaire) et d'autre part, appréhendé le niveau d'activité arylsulfatase en présence de ces différentes sources de S.

2.3. Analyses statistiques

Les courbes de croissance des cultures bactériennes sont modélisées à partir de modèles sigmoïdes en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5.00 pour Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

$$\text{Abs à DO}_{600\text{nm}}(t_i) = \text{Abs à DO}_{600\text{nm}}(t_0) + \frac{\text{Abs à DO}_{600\text{nm}}(t_f) - \text{Abs à DO}_{600\text{nm}}(t_0)}{1 + 10^{(t \mu_{\max} - t_i) \times \mu_{\max}}}$$

Formule du modèle sigmoïde utilisé avec le logiciel GraphPad Prism :

- Abs à DO_{600nm} (t=0) équivaut à la concentration cellulaire au temps initial à savoir, DO=0,2
- Abs à DO_{600nm}(t_f) équivaut à la concentration cellulaire en phase stationnaire
- μ équivaut au taux de croissance spécifique en absorbance à DO_{600nm} h⁻¹
- tμ_{max} équivaut au temps (h) nécessaire pour atteindre la pleine phase exponentielle et correspond à l'abscisse où le taux de croissance spécifique est maximal (μ_{max})

Ainsi, différents paramètres de croissance sont établis :

- le taux de croissance spécifique maximal qui correspond à la vitesse maximale de développement du microorganisme dans ses conditions de culture, μ_{\max} , (en unité d'absorbance à la densité optique de 600 nm h⁻¹),
- le temps, $t_{\mu_{\max}}$, (heure) nécessaire pour atteindre le taux de croissance spécifique maximal,
- et la concentration cellulaire en phase stationnaire de croissance (en unité d'absorbance à la densité optique de 600 nm).

Ces trois paramètres ont été comparés par une analyse statistique de type ANOVA, après vérification de la normalité des données, par le test de Kolmogorov-Smirnov.

3. Résultats

3.1. Croissance bactérienne et activité arylsulfatase

Nous avons étudié la croissance des microorganismes (*Rhodococcus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Streptomyces sp.* et *Stenotrophomonas sp.*) dans des milieux de culture contenant différentes formes de S et dans des conditions *a priori* non limitantes en S. Nous avons utilisé une forme minérale de S (sulfates) et 4 formes organiques de S (la cystéine, la méthionine, le *p*-NCS et le *p*-NPS) afin de déterminer quels sont leurs substrats préférentiels de croissance pour ces microorganismes. Les courbes de croissance obtenues ont été modélisées selon un modèle sigmoïdal (Figure 1). La modélisation des croissances bactériennes a permis de définir différents paramètres de croissance (μ_{\max} , $t_{\mu_{\max}}$ et Abs à DO_{600nm}(tf)) et nous avons retenu dans le cadre de cette étude, μ_{\max} qui correspond à la vitesse de croissance maximale.

En parallèle, l'activité ARS a été suivie.

3.1.1. Croissance des microorganismes

Globalement, les différentes sources de soufre permettent un développement des microorganismes étudiés. Trois phases de croissance peuvent être définies : une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire (Figure 1). Quelle que soit la nature du S présent dans le milieu de culture, la durée de la phase de latence est en moyenne de 6 heures pour les Actinobactéries (Figure 1 A, B, C) et 3 heures pour *Stenotrophomonas sp.* (Figure 1D). Concernant la phase stationnaire de croissance, celle-ci est atteinte en moyenne après 17 à 20 h de culture pour les Actinobactéries et en moyenne après 13h pour *Stenotrophomonas*.

La vitesse maximale de croissance (μ_{\max}) des différentes souches étudiées sur les différentes sources de S est présentée dans le Tableau 1. Pour *Rhodococcus sp.* et *Microbacterium sp.*,

aucune différence de μ_{\max} n'est observée, quelle que soit la source de S présente dans le milieu de culture. Pour ces deux souches, nous observons cependant une concentration cellulaire en phase stationnaire de croissance significativement plus importante pour le milieu de culture contenant de la méthionine comparativement aux autres milieux avec respectivement pour *Rhodococcus sp.* et *Microbacterium sp.* des valeurs d'absorbance à la DO_{600nm} de 2,21 et 2,26 pour le milieu contenant la méthionine comparée à des valeurs d'absorbance de 1,11 et 1,29 à 1,79 et 1,65 pour les milieux contenant la cystéine et le *p*-NPS (Figures 1 B et 1 C). Pour *Streptomyces* et *Stenotrophomonas*, des différences significatives de μ_{\max} sont observées selon la nature du S présent dans le milieu. Ainsi, pour *Streptomyces*, μ_{\max} est significativement plus élevé en présence de cystéine, sulfates ou esters de sulfate comparativement au μ_{\max} en présence de méthionine, et ce, même si la concentration cellulaire atteinte en phase stationnaire de croissance est similaire quelle que soit la source de S. Chez *Stenotrophomonas sp.*, μ_{\max} est significativement plus important en présence de sulfates ou des deux acides aminés soufrés qu'en présence des esters de sulfate. La concentration cellulaire en phase stationnaire de croissance est par ailleurs plus faible pour les milieux contenant les esters de sulfate.

Tableau 1 : Récapitulatif des μ_{\max} obtenus après la modélisation des sigmoïdes de croissance bactérienne. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Newman-Keuls)

	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
Sulfate	0.14 (ab)	0.12 (a)	0.12 (a)	0.29 (ab)
Cystéine	0.23 (a)	0.13 (a)	0.13 (a)	0.26 (ab)
Méthionine	0.13 (b)	0.09 (a)	0.11 (a)	0.35 (a)
<i>p</i> -NPS	0.14 (ab)	0.08 (a)	0.08 (a)	0.11 (c)
<i>p</i> -NCS	0.15 (ab)	0.08 (a)	0.09 (a)	0.21 (bc)

3.1.2. Induction de l'activité arylsulfatase

En parallèle, nous avons suivi l'évolution de l'activité arylsulfatase au cours de la croissance des microorganismes. Une activité arylsulfatase résiduelle est systématiquement observée, pour toutes les souches et pour l'ensemble des traitements, après 3 heures de culture. Cette activité arylsulfatase est de 2 à 5 $\mu\text{g de } p\text{-NP h}^{-1}$ 1 U de DO pour *Stenotrophomonas sp* et 10 à 20 $\mu\text{g de } p\text{-NP h}^{-1}$ 1 U de DO pour les Actinobactéries. Six heures après mise en incubation, aucune activité n'est détectée dans les milieux contenant du sulfate ou de la cystéine, pour l'ensemble des souches. Par contre, une activité arylsulfatase est détectée en présence de *p*-NPS et de *p*-NCS. Dans le milieu contenant du *p*-NPS, le niveau d'activité arylsulfatase est similaire à celui mesuré 3 h après mise en incubation.

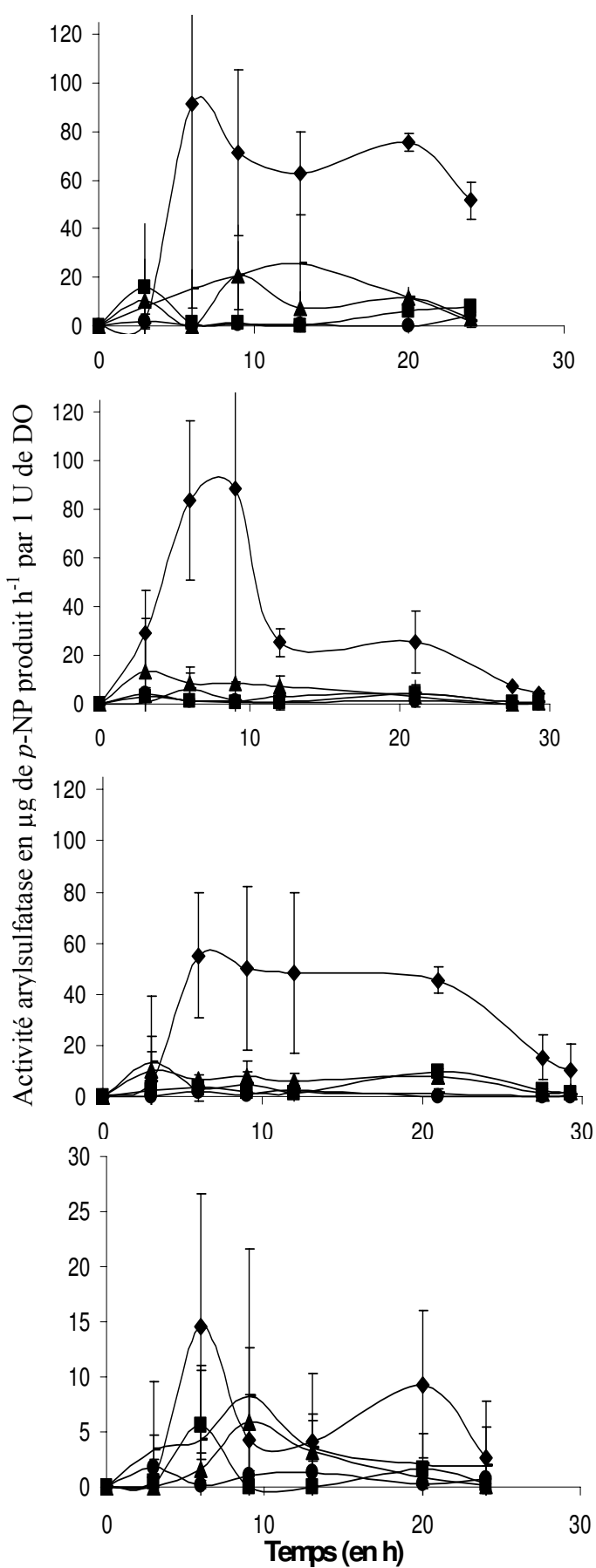
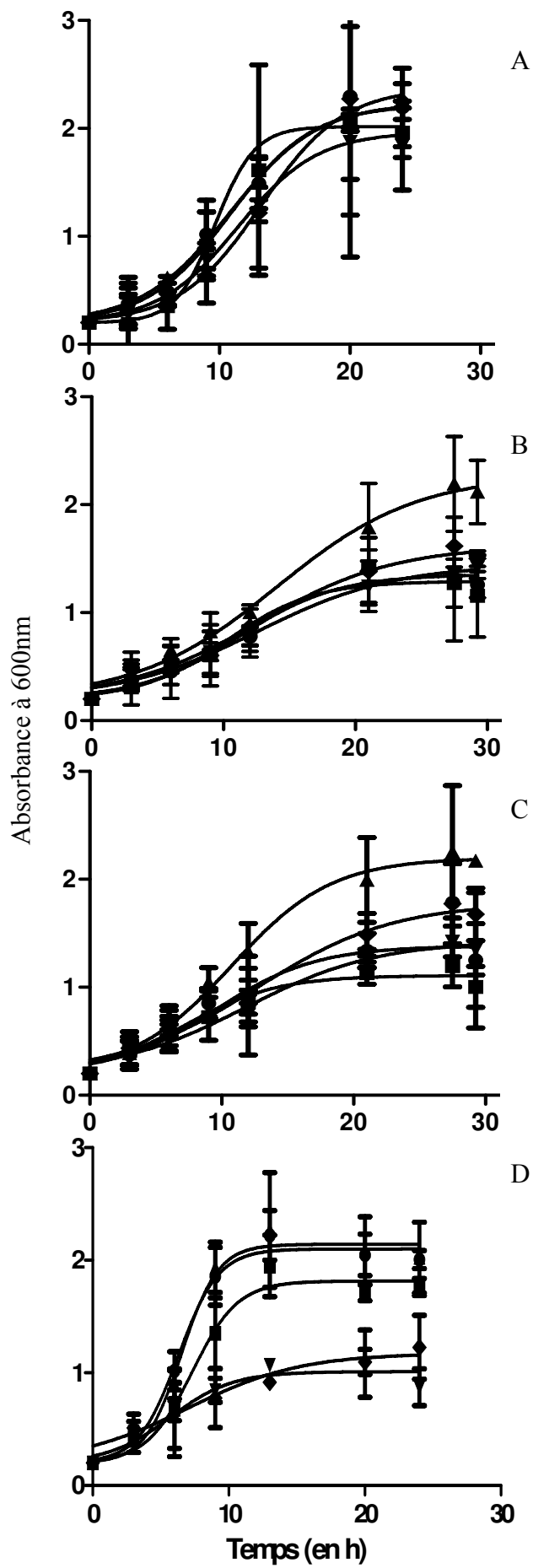


Figure 1 : Croissance des microorganismes affiliés à *Streptomyces* sp. (A), *Rhodococcus* sp. PLL-1 (B), *Microbacterium* sp. 5 (C) et *Stenotrophomonas* sp. (D) en présence de différentes sources de soufre (à gauche) et leur activité arylsulfatase respective au cours du temps (à droite). Les différentes sources de soufre utilisées dans cette étude sont : le sulfate (●) ; la cystéine (■) ; la méthionine (▲) ; le p-nitrophénylsulfate (▼/_) et le p-nitrocatécholsulfate (◆).

Par contre, dans le milieu contenant le p-NCS, l'activité arylsulfatase augmente pour atteindre 90, 82, 57 et 15 μg de p-NP h^{-1} 1 U de DO respectivement pour *Streptomyces* sp. (Figure 1 A), *Rhodococcus* sp. PLL-1 (Figure 1 B), *Microbacterium* sp. 5 (Figure 1 C) et *Stenotrophomonas* (Figure 1 D). En outre, l'activité arylsulfatase mesurée dans le milieu contenant le p-NCS, perdure tout au long de la croissance de *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp. mais semble diminuer après 12 h de culture pour *Rhodococcus* sp. Ainsi, l'activité arylsulfatase semble présenter des patterns d'inductions différents selon la souche étudiée.

3.2. Compartimentation et induction de l'activité arylsulfatase

3.2.1 Compartimentation de l'activité arylsulfatase

Les arylsulfatases bactériennes sont pour la plupart des protéines solubles cytosoliques. Cependant, certaines arylsulfatases, notamment chez *Klebsiella pneumoniae* ont été localisées dans le périplasma. Nous avons donc précisé le compartiment cellulaire de cette activité enzymatique pour les 4 souches étudiées. Après 9 h de culture dans le milieu contenant comme seule source de S, le p-NPS à 250 μM , les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation. Le surnageant de centrifugation constitue la fraction extracellulaire. Les cellules bactériennes ont été lysées par choc thermique en présence de tampon acétate. Après centrifugation, le surnageant a été recueilli pour constituer la fraction intracellulaire et le culot pour constituer la fraction membranaire.

Une activité arylsulfatase est détectée dans les fractions intracellulaire et membranaire, pour la souche bactérienne affiliée à *Streptomyces* sp. (Tableau 2). Par contre, pour les souches affiliées à *Microbacterium* sp. 5 et *Rhodococcus* sp. PLL-1, seule une activité arylsulfatase est détectée dans la fraction membranaire. Enfin, concernant la souche affiliée à *Stenotrophomonas* sp. 4 O 7, seule une activité arylsulfatase est détectée dans la fraction intracellulaire.

Tableau 2 : Compartimentation cellulaire de l'activité arylsulfatase après 9h de culture chez les souches affiliées à *Stenotrophomonas* sp. 4 O 7, *Streptomyces* sp., *Rhodococcus* sp. PLL-1 et *Microbacterium* sp. 5, dans un milieu M9+ p-NPS (Activité intracellulaire : A i, Activité membranaire : A m, Activité extracellulaire A e)

Genre bactérien	M9 + p-NPS		
	A i	A e	A m
<i>Stenotrophomonas</i> sp 4 O 7	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp	+	-	+
<i>Microbacterium</i> sp 5	-	-	+
<i>Rhodococcus</i> sp PLL-1	-	-	+

3.2.2 Induction de l'arylsulfatase

Nous avons enfin précisé les conditions d'induction de l'activité arylsulfatase en fonction de la disponibilité en S minéral du milieu. Pour cela, les souches ont été mises en culture sur un milieu M9 contenant de 0 à 2500 μM de S-sulfates et 250 μM de S organique sous forme de p-NPS (Tableau 2). Il ressort, que chez les 4 souches bactériennes étudiées, l'activité arylsulfatase est exprimée de façon différente. Concernant l'activité arylsulfatase détectée dans la fraction intracellulaire (cas des souches affiliées à *Stenotrophomonas* sp. 4 O 7 et *Streptomyces* sp.), cette activité semble réprimée pour des concentrations en sulfates du milieu supérieures ou égales à 25 μM (Tableau 3). Par contre, concernant l'activité arylsulfatase détectée dans la fraction membranaire (cas des souches *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp. et *Rhodococcus* sp.), elle semble indépendante de la disponibilité en S-sulfates du milieu mais plutôt liée à la présence d'esters de sulfate. Les profils d'induction de l'activité arylsulfatase semblent donc différents selon la compartimentation de l'enzyme.

Tableau 3 : Induction de l'activité arylsulfatase dans les différents compartiments cellulaire chez les souches affiliées à *Stenotrophomonas* sp. 4 O 7, *Streptomyces* sp., *Rhodococcus* sp. PLL-1 et *Microbacterium* sp. 5 en présence d'une source de sulfate minéral variable et d'une source de p-NPS constante (Activité intracellulaire : A i, Activité membranaire : A m)

	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 4 O 7	<i>Streptomyces</i> sp		<i>Rhodococcus</i> sp. PLL-1		<i>Microbacterium</i> sp. 5
	A i	A i	A m	A i	A m	A m
M9 - 0 μM SO_4^{2-} + 0 μM p-NPS	+	+	+		+	+
M9 + 250 μM SO_4^{2-} + 0 μM p-NPS	-	-	-		-	-
M9 + 0 μM SO_4^{2-} + 250 μM de p-NPS	+	+	+		+	+
M9 + 25 μM SO_4^{2-} + 250 μM de p-NPS	-	-	+		+	+
M9 + 125 μM SO_4^{2-} + 250 μM de p-NPS	-	-	+		+	+
M9 + 250 μM SO_4^{2-} + 250 μM de p-NPS	-	-	+	+	+	+
M9 + 2500 μM SO_4^{2-} + 250 μM de p-NPS	-	-	+	+	+	+

4. Discussion

4.1. Croissance bactérienne et activité arylsulfatase

Différents travaux ont mis en évidence l'existence de substrats préférentiels de croissance pour les microorganismes qui diffèrent selon les souches bactériennes considérées (Inada *et al.*, 1996 ; van den Bogaard *et al.*, 2000) et qui semblent également dépendre de la niche écologique qu'occupe l'organisme considéré (Brückner et Titgemeyer, 2002). Concernant plus spécifiquement la modulation de la croissance bactérienne suivant la nature du S présent dans le milieu, les travaux réalisés par Vermeij et Kertesz (1999) se sont avérés être précurseurs. Ces auteurs ont mis en évidence des modifications importantes de la croissance de *Pseudomonas putida* S-313 suivant la nature du S présent dans le milieu (la cystéine, la méthionine, la taurine et des sulfonates). Toutefois, ces travaux se sont limités à l'étude de la croissance de *Pseudomonas putida* S-313 qui, par ailleurs, appartient aux protéobactéries. Or, les souches bactériennes, possédant l'activité arylsulfatase et que nous avons isolées de la rhizosphère d'orge et de colza, étaient majoritairement affiliées aux Actinobactéries (Chapitre 3-2.). Notre intérêt s'est donc porté sur ces bactéries car il n'existe pas actuellement dans la littérature, d'informations disponibles concernant les sources préférentielles de S pour ces bactéries et les conditions d'induction de l'activité arylsulfatase, selon la nature du S présent.

4.1.1. Croissance bactérienne

Le S, sous forme de sulfates, est directement disponible pour la nutrition soufrée des bactéries. Néanmoins, les acides aminés soufrés (cystéine ou méthionine), qui constituent les premières molécules organiques de la voie d'assimilation du S et du fait qu'ils soient déjà réduits par rapport aux sulfates, représentent également des sources de S facilement assimilables (Kredich, 1992 ; Kertesz *et al.*, 1993 ; Seitz *et al.*, 1993 ; Kredich, 1996 ; Kertesz, 1999). Des perméases ainsi que des transporteurs à sulfates, cystéine ou méthionine ont été caractérisés chez différentes bactéries modèles telles qu'*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Kredich, 1996 ; Mansilla et de Mendosa 2000 ; Berger et Heppel, 1972 ; Butler *et al.*, 1993 ; Müller *et al.*, 2005 et Kadner et Watson, 1974 ; Grundy et Ayling, 1992) et permettent l'absorption de ces différentes formes de S.

Nos résultats mettent en évidence pour la souche affiliée à *Stenotrophomonas sp* 4 O 7, une vitesse maximale de croissance (μ_{\max}) plus importante en présence de sulfates ou d'acides aminés soufrés qu'en présence d'esters de sulfate. Ainsi, le sulfate, la cystéine et la méthionine apparaissent comme des substrats préférentiels pour la croissance de *Stenotrophomonas sp* comparativement aux esters de sulfate. Par contre, concernant les

Actinobactéries, aucune différence significative, en terme de vitesse maximale de croissance, n'est observée quelle que soit la source de S présente dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que chez ces souches, des esters de sulfate tels que le *p*-NCS et *p*-NPS, peuvent constituer des substrats préférentiels de croissance, en plus de formes de S plus facilement assimilables comme le sulfate ou les acides aminés soufrés. Ce résultat tend à confirmer la plasticité reconnue de ces microorganismes et leurs fortes capacités d'adaptation au sein d'environnements variés (Allgaier *et al.*, 2007).

4.1.2. Activité arylsulfatase et croissance bactérienne

Chez *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7, l'activité arylsulfatase ne semble pas induite en présence de sulfates ou des deux acides aminés (cystéine ou méthionine). Ainsi, les intermédiaires de la voie d'assimilation de S (Kredich, 1996), n'induisent pas cette activité comme cela a été observé précédemment chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999). Par contre, une faible activité arylsulfatase est détectée au cours de la croissance en présence d'esters de sulfate (Figure 1). Ces observations sont donc conformes aux résultats de la littérature (Dodgson *et al.*, 1982 ; Kertesz, 1993 ; Beil *et al.*, 1995) et suggèreraient l'implication de l'activité arylsulfatase dans l'hydrolyse de S organique type esters de sulfates, afin de satisfaire les besoins en S de ce microorganisme. En outre, l'activité arylsulfatase est faible en présence de ces deux esters de sulfate et ne semble pas permettre une croissance similaire à celle observée avec les intermédiaires directs de la voie de biosynthèse de la cystéine. Pour les Actinobactéries, les intermédiaires directs de la voie d'assimilation de S (le sulfate et la cystéine) n'induisent pas l'activité arylsulfatase, comme cela a été observé dans le cas de *Stenotrophomonas*. Par contre, une faible induction de l'activité arylsulfatase est observée dans un milieu contenant de la méthionine ou l'ester de sulfate, *p*-NPS. Ce résultat semble traduire une non inhibition de l'activité arylsulfatase chez ces microorganismes, comme cela a été mis en évidence chez *Klebsiella pneumoniae* (Harada et Spencer, 1964 ; Adachi *et al.*, 1975). Par contre, en présence de *p*-NCS, une induction très importante de l'activité arylsulfatase est détectée. Enfin, chez ces microorganismes, le nitrocatechol semble être suffisamment hydrolysé par l'arylsulfatase afin d'assurer une croissance proche de celle observée avec des formes de S directement assimilables comme les sulfates et la cystéine.

En dépit d'une activité arylsulfatase plus faible en présence de *p*-NPS qu'en présence de *p*-NCS, une croissance similaire a été observée. En présence de *p*-NPS, les « conditions

limitantes » en S pourraient être compensées par des mécanismes permettant aux cellules bactériennes d'économiser le S. A ce sujet, Roberts *et al.*, (1955) ont mis en évidence dans le cas d'*Escherichia coli* en situation de carence en S, que les cellules bactériennes étaient toujours viables malgré une diminution de près de 50 % du contenu en S total de ces cellules. Dans ces conditions, les microorganismes s'adaptent en synthétisant des protéines possédant peu d'acides aminés soufrés. Les acides aminés soufrés sont alors remplacés par d'autres acides aminés (Mazel et Marlière ; 1989). Cette ré-orientation du métabolisme cellulaire pourraient permettre aux souches *Streptomyces sp.*, *Microbacterium sp.* et *Rhodococcus sp.* de compenser la plus faible activité arylsulfatase observée dans le cas du milieu contenant le *p*-NPS.

4.2. Compartimentation de l'activité arylsulfatase

La présence d'une activité arylsulfatase intracellulaire, comme celle observée chez les souches affiliées à *Streptomyces sp.* et *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7, a déjà été recensée dans la littérature notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999).

Chez *Klebsiella pneumoniae*, les travaux réalisés ont mis en évidence une activité arylsulfatase localisée au sein du périplasme (Adachi *et al.*, 1975). Chez cette bactérie, cette localisation provient de la présence d'un peptide signal, qui a été identifié dans la séquence primaire de la protéine et qui permet un adressage dans ce compartiment (Kertesz, 1999). Durant cette expérimentation, nous n'avons pas observé d'activité arylsulfatase extracellulaire. Par contre, nous avons pu identifier une activité arylsulfatase membranaire chez *Streptomyces sp.*, *Microbacterium sp.* et *Rhodococcus sp.* (Tableau 2). A notre connaissance, aucune activité arylsulfatase membranaire n'a été, jusqu'à présent, recensée chez des bactéries. Mitsunaga-Nakatsubo *et al.*, (1998) ont déjà mis en évidence la présence d'une arylsulfatase, non fonctionnelle, en surface de la membrane cellulaire d'embryons de *Hemicentrotus pulcherrimus* (un oursin). En outre, chez le champignon modèle *Neurospora crassa*, les travaux de Scott et Metzenberg (1970) ont mis en évidence la présence d'arylsulfatases cryptiques associées à la membrane plasmique. Ainsi, nos résultats suggèrent que certaines arylsulfatases bactériennes pourraient donc être associées aux membranes cellulaires, tout en étant fonctionnelles.

4.3. L'effet répresseur du sulfate sur l'activité arylsulfatase

Chez les microorganismes étudiés, la synthèse de l'arylsulfatase semble être induite pour répondre aux besoins en S des cellules bactériennes (Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999). Dans le cas de *Stenotrophomonas sp.* et de *Streptomyces sp.*, l'activité l'arylsulfatase intracellulaire ne semble pas induite en présence de sulfate (Tableau 4). Ainsi, le sulfate ou ses intermédiaires de la voie d'assimilation de S pourraient jouer un rôle de répresseur sur l'induction des gènes codant les SSI protéines comme notamment l'arylsulfatase (Kredich, 1992 ; 1996 ; Fernandez *et al.*, 2002). Par contre, cet effet répresseur du sulfate n'a pas été observé pour l'activité arylsulfatase membranaire détectée chez *Microbacterium sp.*, *Rhodococcus sp.* et *Streptomyces sp.* En effet, indépendamment de la concentration en sulfate dans le milieu de culture, l'activité arylsulfatase membranaire est induite par la présence du substrat de l'enzyme. En conclusion, ces différents résultats tendent à indiquer l'existence de différents pools d'arylsulfatases au sein des bactéries et notamment des Actinobactéries. En outre, les conditions d'induction de ces pools d'arylsulfatases sembleraient dépendre de leur localisation plutôt que d'être spécifique à l'organisme considéré.

5. Conclusion

Au cours de cette expérimentation, nous avons pu mettre en évidence la présence d'arylsulfatases dans le compartiment membranaire (enchâssées ou associées à la membrane plasmique) pour les souches bactériennes affiliées à *Microbacterium sp.* et à *Rhodococcus sp.*. En outre, pour la souche bactérienne affiliée à *Streptomyces sp.* l'activité arylsulfatase a été observée au sein de deux compartiments cellulaires (dans le cytoplasme et associée aux membranes plasmiques). Enfin, pour la souche affiliée à *Stenotrophomonas sp.*, l'activité arylsulfatase a strictement été observée dans le cytoplasme.

Par ailleurs, d'après nos résultats, l'induction de l'activité arylsulfatase semble dépendante de sa compartimentation, pour les souches bactériennes étudiées. En effet, les activités arylsulfatases dans le cytoplasme et celles associées aux membranes plasmiques ne sont pas induites de la même façon par rapport aux conditions de limitation en sulfate. Dans ce sens, l'activité arylsulfatase cytosolique semble induite en situation de limitation en sulfate et semble donc répondre au besoin en S de la cellule. Alors que les activités arylsulfatases associées aux membranes semblent induites par la présence du substrat de l'enzyme.

En outre, il apparaît, à la vue de nos résultats, que les arylsulfatases que nous avons étudiées ne semblent pas capables d'hydrolyser de la même façon les différents types d'esters de sulfate, comme cela a déjà été mis en évidence dans la littérature (Hanson *et al.*, 2004).

Enfin, nos travaux mettent en évidence les capacités d'adaptation importantes des Actinobactéries étudiées à leur environnement et le fait que ces bactéries présentent donc une certaine plasticité, vis-à-vis de la demande en S, ceci par rapport aux souches bactériennes comme *Stenotrophomonas sp.* qui présente une croissance limitée dans des environnements où la source de S est peu accessible.

6. Références Bibliographiques

- Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1975. Regulation of Arylsulfatase Synthesis by Sulfur Compounds in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 121: 29-35.
- Allgaier M., Brückner S., Jaspers E., Grossart H.-P. 2007. Intra- and inter-lake variability of free-living and particle-associated *Actinobacteria* communities. *Environmental Microbiology*. 9: 2728-2741.
- Beil S., Kehrlt H., James P., Staudenmann W., Cook A.M., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PA0 during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *European Journal of Biochemistry* .229: 385-394.
- Berger E.A., Heppel L.A. 1972. A binding protein involved in the transport of cysteine and diaminopimelic acid in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 7684–7694.
- Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. 2006. A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 22464-22470.
- Brückner R., Titgemeyer F. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology letters*. 209: 141-148.

- Butler J.D., Levin S.W., Facchiano A., Miele L., Mukherjee A.B. 1972. Amino acid composition and N-terminal sequence of purified cystine binding protein of *Escherichia coli*. *Life Sciences*. 52: 1209–1215.
- Dierks T., Schmidt B., Borissenko L.V., Peng J., Preusser A., Mariappan M., von Figura K. 2003. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C_α-formylglycine generating enzyme. *Cell*. 113: 435-444.
- Dierks T., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M.A., von Figura K. 1998. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 25560-25564.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. *Sulfatases of Microbial Origin*. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. Vol. 1. pp 109-130.
- Fernandez M., Kleerebezem M., Kuipers O.P., Siezen R.J., van Kranenburg R. 2002. Regulation of the *metC-cysK* Operon, Involved in Sulfur Metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 184: 82-90.
- Grundy C.E., Ayling P.D. 1992. Fine structure mapping and complementation studies of the *metD* methionine transport system in *Salmonella typhimurium*, *Genetical Research*. 60: 1-6.
- Grundy F.J., Henkin T.M. 1998. The S box regulon : a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 30: 737-749.
- Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. 2004. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie International Edition*. 43: 5736-5763
- Harada, T., Spencer B. 1964. Repression and induction of arylsulfatase synthesis in *Aerobacter aerogenes*. *Biochemical Journal*. 93:373-378.

- Harada, T., Spencer B. 1962. The effect of sulfate assimilation on the induction of arylsulfatase synthesis in fungi. *Biochemical Journal*. 82:148-156.
- Inada T., Kimata K., Aiba H. 1996. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to Cells*. 1: 293-301.
- Kadner R.J., Watson W.J. 1974. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems. *Journal of Bacteriology*. 119: 401-409.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulphate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 2296-2303.
- Kredich N.M., 1992. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhirium* and *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 6: 2747-2753.
- Kredich N.M., 1996. Biosynthesis of cysteine. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2nd edn. Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaetetcher M. Et Umbarger H.E. (Eds.) ASM Press. Washington, DC. pp. 514-527.
- Mansilla M.C., de Mendoza D. 2000. The *Bacillus subtilis cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology*. 146: 815-821.
- Mazel D., Marliere P. 1989 Adaptive eradication of methionine and cysteine from bacterial light-harvesting proteins. *Nature*. 341: 245-248.
- Mitsunaga-Nakatsubo K., Akasaka K., Akimoto Y., Akiba E., Kitajima T., Tomita M., Hirano H., Shimada H. 1998. Arylsulfatase Exists as Non-Enzymatic Cell Surface Protein in Sea Urchin Embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 280: 220–230.

- Müller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levnikov V.M., Fogg M.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J. 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Molecular Microbiology*. 57: 143-155.
- Murooka Y., Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashita M. 1990. A Sulfur- and Tyramine-Regulated *Klebsiella aerogenes* Operon Containing the Arylsulfatase (*atsA*) Gene and the *atsB* Gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.
- Murooka Y., Adachi T., Okamura H., Harada T. 1977. Genetic Control of Arylsulfatase Synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 130: 74-81.
- Quadroni M., James P., Dainese-Hatt P., Kertesz M.A. 1999. Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulphate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 266: 986-996.
- Roberts R.B., Abelson P.H., Cowie D.B., Bolton E.T., Britten R.J. 1955. *Studies of Biosynthesis in Escherichia coli*, Carnegie Institution, Washington, DC
- Scott W.A., Metzenberg R.L. 1970. Location of aryl sulfatase in conidia and young mycelia of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 104: 1254-1265.
- Seitz A.P., Leadbetter E.R., Godchaux III W. 1993. Utilization of sulfonates as sole sulfur source by soil bacteria including *Comamonas acidovorans*. *Archives of Microbiology*. 159: 440-444.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Forms of sulfur and carbon, nitrogen and sulfur relationships in Iowa soils. *Soil Science*. 114: 380-386.
- van den Bogaard P.T.C., Kleerebezem M., Kuipers O.P., de Vos W.M. 2000. Control of lactose transport, β -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus*

thermophilus: Evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *Journal of Bacteriology*. 182: 5982-5989.

Vermeij P., Kertesz M.A. 1999. Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*. 181: 5833-5837.

Chapitre 5. Caractérisation moléculaire de la communauté
bactérienne minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

La mise au point d'outils moléculaires ciblant les gènes codant l'arylsulfatase a été entreprise afin de disposer par la suite d'outils permettant la détection de bactéries possédant l'activité ARS par des approches moléculaires et en s'affranchissant donc d'une étape de mise en culture des microorganismes.

Ce travail va faire l'objet d'un article méthodologique

Design and evaluation of PCR primers for analysis of soil bacterial communities possessing arylsulfatase activity

Mickael Cregut, Séverine Piutti, Alain Hehn, Sophie Slezack-Deschaumes, Isabelle Crovisier, Phuy Chhoy Vong and Emile Benizri. *En préparation.*

Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

Résumé

L'arylsulfatase est considérée comme une enzyme microbienne impliquée de façon majeure dans le turn-over du soufre. Au cours de cette étude, nous avons développé des outils moléculaires pour caractériser la diversité du gène *atsA*, codant l'arylsulfatase, chez des bactéries isolées de sols rhizosphériques. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la présence de ce gène chez des microorganismes taxonomiquement très éloignés : chez des bactéries affiliées aux β - et γ -protéobactéries, ainsi que chez des Planctomycètes, des Firmicutes et une large diversité d'Actinobactéries. Enfin, une approche basée sur la comparaison phylogénétique du gène 16S et d'une portion du gène *atsA* n'a pas mis en évidence de congruence entre ces deux gènes.

Mots-clés

Activité arylsulfatase, *atsA*, esters de sulfate, sulfatases, oligonucléotides

1. Introduction

L'élément soufre (S) joue un rôle vital dans le métabolisme des organismes vivants et notamment pour les végétaux. Néanmoins, depuis une trentaine d'années, des symptômes de déficiences en S sont apparus chez des espèces cultivées. Ces déficiences en S sont à l'origine de baisses du rendement et de la qualité des récoltes (Sommer *et al.*, 1986 ; Eriksen *et al.*, 1995 ; Knauff *et al.*, 2003).

Le S dans les sols agricoles est majoritairement constitué d'esters de sulfate (Bettany et Stewart, 1982), considérés, dans ces sols, comme la source de S organique la plus labile (Tabatabai, 1984). Ce pool de S labile se retrouve rapidement disponible pour les plantes après sa transformation et son immobilisation par les microorganismes (McLaren *et al.*, 1985). En effet, de par le rapide turn-over microbien, ce pool de soufre immobilisé, majoritairement sous forme d'acides aminés, se retrouve rapidement disponible pour la nutrition soufrée des plantes et des microorganismes environnants. Les esters de sulfate sont minéralisés par des sulfatases, qui dans le sol sont principalement d'origine microbienne (Kertesz, 1999). Les sulfatases ont été identifiées et répertoriées en six catégories correspondant aux esters de sulfate qu'elles hydrolysent : les arylsulfatases, les alkylsulfatases, les stéroïdes sulfatases, les glucosulfatases, les chondrosulfatases et les myrosulfatases (Roy, 1960). Parmi ces enzymes, l'arylsulfatase, arylsulfate sulfohydrolase (EC : 3.1.6.1), est considérée comme l'enzyme clef de la minéralisation du S organique dans les sols agricoles (Bandick et Dick 1999 ; Ndiaye *et al.*, 2000 ; De la Paz Jimenez *et al.*, 2002).

La capacité à hydrolyser les esters de sulfate, *via* l'arylsulfatase, permet aux microorganismes d'utiliser un large pool d'esters de sulfate comme source de S. Toutefois, les communautés bactériennes indigènes du sol minéralisant le S organique en sulfate, notamment par l'arylsulfatase, n'ont pas encore été caractérisées. Les arylsulfatases de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Pa_{PAO1}) et de *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) présentent de fortes similarités de taille et de séquences d'acides aminés (Murooka *et al.*, 1990 ; Beil *et al.*, 1995). Jusqu'alors, toutes les arylsulfatases caractérisées chez les procaryotes et les eucaryotes possèdent une région en acides aminés relativement conservée au niveau de leur site actif de type : CXP/AXR ou SXPXR, avec en position 5' une sérine (exclusivement chez les procaryotes) ou une cystéine (chez procaryotes et eucaryotes). Ce résidu sérine ou cystéine fait l'objet d'une modification post-traductionnelle qui permet la maturation de l'enzyme arylsulfatase (Berteau *et al.*, 2006).

Afin de mieux interpréter le lien possible entre la diversité de ces communautés fonctionnelles et les processus de minéralisation du S, le développement d'outils moléculaires, ciblant le gène codant l'arylsulfatase, a été entrepris.

En effet, notre objectif est, (i) de dessiner et de valider l'utilisation d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, (ii) d'étudier la diversité du gène codant l'arylsulfatase chez différents isolats bactériens du sol afin de voir le lien entre l'affiliation taxonomique et le potentiel génétique fonctionnel.

2. Matériel et méthodes

2.1. Isolement et caractérisation des souches bactériennes isolées des rhizosphères d'orge et de colza

Les souches bactériennes utilisées ont été isolées de la rhizosphère de colza et d'orge et présentent une coloration bleue sur le milieu M9-X-Sulf (Chapitre 3-2.). De plus, à partir du test d'activité arylsulfatase que nous avons mis au point (Chapitre 3-1), il ressort que ces souches présentent toute une activité arylsulfatase.

La caractérisation taxonomique des souches bactériennes a été réalisée par l'amplification du gène codant l'ARNr 16S. La réaction PCR a été réalisée pour un volume final de 25 µl contenant notamment les amorces universelles 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') comme décrit par Rousseaux *et al.* (2001). Les produits PCR ont par la suite été purifiés par MinElute Extraction kit (Qiagen, Fr) selon les recommandations du fournisseur et ont été séquencés sur Ceq2000XL DNA Analyzer (Beckman, Fr). Leur affiliation taxonomique est présentée dans le Tableau 1.

Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

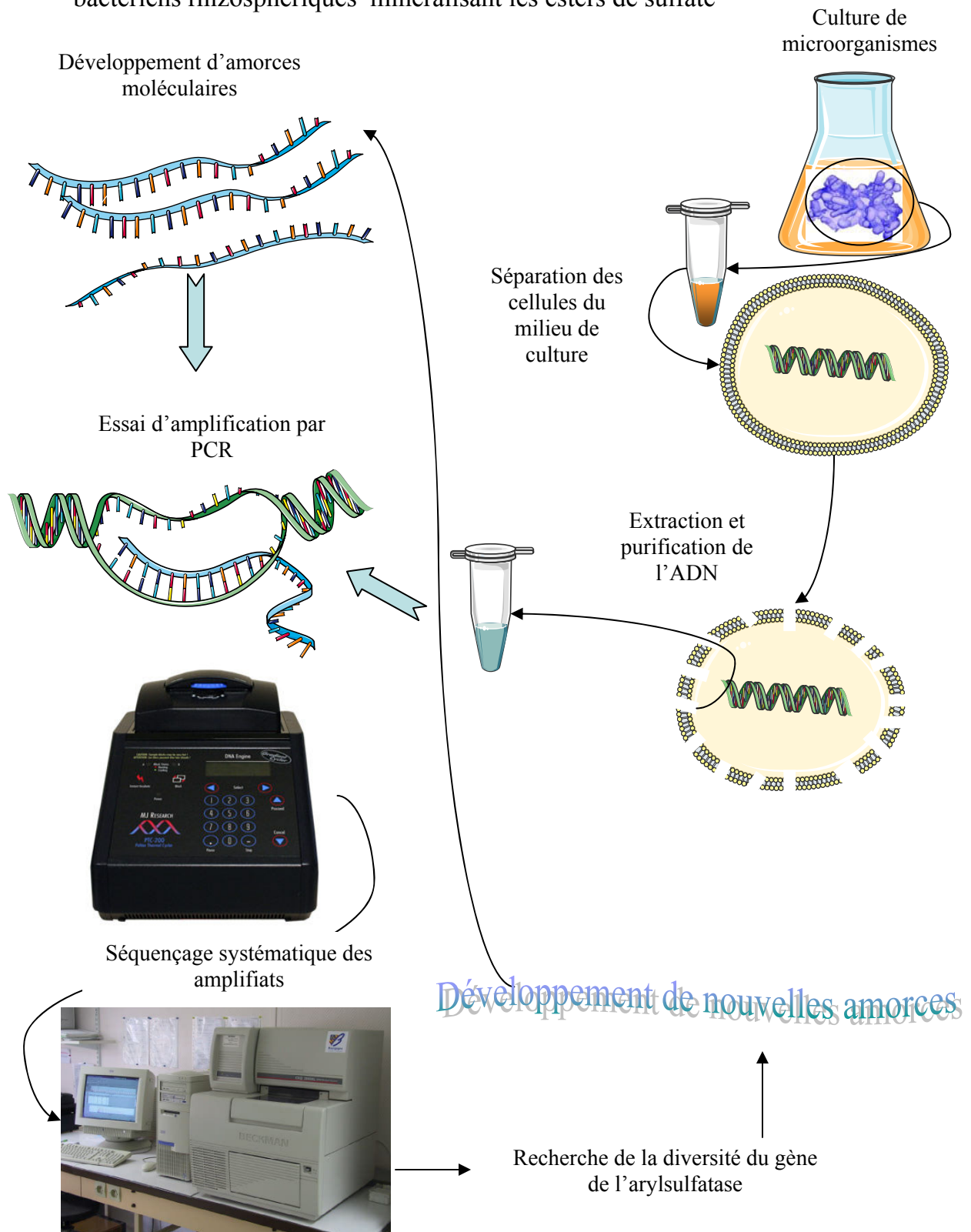


Tableau 1 : Pourcentage d'affiliation des souches bactériennes isolées des rhizosphères d'orge et de colza avec la séquence 16S la plus proche présente dans la Genbank. Il est à noter que les souches *Acinetobacter sp. ADP1* et *Pseudomonas aeruginosa PAO1* ont été utilisées comme contrôle positif et la souche *Flavobacterium sp.* comme contrôle négatif. Ces trois souches bactériennes ne proviennent pas des sols rhizosphériques étudiés

Souche Bactérienne	Homologie de la séquence nucléotidique avec la séquence bactérienne de référence la plus proche, en pourcentage
<i>Str. n° 1</i>	97 % avec <i>Oerskovia turbata</i> NCIMB 10587
<i>Str. n° 2</i>	91 % avec <i>Stenotrophomonas sp. 4 O 7</i>
<i>Str. n° 3</i>	99 % avec <i>Tetrathlobacter kashmirensis str. 445A</i>
<i>Str. n° 4</i>	96 % avec <i>Rhodococcus sp. FJ1117YT</i>
<i>Str. n° 5</i>	99 % avec <i>Bacillus pumilus str. SDB-01</i>
<i>Str. n° 6</i>	92 % avec <i>Oerskovia enterophila.</i>
<i>Str. n° 7</i>	95 % avec <i>Uncultured Alcaligenes sp. clone J15</i>
<i>Str. n° 8</i>	97 % avec <i>Microbacterium sp. 5</i>
<i>Str. n° 9</i>	99 % avec <i>Streptomyces spororaveus str. 173736</i>
<i>Str. n° 10</i>	93 % avec <i>Klebsiella sp. 141</i>
<i>Str. n° 11</i>	98 % avec <i>Rhodococcus sp. PLL-1</i>
<i>Str. n° 12</i>	97 % avec <i>Microbacterium oxydans</i>
<i>Str. n° 13</i>	98 % avec <i>Stenotrophomonas sp. 4 O 7</i>
<i>Str. n° 14</i>	92 % avec <i>Oerskovia ginkgo str. YIM 60535</i>
<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	100 % avec <i>Acinetobacter sp. ADP1</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	100 % avec <i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>
<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>

2.2. Extraction de l'ADN des souches bactériennes

Les cellules bactériennes sont placées dans un tampon PBS (Tris 20 mM, EDTA 50 mM et du NaCl à 150 mM) à 55 °C durant 1 heure. Puis, une lyse est réalisée par incubation en présence de lysozyme (5 mg ml⁻¹) et de protéinase K (1 mg ml⁻¹) durant 2 h à 37 °C. A l'issue de cette étape, les débris cellulaires et protéiques sont séparés des acides nucléiques par centrifugation à 13000 g durant 10 min. Après quoi, le surnageant, contenant les acides nucléiques, est précipité par une addition d'isopropanol absolu à -20 °C (v/v) puis placé à -20 °C pendant 30 min. L'ADN précipité est recueilli par centrifugation à 4 °C à 13000g durant 30 min puis est lavé à l'éthanol à 70 %, à -20 °C, évaporé et repris dans de l'eau Up.

2.3. Amplification du gène *atsA*

Des oligonucléotides ciblant une région de 800 pb du gène codant l'arylsulfatase ont été dessinés à partir de l'alignement de trois séquences fonctionnelles référencées dans la littérature : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (*Pa*_{PAO1}) (Beil *et al.*, 1995), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) (Murooka *et al.*, 1990) et *Mycobacterium avium* 104 (disponible

directement dans la GenBank). Les amorces dégénérées définies suite à cet alignement ont été nommées, respectivement *atsAF* (5' CG(GC)(GT)C(AG)(AT)(CT)GCTGCT(GC)ACCGG 3') et *atsAR* (5' (CT)(CT)GGCGCCGTT(AG)TCGG 3') (Figure 1). En outre, une deuxième amorce « forward » *atsPsF* (5' CGCTCGATGCTGCTCACCGG 3'), directement dessinée dans la séquence du gène caractérisé chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a également été utilisée avec l'amorce reverse *atsAR*. Enfin, l'amorce *atsA175F* a été dessinée à partir de l'alignement de séquences présentées dans cette étude (Figure 2).

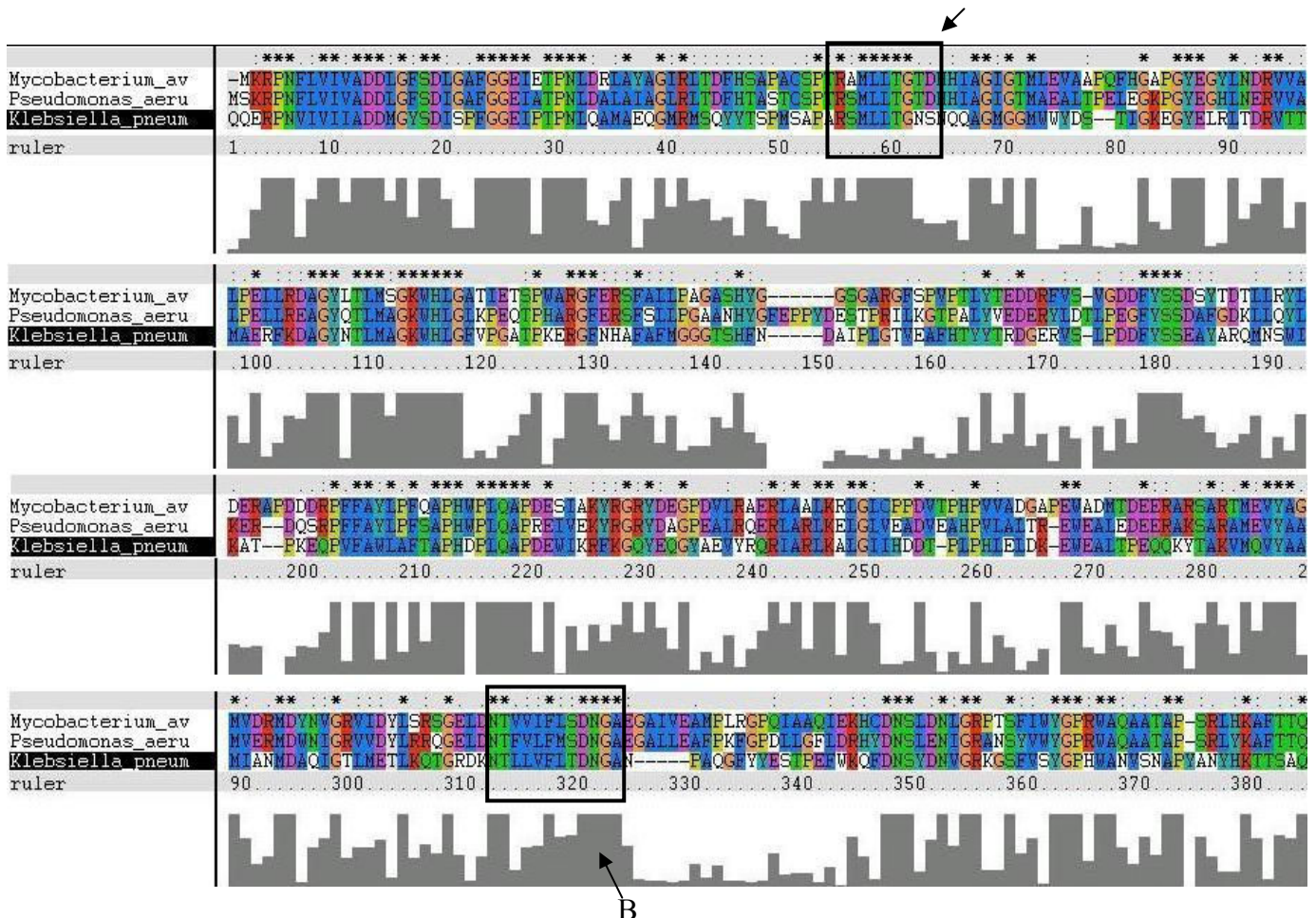


Figure 1 : Alignement à partir de ClustalX, des séquences *atsA* des souches de références, qui ont été utilisées pour dessiner les amorces. Ces séquences sont présentes dans la Genbank et correspondent aux séquences *atsA* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* et *Mycobacterium avium* 104. Les repères sur la figure correspondent respectivement aux sites ciblés par les amorces *atsAF* (A) et *atsAR* (B)

L'amplification est réalisée avec 2 ng μl^{-1} d'ADN extrait dans un volume final de 25 μl contenant 2,5 μl de tampon Taq Polymérase 10 X (MP, Biomedicals, Fr), 200 μM de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 μM de chaque amorce (*atsAPsF* et *atsAR*) et 2,5 U de Taq Polymérase (MP Biomedicals, Fr). Un programme d'amplification d'ADN est réalisé dans un

thermocycleur (i-cycler, Biorad) avec les conditions présentées dans le Tableau 2. La confirmation de l'amplification PCR est réalisée par une migration des amplifiats PCR sur gel d'agarose révélée au BET. Les produits PCR obtenus sont excisés du gel et purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Fr). Puis, les produits PCR purifiés sont clonés dans un vecteur plasmidique pCR[®]8/GW/TOPO avant d'être séquencés par GATC Biotech (Fr).

Tableau 2 : Récapitulatif des amorces moléculaires utilisées au cours de cette étude. Les conditions d'amplification par PCR sont présentées et les chiffres entre parenthèses correspondent aux différents cycles de la PCR

<i>Dénomination de l'amorce PCR</i>	<i>Séquence nucléotidique dans le sens 5' - 3'</i>	<i>Conditions du programme PCR par cycle</i>
<i>atsPsAF</i>	CGCTCGATGCTGCTCACCGG	5 min à 94 °C°; 35 cycles de 1 min à 94 °C ; 1 min à 60 °C ; 1 min à 72 °C°; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>atsAR</i>	(CT) (CT) GGCGCCGTT (AG) TCGG	5 min à 94 °C°; 8 cycles 1 min à 94 °C ; 1 min à 60 °C -> 56 °C (avec une diminution de 0,5 °C / cycle)°; 1 min à 72 °C ; puis 27cycles 1 min à 94 °C ; 1 min à 60 °C ; 1 min à 72 °C°; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>atsAF</i>	CG (GC) (GT) C (AG) (AT) (CT) GCTGCT(GC) ACCGG	5 min à 94 °C°; 35 cycles de 1 min à 94 °C ; 1 min à 60 °C ; 1 min à 72 °C°; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>atsAR</i>	(CT) (CT) GGCGCCGTT (AG) TCGG	5 min à 94 °C°; 35 cycles de 1 min à 94 °C ; 1 min à 60 °C ; 1 min à 72 °C°; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>atsAI75F</i>	(GCT) CGGG (GC) AA (AG)TGGCACCT(GC)	5 min à 94 °C ; 35 cycles de 1 min à 94 °C ; 1min à 54 °C ; 1 min à 72 °C ; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>atsAR</i>	(CT) (CT) GGCGCCGTT (AG) TCGG	5 min à 94 °C ; 35 cycles de 1 min à 94 °C ; 1min à 54 °C ; 1 min à 72 °C ; et une élongation finale de 15 min à 72 °C
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	
<i>SP6</i>	ATTTAGGTGACACTATAGAA	

2.4. Analyse phylogénétique

Des arbres phylogénétiques ont été dessinés, à partir des résultats de l'alignement des séquences des gènes de l'ADNr 16S et de l'arylsulfatase, par l'utilisation de la méthode du neighbour joining. La topologie de l'analyse en bootstrap de l'arbre phylogénétique a été réalisée par la création de 10000 permutations avec le logiciel ClustalX, <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/> (Thompson *et al.*, 1997).

2.5. Numéros d'entrée dans la GenBank des séquences nucléotidiques

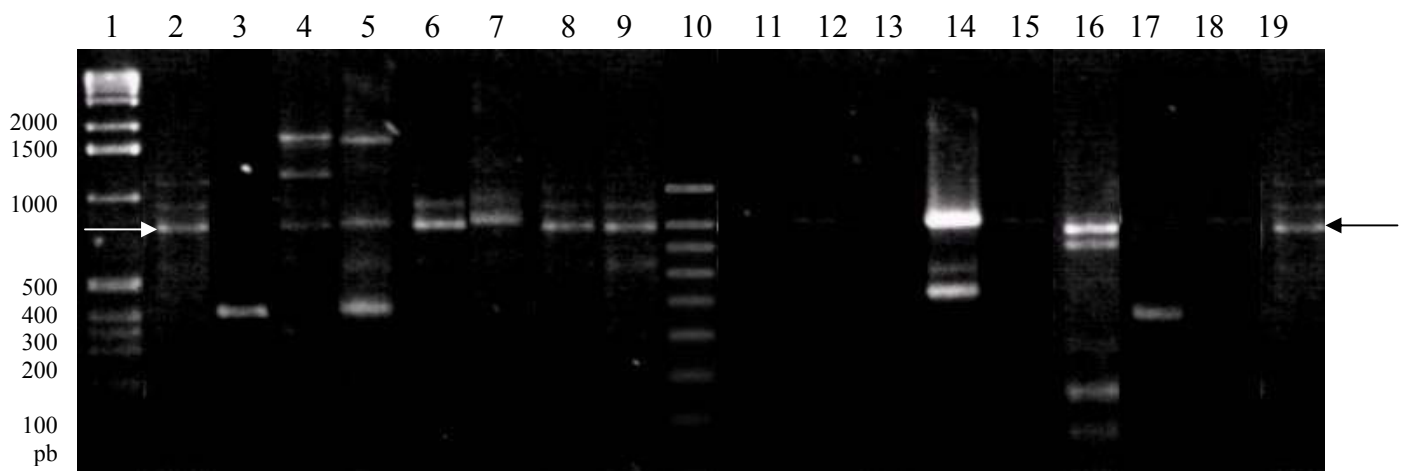
Les séquences partielles de l'ADNr 16S et les séquences partielles du gène de l'unité catalytique de l'arylsulfatase, *atsA*, seront soumises à la GenBank lors de la soumission de cet article à une revue.

3. Résultats

3.1. Amplification et caractérisation du gène *atsA* codant l'arylsulfatase

3.1.1. Amplification *atsA* de 800 pb, à l'aide des amorces *atsPsAF* et *atsAR*

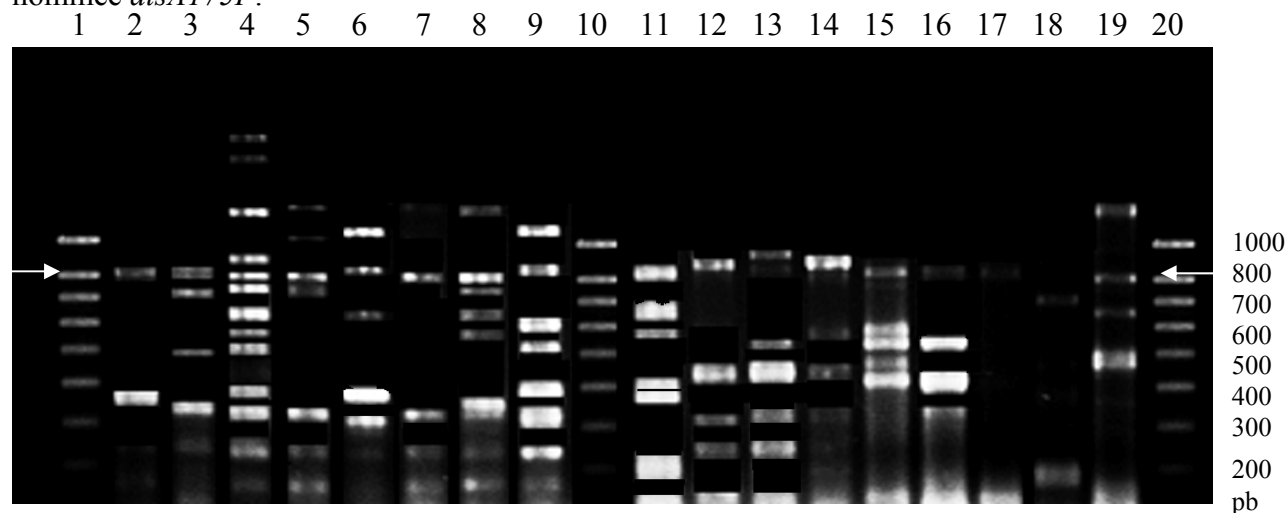
Le jeu d'amorces *atsPsAF* et *atsAR* a été utilisé pour amplifier une portion du gène *atsA* sur l'ADN extrait de souches bactériennes. La température d'hybridation optimale a été évaluée à 60 °C. L'amplification PCR avec ce couple d'amorces (*atsPsAF* et *atsAR*) a permis une amplification avec un fragment de la taille attendue chez près de 61 % des souches criblées (Photographie 1) (Tableau 3). Enfin, le séquençage de ces produits PCR a révélé une affiliation des séquences d'ADN amplifiées aux arylsulfatases de *Pa_{PAO1}* et *Rhodococcus sp. RHA1*.



Photographie 1 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsPsAF* et *atsAR* (1) : 1k ladder (Invitrogen) ; (2) : *Oerskovia sp.* ; (3) : *Stenotrophomonas sp.* ; (4) : *Thetrathobacter kashmirensis sp.* ; (5) : *Rhodococcus sp.* ; (6) : *Bacillus pumilus.* ; (7) : *Oerskovia sp.* ; (8) : *Alcaligenes sp.* ; (9) : *Microbacterium sp.* ; (10) : *Smart Ladder SF ladder (Invitrogen)* ; (11) : *Streptomyces sp.* ; (12) : *Klebsiella sp.* ; (13) : *Rhodococcus sp. PLL-1* ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : *Acinetobacter sp. ADPI* ; (16) : *Pseudomonas aeruginosa PAO1* ; (17) : *Stenotrophomonas sp.* ; (18) : *Flavobacterium sp.* ; (19) : *Oerskovia ginkgo*

3.1.2. Amplification *atsA* de 800 pb, à l'aide des amorces *atsAF* et *atsAR*

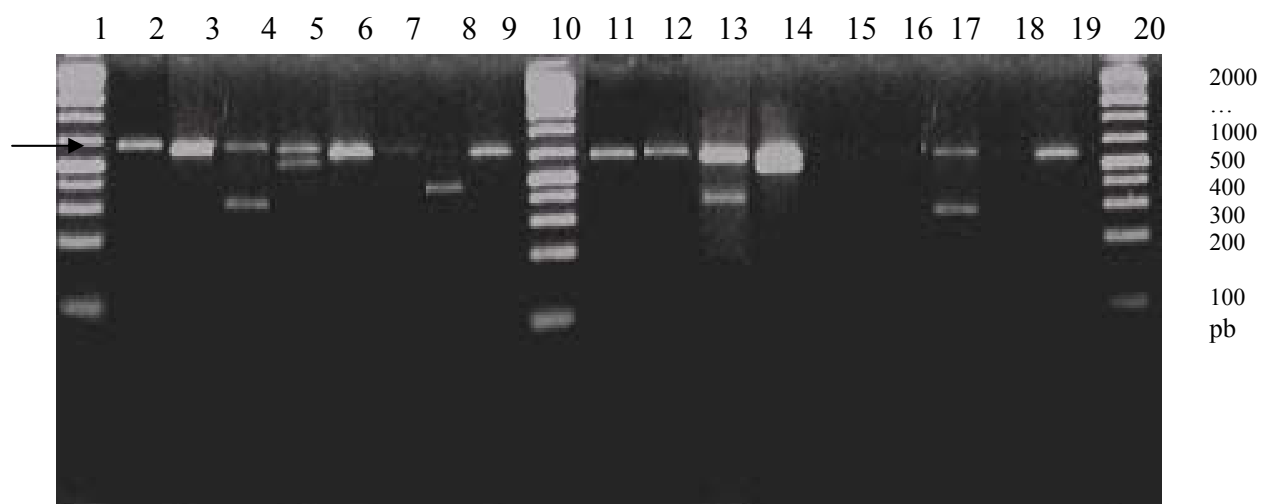
Le jeu d'amorces *atsAF* et *atsAR* a été utilisé pour amplifier une portion du gène *atsA* sur l'ADN extrait de souches bactériennes. La température d'hybridation a été évaluée dans un intervalle de 55 °C à 62 °C avec pour optimum 58 °C. A des températures inférieures à 58 °C de nombreuses bandes aspécifiques, résultant du mésappariement des amorces, ont été observées. A l'inverse, à des températures égales ou supérieures à 58 °C, le nombre de fragments parasites diminuent mais de nombreux fragments PCR de la taille attendue sont également perdus. En effet, à des températures d'hybridations élevées, il ne semble pas possible d'amplifier le fragment PCR de la taille attendue, qui code potentiellement l'arylsulfatase et ceci chez les souches affiliées à *Klebsiella sp*, *Streptomyces sp*, *Rhodococcus sp* PLL-1. Ainsi, pour l'ensemble des souches bactériennes, une amplification du fragment à 800 pb est uniquement visible à une température d'hybridation de 55 °C. C'est pourquoi, malgré l'obtention de bandes parasites, nous avons quand même décidé d'utiliser des températures d'hybridations basses afin d'obtenir le plus de diversité possible et le plus grand nombre de fragments codant l'ARS. Dans ce cadre, un protocole de type TouchDown a été utilisé, afin de limiter l'apparition de produits d'amplification parasites et de permettre une amplification du fragment cible pour les souches difficiles à amplifier (Photographie 2) (Tableau 3). Le séquençage des produits PCR clonés met en évidence l'amplification de produits PCR présentant un important degré d'affiliation avec les gènes codant des arylsulfatases et des sulfatases déjà répertoriées chez *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1, *Pa_{PAO1}* et *Rhodococcus sp*. RHA1. En outre, à partir de l'alignement de ces séquences fonctionnelles, une nouvelle amorce a été définie dans une région conservée d'*atsA* au sein des différentes séquences obtenues. Cette amorce a été nommée *atsA175F*.



Photographie 2 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsAF* et *atsAR* (1) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) ; (2) : *Oerskovia* sp. ; (3) : *Stenotrophomonas* sp. ; (4) : *Thetrathiobacter kashmirensis* sp. ; (5) : *Rhodococcus* sp. ; (6) : *Bacillus pumilus* . ; (7) : *Oeskovia* sp. ; (8) : *Alcaligenes* sp. ; (9) : *Microbacterium* sp. ; (10) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) ; (11) : *Streptomyces* sp. ; (12) : *Klebsiella* sp. ; (13) : *Rhodococcus* sp. *PLL-1* ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : *Acinetobacter* sp. *ADP1* ; (16) : *Pseudomonas aeruginosa PAO1* ; (17) *Stenotrophomonas* sp. ; (18) : *Flavobacterium* sp. ; (19) : *Oerskovia ginkgo* ; (20) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen)

3.1.3. Amplification *atsA* de 633 pb, à l'aide des amorces *atsA175F* et *atsAR*

L'utilisation du jeu d'amorces *atsA175F* et *atsAR* a permis une amplification d'un fragment de 633 pb pour la (quasi)totalité des souches criblées (Photographie 3) (Tableau 3). Par ailleurs, il ressort de cette photographie la présence de peu de bandes aspécifiques. Le séquençage des produits PCR clonés met en évidence l'amplification de produits PCR présentant un important degré d'affiliation avec les gènes codant des arylsulfatases et des sulfatases déjà répertoriées chez *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1, *Pa_{PAO1}* et *Rhodococcus* sp. RHA1. De la même manière que précédemment, le produit PCR de la taille attendue est systématiquement affilié à une arylsulfatase ou à une sulfatase.



Photographie 3 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsA175F* et *atsAR* (1) : 100bp ladder (Fermentas) ; (2) : *Oerskovia* sp. ; (3) : *Stenotrophomonas* sp. ; (4) : *Thetrathiobacter kashmirensis* sp. ; (5) : *Rhodococcus* sp. ; (6) : *Bacillus pumilus*. ; (7) : *Oeskovia* sp. ; (8) : *Alcaligenes* sp. ; (9) : *Microbacterium* sp. ; (10) : 100bp ladder (Fermentas) ; (11)

: *Streptomyces* sp. ; (12) : *Klebsiella* sp. ; (13) : *Rhodococcus* sp. *PLL-1* ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : *témoin négatif* ; (16) : *témoin négatif* ; (17) *Stenotrophomonas* sp. ; (18): *Flavobacterium* sp. ; (19) : *Oerskovia ginkgo* ; (20) : *100bp ladder (Fermentas)*

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats d'amplification par PCR de la collection de souches avec les différents jeux d'amorces utilisés dans cette étude. Il est à noter que les souches Acinetobacter sp. ADP1 et Pseudomonas aeruginosa PAO1 ont été utilisées comme contrôle positif et la souche Flavobacterium sp. comme contrôle négatif. Ces trois souches bactériennes ne proviennent pas des sols rhizosphériques étudiés

N° de souche	Affiliation taxonomique de la souche bactérienne	Amplification PCR à 800 pb		Amplification PCR à 633
		<i>atsPsAF/atsAR</i>	<i>atsAF/atsAR</i>	pb <i>ats175AF/atsAR</i>
Souche avec activité arylsulfatase				
<i>Str. n° 1</i>	<i>Oerskovia turbata</i>	+	+	+
<i>Str. n° 2</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	+	+
<i>Str. n° 3</i>	<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	-	+	+
<i>Str. n° 4</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	+	-	+
<i>Str. n° 5</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+
<i>Str. n° 6</i>	<i>Oerskovia enterophila</i>	+	+	+
<i>Str. n° 7</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	+	+	+
<i>Str. n° 8</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	+	+	+
<i>Str. n° 9</i>	<i>Streptomyces sp.</i>		+	+
<i>Str. n° 10</i>	<i>Klebsiella sp.</i>		+	+
<i>Str. n° 11</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	-	+	+
<i>Str. n° 12</i>	<i>Microbacterium oxydans</i>	+	+	+
<i>Str. n° 13</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	+	+
<i>Str. n° 14</i>	<i>Oerskovia ginkgo</i>	+	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	+	+	+ (non présenté)
	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>		+	+ (non présenté)
Souche sans activité arylsulfatase				
	<i>Flavobacterium sp</i>	-	-	-

3.2. Diversité de séquences du gène *atsA*

3.2.1. Affiliation des séquences *atsA*

Afin d'étudier la diversité du gène, les séquences d'acides aminés, codant potentiellement l'arylsulfatase, ont été alignées sous Blastp et leur(s) affiliation(s) phylogénétique(s) ont été dressées. Globalement, les séquences qui ont été isolées présentent de 49 %, pour une séquence, à 99 % d'homologies avec les arylsulfatases répertoriées dans la Genbank. Ces séquences sont affiliées à celles isolées chez *Rhodococcus sp.* RHA1, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*, *Mycobacterium avium* 104 et *Blastopirellula marina* DSM 3645 (Tableau 4).

Les deux couples d'amorces, que nous avons utilisés pour isoler ces séquences putatives, mettent en évidence des affiliations phylogénétiques comparables pour les souches notées 1, 2, 8, 10 et 13 et pour les contrôles : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Acinetobacter sp.* ADP1. Concernant, les autres souches, le couple d'amorces *atsAF* et *atsAR* a mis en évidence plus de diversité que le couple d'amorces *atsA175F* et *atsAR*. En effet, pour les souches 3, 9, 11 et 12, deux arylsulfatases putatives ont pu être mises en évidence avec le jeu d'amorces *atsAF* et *atsAR* contre une avec le second jeu d'amorces. Par ailleurs, concernant, les souches 3, 4 et 14 des séquences putatives différentes ont été obtenues avec les deux couples d'amorces. Enfin, pour *Bacillus pumilus*, la souche 5, seul le couple *atsA175F* et *atsAR* a permis l'isolement d'une séquence putative affiliée à l'arylsulfatase.

Globalement, la quasi totalité des séquences putatives, que nous avons obtenues avec les amorces *atsA175F* et *atsAR*, présente de forts degrés d'homologie avec la séquence *atsA* de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Ainsi, une diminution de la diversité des séquences *atsA* est constatée avec ces amorces. Toutefois, celles-ci ont permis d'isoler une séquence jusque là inaccessible avec les amorces *atsAF* et *atsAR*, à savoir la séquence *atsA* putative de la souche affiliée à *Bacillus pumilus*.

*Tableau 4 : Homologie, des séquences *atsA*, en acides aminés avec la séquence de référence répertoriée dans la Genbank, présentée en pourcentage avec respectivement Bm : Blastopirellula marina DSM 3645 ; Kp : Klebsiella pneumoniae ; Kpp : Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae ; Ma : Mycobacterium avium 104 ; Ms : Mycobacterium smegmatis str. MC2 155 ; Pa : Pseudomonas aeruginosa ; Pa_{PAO1} : Pseudomonas aeruginosa PAO1 ; Pfo-1 : Pseudomonas fluorescens Pfo-1 ; Pf-5 : Pseudomonas fluorescens Pf-5 et Rh : Rhodococcus sp. RHA1*

N° de souche	Affiliation taxonomique de la souche bactérienne	Homologie en acides aminés avec la séquence de référence la plus proche de la Genbank, (en pourcentage) pour l'amplifiat PCR de 800 pb	Homologie en acides aminés avec la séquence de référence la plus proche de la Genbank, (en pourcentage) pour l'amplifiat PCR de 633 pb
Souche avec activité arylsulfatase			
Str. n° 1	<i>Oerskovia turbata</i>	87 % sulfatase <i>PfO</i> -1 ou 86 % ARS <i>Pf</i> -5	85 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 2	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	97 % ARS <i>Rh</i>	97 % ARS <i>Rh</i>
Str. n° 3	<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	Seq 1 : 99 % ARS <i>Rh</i> Seq 2 : 89 % ARS <i>Rh</i>	84 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 4	<i>Rhodococcus sp.</i>	82 % ARS <i>Rh</i>	84 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 5	<i>Bacillus pumilus</i>		84 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 6	<i>Oerskovia enterophila</i>	49 % ARS <i>Bm</i>	49 % ARS <i>Bm</i>
Str. n° 7	<i>Alcaligenes sp.</i>	85 % sulfatase <i>PfO</i> -1 ou 78 % ARS <i>Pa</i> UCBPP	84 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 8	<i>Microbacterium sp.</i>	92 % sulfatase <i>PfO</i> -1 ou 88 % ARS <i>Pf</i> -5	87 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 9	<i>Streptomyces sp.</i>	Seq 1 : 85 % ARS <i>Pf</i> -5 Seq 2 : 93 % sulfatase <i>PfO</i> -1 ou 89 % ARS <i>Pf</i> -5	82 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 10	<i>Klebsiella sp.</i>	90 % putative ARS <i>Kpp</i>	90 % ARS <i>kpp</i>
Str. n° 11	<i>Rhodococcus sp.</i>	Seq 1 : 97 % ARS <i>Rh</i> Seq 2 : 86 % ARS <i>Pf</i> -5	98 % ARS <i>Rh</i>
Str. n° 12	<i>Microbacterium oxydans</i>	Seq 1 : 87 % ARS <i>Rh</i> Seq 2 : 87 % <i>Ma</i>	87 % ARS <i>Ma</i>
Str. n° 13	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	95 % sulfatase <i>PfO</i> -1 ou 85 % ARS <i>Pf</i> -5	85 % ARS <i>Pf</i> -5
Str. n° 14	<i>Oerskovia ginkgo</i>	87 % possible ARS N-term <i>Rh</i>	99 % ARS <i>Pa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	100% ARS <i>Pa</i>	100% ARS <i>Pa</i>
	<i>Acinetobacter sp.</i> ADP1	87 % ARS <i>Pa</i> ou 87 % ARS <i>Pa</i> _{PAO1}	87 % ARS <i>Pa</i> et 87 % ARS <i>Pa</i> _{PAO1}

3.2.2. Motifs conservés des arylsulfatases isolées

L'alignement des séquences par ClustalX met en évidence quelques régions conservées dans les séquences *atsA* des microorganismes étudiés (Figure 2). Seulement 3 régions semblent conservées pour l'ensemble des arylsulfatases putatives que nous avons isolées, les zones 1, 2 et 3 (Figure 2). A l'inverse, d'importantes différences sont observées entre les arylsulfatases

affiliées à celles des *Pseudomonas* et celles affiliées à *Rhodococcus sp.* RHA1 ou celle de *Mycobacterium smegmatis* (Figure 2). En effet, certaines portions de séquences d'*atsA*, comme celles des zones A, B, C et D, présentent des motifs très conservés et semblent très éloignées des autres groupes de séquences (Figure 2).

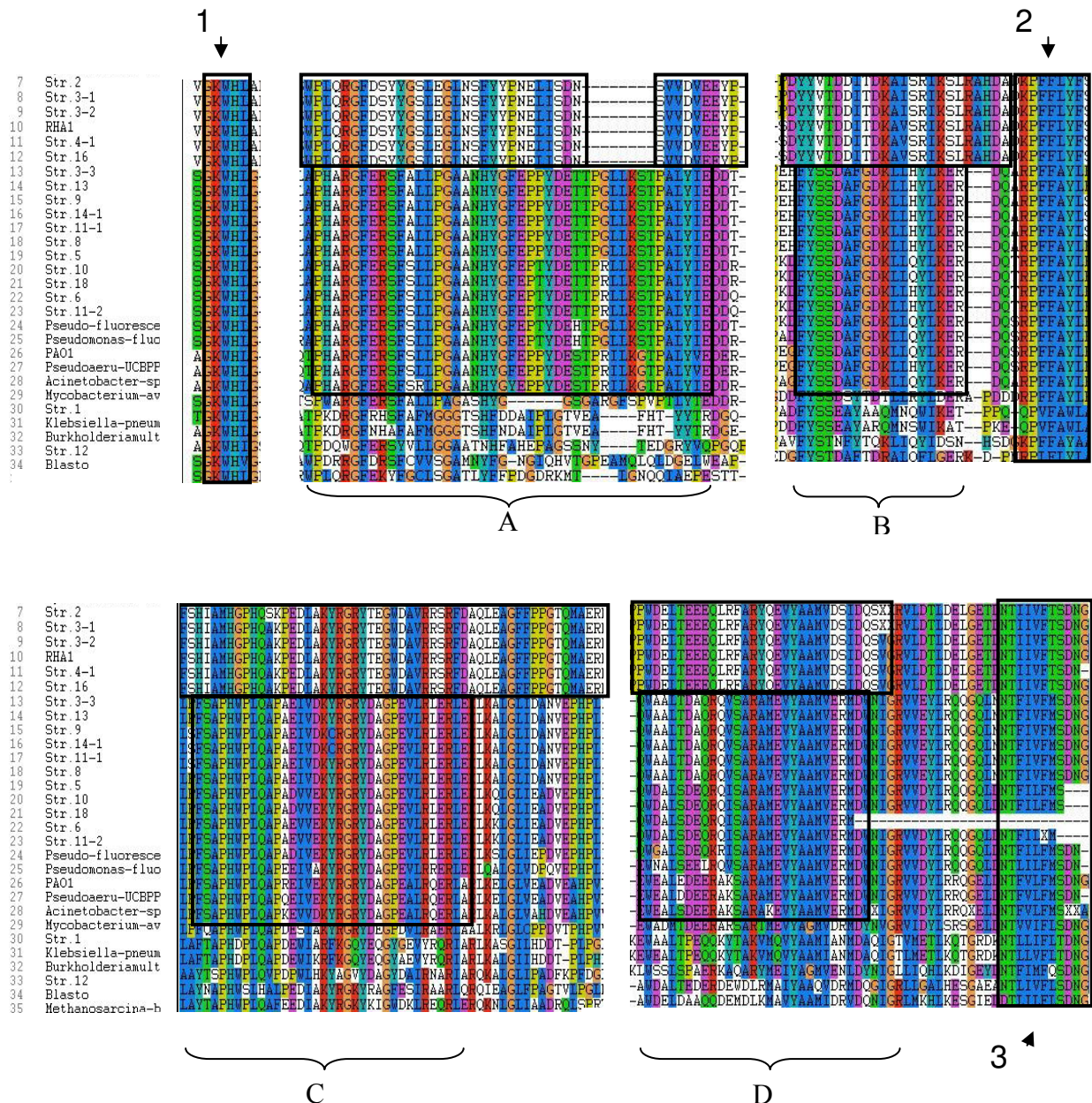
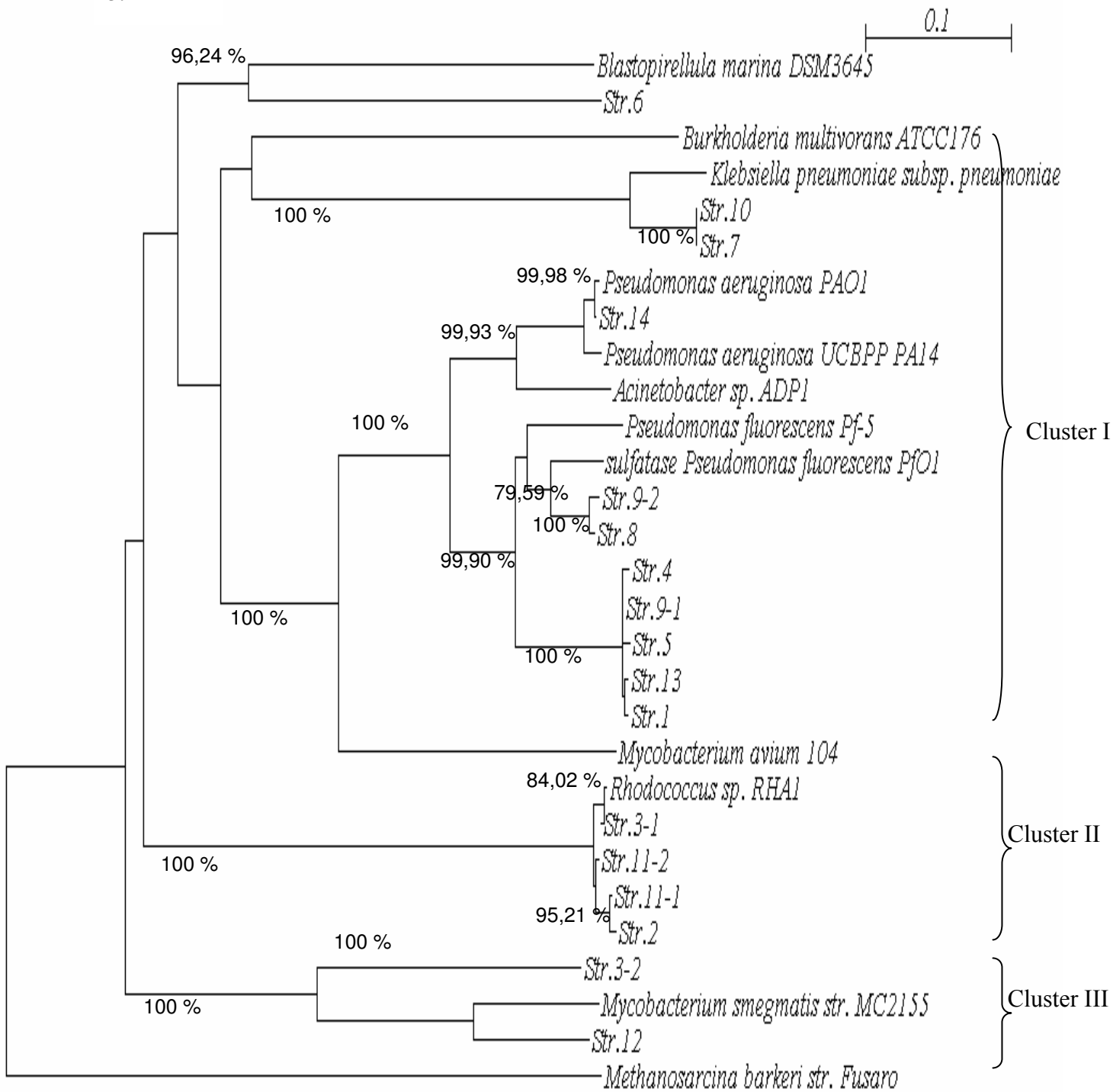


Figure 2 : Alignement des séquences partielles d'*atsA* obtenues à partir de l'amplification par PCR à l'aide des amorces *atsAF* et *atsAR*. L'alignement des séquences a été réalisé par *ClustalX* et les zones conservées sont annotées : 1, 2 et 3 lorsqu'elles correspondent à une région conservée pour l'ensemble des séquences analysées et sont annotées : A, B, C et D lorsqu'elles correspondent à une région conservée pour certaines séquences analysées

3.2.3. Phylogénie et congruence des séquences *atsA*

Les séquences obtenues avec les amorces *atsAF* et *atsAR* codant l'unité catalytique de l'ARS (de 260 acides aminés) et le gène de l'ARNr 16S (de 950 nucléotides) ont été alignées et deux phylogrammes ont été établis (respectivement Figure 3A et 3B). Les séquences (Figure 3A) présentent d'importantes similarités avec les gènes caractérisés notamment chez *Kp*, *Rhodococcus sp.* RHA1, *Pa_{PAO1}*, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 et *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Par ailleurs, trois clusters peuvent être distingués (Figure 3A ; I, II, III). Le premier cluster est formé par les séquences de références de *Kp* et *Pa_{PAO1}*, le second par la séquence de *Rhodococcus sp.* RHA1 et le troisième par la séquence de *Mycobacterium smegmatis*. La comparaison des deux arbres phylogénétiques (Figure 3A vs Figure 3B) ne semble pas mettre en évidence de congruence entre le gène codant l'arylsulfatase et le gène codant l'ARNr 16S. En effet, les séquences *atsA* provenant des souches bactériennes affiliées aux Actinobactéries (Str. 1, Str. 4, Str. 13, Str. 14) sont plus proches des séquences *atsA* répertoriées chez des protéobactéries que celle de *Rhodococcus sp.* RHA1. De la même façon, la séquence putative du gène *atsA* affiliée à *Tetrathiobacter kashmirensis* (Str. 3) présente plus d'homologie avec les séquences *atsA* répertoriées chez les Actinobactéries qu'avec les séquences *atsA* des protéobactéries. Ainsi, les gènes *atsA*, putatifs, isolés chez ces microorganismes ne semblent pas présenter de congruence avec les gènes ribosomiques.

3.A



3.B

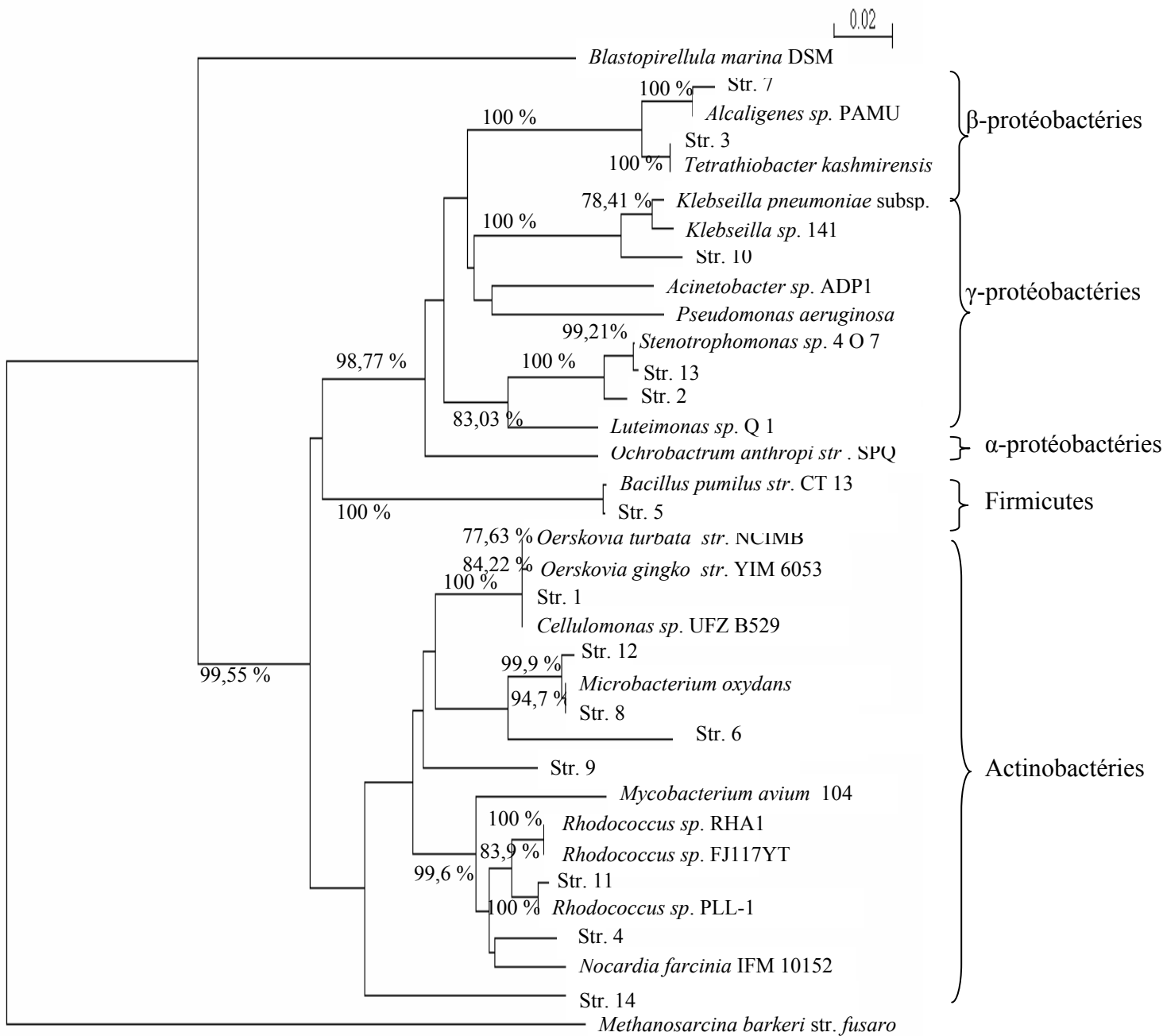


Figure 3 : Analyse en Neighbour joining des séquences du gène *atsA* (A) et de l'ADNr 16S (B) au sein des souches bactériennes extraites de sols rhizosphériques. Les valeurs en 'Bootstrap' correspondent à 10000 permutations et sont présentées en pourcentage à chaque noeuds lorsque celles-ci possèdent une valeur supérieure à 75 %. Il est à noter que les séquences arylsulfatases des souches notées : Str.X-X correspondent à l'obtention de plusieurs séquences putatives du gène *atsA*

4. Discussion

4.1. Méthodologie et amplification PCR

L'utilisation du couple d'amorces *atsAPsF* et *atsAR* ne permet pas l'obtention d'un produit PCR de la taille attendue pour toute la collection de souches. Par ailleurs, seules des séquences présentant un fort degré d'affiliation aux arylsulfatases de *Pa_{PAO1}* et *Rhodococcus sp. RHA1* ont été obtenues. Toutefois, ce tout premier jeu d'amorces nous a permis d'obtenir une certaine diversité de séquences affiliées aux arylsulfatases. Cette diversité de séquences a, par la suite, été utilisée pour dessiner une nouvelle amorce dégénérée, *atsAF*, permettant l'amplification d'*atsA* chez d'autres microorganismes.

L'utilisation de l'amorce *atsAF* a permis une amplification pour la majorité des souches testées. Toutefois, à une température d'hybridation de 58 °C, le couple d'amorces *atsAF* et *atsAR* ne permet pas l'obtention de fragments affiliés à l'arylsulfatase pour de nombreuses souches bactériennes. Par ailleurs, une baisse de la température d'hybridation induit l'amplification de nombreux fragments PCR parasites. Toutefois, afin d'éviter une perte de la diversité des fragments ciblés, nous avons mis en place un protocole d'amplification PCR en TouchDown afin d'obtenir le plus de diversité génique possible. Les séquences des produits PCR de la taille attendue ont présenté de forts degrés d'identités avec les gènes codant potentiellement pour les arylsulfatases (Tableau 2). Par ailleurs, l'alignement de ces séquences nous a permis de dessiner une nouvelle amorce plus interne qui a été nommée *atsA175F*.

L'utilisation de l'amorce « forward » *atsA175F*, qui possède un site d'appariement plus proche de l'amorce *atsAR*, permet une amplification PCR d'un fragment de 633 pb. La dégénérescence de cette nouvelle amorce « forward » a été réalisée après l'alignement des différentes séquences de 800 pb codant potentiellement le gène *atsA* (avec les amorces précédentes) chez les isolats étudiés. Cette nouvelle amorce (*atsA175F*) cible une région conservée au sein des séquences que nous avons isolées. En outre, cette région sur laquelle s'hybride l'amorce semble être spécifique des arylsulfatases étudiées dans la littérature et notamment des arylsulfatases humaines (Sardiello *et al.*, 2005). L'utilisation de l'amorce *atsA175F*, semble présenter un bon compromis entre le taux de réussite de l'amplification et la diversité génique du gène étudié. En effet, ce jeu d'amorces semble le plus robuste et le plus spécifique pour cibler le gène de l'arylsulfatase au sein de microorganismes variés. Toutefois, une certaine perte de diversité de séquences *atsA* peut être observée avec ce jeu d'amorces, comparée à l'amorce *atsAF*. Cette perte de diversité se traduit principalement par une restriction de l'affiliation et une limitation du nombre de séquences *atsA* que nous avons

obtenu avec le jeu *atsA175F* et *atsAR*. A ce sujet, jusqu'à 9 isoformes de l'arylsulfatase ont été observées chez *Proteus rettgeri* (Fitzgerald et Milazzo, 1970 ; 1975). Ainsi, les outils moléculaires, que nous avons développé, pourraient ne pas cibler les mêmes gènes codant l'arylsulfatase au sein de notre collection de souche. Cependant, en contre partie de cette perte apparente de diversité, nous avons pu avec ce jeu d'amorces, amplifier un fragment affilié à l'arylsulfatase pour toutes les souches bactériennes qui possédaient cette activité (Tableau 4). Cependant, toutes les séquences que nous avons obtenues, par cette approche, restent putatives. En outre, la majorité des séquences présentes dans la Genbank sont également putatives. En effet, peu de souches ont été caractérisées pour l'activité arylsulfatase. Aussi, du fait de la méconnaissance que nous avons du réel polymorphisme des gènes codant l'arylsulfatase, nous avons préféré utiliser le couple *atsAF* et *atsAR* pour lequel le nombre de séquences différentes est le plus élevée de façon à faire une étude de diversité plus complète.

4.2. Diversité du gène *atsA*

Les alignements réalisés sur les séquences putatives que nous avons isolées mettent en évidence la présence de certaines régions conservées entre les arylsulfatases que nous avons isolées et celles de la littérature.. Certains motifs relativement bien conservés et qui semblent caractéristiques des arylsulfatases, déjà répertoriées, ont pu donc être identifiés, comme les motifs communs 1, 2 et 3 (Figure 2) (Yamada *et al.*, 1989 ; Beil *et al.*, 1995 ; Mougous *et al.*, 2002 ; Sardiello *et al.*, 2005). Toutefois, le rôle de ces régions ne semble pas avoir été clairement caractérisé. En effet, les approches de cristallographie ne mettent pas en évidence la présence d'un rôle critique de ces régions pour le fonctionnement de l'enzyme.

Enfin, globalement, la diversité apparente du gène *atsA* est très importante. En effet, certaines régions du gène de l'arylsulfatase diffèrent fortement entre l'arylsulfatase de *Pa*_{PAOI} et celle de *Kp*. En outre, ce contraste ne s'arrête pas là. En effet, l'arylsulfatase putative de *Rhodococcus sp.* RHA1 présente elle aussi des régions conservées très spécifiques et donc différentes de celles des deux bactéries précédentes. Toutefois, aucune activité arylsulfatase n'ayant été à ce jour caractérisée chez cette souche, cette séquence reste, aujourd'hui encore, putative et est donc potentiellement non fonctionnelle.

Les analyses phylétiques que nous avons réalisées sur le gène de l'arylsulfatase et celui de l'ARNr 16S ne semblent pas présenter de similitudes (Figure 3) suggérant une non congruence entre ce gène fonctionnel et les gènes ribosomiques. Ceci peut s'expliquer de différentes manières : (i) les séquences, isolées au cours de cette étude, correspondent à des séquences putatives. Ainsi, toutes ces séquences affiliées à *atsA* ne sont pas forcément

codantes et à l'heure actuelle, seuls les gènes *atsA* de *Pa*_{PAO1} et de *Kp* ont été clairement caractérisés. Ainsi, la diversité de ce gène n'est pas encore connue et la plupart des séquences de l'arylsulfatase, qui sont affiliées à de nombreuses classes taxonomiques, restent hypothétiques, (ii) par le protocole PCR, nous n'avons amplifié qu'une faible portion du gène codant l'arylsulfatase. En effet, seulement 800 pb ont été amplifiées et ont été séquencées pour le gène *atsA* qui possède une taille d'environ 2600 pb. Ainsi, cette portion du gène amplifiée pourrait également ne pas être représentative de l'ensemble de la séquence codante du gène *atsA*, (iii) la non congruence entre les séquences d'un gène fonctionnel et le gène ribosomique 16S a déjà été observée. En effet, Hallin et Lindgren (1999) rapportent la même observation pour les gènes *nir* codant l'étape clef du processus de dénitrification. Ainsi, le gène *atsA*, comme le gène *nir*, pourrait avoir subi une évolution différente de celle des gènes ribosomiques. En effet, l'absence d'apparente congruence entre le gène *atsA* et les gènes ribosomiques, les différentes séquences des gènes référencés de *Pseudomonas aeruginosa* (Beil *et al.*, 1995) et de *Klesiella pneumoniae* (Murooka *et al.*, 1990) et l'identité plus forte entre les arylsulfatases humaines et celle de *Pa*_{PAO1} (Boltes *et al.*, 2001) tendent à indiquer une évolution différente entre les séquences taxonomiques et fonctionnelles. De plus, l'existence de différents gènes impliqués dans la maturation post-traductionnelle des sulfatases (et des arylsulfatases) présentant des régulations différentes (Murooka *et al.*, 1990 ; Dierks *et al.*, 1998 ; Fang *et al.*, 2004 ; Berteau *et al.*, 2006 ; Benjdia *et al.*, 2007_a ; Benjdia *et al.*, 2007_b) tendent à renforcer notre hypothèse.

5. Conclusion

Les outils moléculaires, mis au point dans cette étude, permettent d'amplifier spécifiquement des séquences du gène *atsA* chez des bactéries du sol, jusque là, non caractérisées pour cette fonction. Ainsi, ces outils nous ont permis de mettre en évidence une diversité de séquences codant potentiellement l'arylsulfatase. L'absence de non congruence entre les gènes ribosomiques et les séquences relatives au gène *atsA*, suggère l'existence de processus évolutifs contrastés entre ce gène fonctionnel et les gènes de ménage ou la probable existence de différents isoformes des gènes codant la même fonction.

Ces outils nous permettront par la suite (i) d'appréhender l'expression de l'activité arylsulfatase au sein de microorganismes variés qui présentent des régulations contrastées pour cette activité enzymatique, (ii) d'accéder à la diversité potentielle du gène de l'arylsulfatase dans des environnements variés, (iii) de caractériser le rôle de cette communauté microbienne fonctionnelle dans son environnement.

6. Références bibliographiques

- Bandick A.K., Dick R.P. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*. 31: 1471-1479.
- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W., Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulphatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulphatase gene (*atsA*). *FEBS European Journal of Biochemistry*. 229: 385-394.
- Benjdia A., Dehò., Rabot S., Berteau O. 2007_a. First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli* *aslB* and *ydeM* deletion mutants. *FEBS Letters*. 581: 1009-1014.
- Benjdia A., Leprince J., Guillot A., Vaudry H., Rabot S., Berteau O. 2007_b. Anaerobic sulfatase-maturing enzymes: Radical SAM Enzymes able to catalyze in vitro sulfatase post-translational modification. *Journal of the American Chemical Society*. 129: 3462-3463.
- Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. 2006. A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 22464-22470.
- Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli. India. pp. 14.
- Boltes I., Czapinska H., Kahnert A., von Bülow R., Dierks T., Schmidt B., von Figura K., Kertesz M.A., Usón I. 2001. 1.3 Å Structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure*. 9: 483-491.
- De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 302-306.

- Dierks T., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M.A., von Figura K. 1998. Posttranslational formation of formylglycine in Prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 25560-25564.
- Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 1011-1016.
- Fang Q., Peng J., Dierks T. 2004. Post-translational formylglycine modification of bacterial sulfatases by the radical *S*-Adenosylmethionine protein AtsB. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 14570-14578.
- Fitzgerald J.W., Milazzo F.H. 1975. Further studies on the heterogeneity of arylsulfatase from *Proteus rettgeri* and some properties of one chromatographic form of the enzyme. *The International Journal of Biochemistry*. 6: 769-774.
- Fitzgerald J.W., Milazzo F.H. 1970. Arylsulfatase multiplicity in *Proteus rettgeri*. *Canadian Journal of Microbiology*. 16: 1109-1115.
- Hallin S., Lindgren P.E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1252-1256.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Knauff U., Schulz M., Scherer H.W. 2003. Arylsulphatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*. 19: 215-223.
- McLaren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biology & Biochemistry*. 17: 73-79.
- Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J.B., Brenner S.E., Bertozzi C.R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry and Biology*. 9: 767-776.
- Murooka Y., Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashita M. 1990. A sulfur- and tyramine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.

- Ndiaye E.L., Sandeno J.M., Mc Grath D., Dick R.P. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*. 15: 26-36.
- Rousseaux S., Hartmann A., Soulas G. 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 211-222.
- Roy A.B. 1960. The synthesis and hydrolysis of sulfate esters. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. 22: 205-35.
- Sardiello M., Annunziata I., Roma G., Ballabio A. 2005. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*. 14: 3203-3217.
- Sommer K., Sudau M., Kasten P. 1986. Stichprobenuntersuchungen zur Schwefelversorgung des Weizens in Nordhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. *Kali-Briefe (Büntehof)*. 18: 1-12.
- Tabatabai M.A. 1984. Importance of sulphur in crop production. *Biogeochemistry* 1: 45-62.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Yamada K., Akasaka K., Shimada H. 1989. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 186: 405-410.

Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Résumé

Dans les sols, les microorganismes participent de manière prépondérante au recyclage du soufre organique, non disponible pour les végétaux, en soufre minéral, qui est la forme majoritairement assimilée. L'objectif de cette étude a consisté en la caractérisation de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par l'enzyme arylsulfatase. L'arylsulfatase est, en effet, considérée comme l'enzyme clef de la minéralisation du soufre dans les sols agricoles et catalyse l'hydrolyse des esters de sulfate, qui constituent la forme de soufre organique majoritaire dans ces sols.

Nos travaux mettent en évidence que la structure génétique de la communauté bactérienne minéralisant les esters de sulfate, dans la rhizosphère de colza, est différente selon le stade de développement de la plante. Ceci apparaît en adéquation avec ce que nous avons vu précédemment pour la communauté bactérienne rhizosphérique totale (Chapitre 2). L'étude de la diversité des séquences affiliées à des gènes codant potentiellement des arylsulfatases met en évidence la présence sous colza d'une grande diversité de familles de clones. Ces séquences sont majoritairement affiliées aux arylsulfatases référencées chez les Protéobactéries, les Planctomycètes et les Actinobactéries. En outre, la diversité spécifique (indice de Shannon Weaver) pour le stade boutons séparés (5,18) semble supérieure à celle observée lors du stade floraison (4,18). Par ailleurs, l'équitabilité semble également plus importante durant le stade boutons séparés. Ainsi, globalement, nos résultats suggèrent une structure différente de cette communauté bactérienne fonctionnelle entre ces 2 stades phénologiques du colza. Cette baisse de diversité au stade floraison pourrait notamment provenir de la limitation de la rhizodéposition à cette période ou bien être la résultante de variations pédo-climatiques (*i.e.* la température ou le potentiel hydrique du sol) à cette époque.

Mots-clefs

amorces *atsA*, arylsulfatase, communauté bactérienne fonctionnelle, esters de sulfate

1. Introduction

Dans les sols aérobies, le soufre est principalement stocké sous une forme organique non assimilable pour les plantes. Dans les sols agricoles, les principales réserves de soufre sont constituées d'esters de sulfate et de sulfonates. Au sein de ce pool de soufre organique, le pool des esters de sulfate est considéré comme le plus important et le plus labile (Tabatabai et Bremner, 1970). Ces esters de sulfate sont majoritairement hydrolysés, dans les sols, par une enzyme : l'arylsulfatase. Ainsi, cette enzyme, exclusivement d'origine microbienne dans les sols, contribue à la libération de sulfate disponible pour les plantes.

Des expérimentations, réalisées *in vitro* sur souches bactériennes et portant sur la régulation des arylsulfatases, mettent en évidence une répression de l'activité arylsulfatase sur des milieux de croissance contenant du soufre minéral et une induction de cette activité sur des milieux de culture ne contenant qu'une source de soufre organique (Adachi *et al.*, 1975 ; Dodgson *et al.*, 1982 ; Kertesz *et al.*, 1993). Ainsi, ces études suggèrent un rôle important de l'arylsulfatase dans le processus de minéralisation du soufre notamment en cas de limitation (Kertesz, 1999).

Les approches moléculaires permettant l'amplification d'un gène en particulier à partir d'un pool d'acides nucléiques extraits du sol, ont notamment permis d'acquérir une meilleure caractérisation des communautés microbiennes plus particulièrement impliquées *i*° dans les cycles biogéochimiques, comme celui de l'azote (Piceno et Lovell, 2000_{a,b} ; Poly *et al.*, 2000 ; Philippot *et al.*, 2002 ; Henry *et al.*, 2006 ; Le Roux *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008) ou du carbone (El Azhari *et al.*, 2007, 2008 ; Paterson *et al.*, 2008) *ii*° et également dans la dégradation de produits phytosanitaires (Devers *et al.*, 2008 ; Udiković Kolić *et al.*, 2008).

Plus récemment, des recherches portant sur la caractérisation des communautés bactériennes impliquées dans la minéralisation du soufre organique dans les sols ont été initiés. Dans ce sens, les travaux réalisés par Schmalenberger et Kertesz (2007) et Schmalenberger *et al.*, (2008, 2009) ont permis d'appréhender, pour la première fois, la diversité des communautés bactériennes du sol qui sont impliquées dans la minéralisation des sulfonates. Parallèlement à ces travaux, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la communauté bactérienne du sol minéralisant le pool d'esters de sulfate des sols ; forme majoritaire dans les sols agricoles.

Dans le cadre de nos recherches, nous avons dans un premier temps tenté de cerner l'implication de différents genres taxonomiques dans la minéralisation des esters de sulfate, par une approche portant sur la communauté fonctionnelle cultivable (Cregut *et al.*, 2009). Cependant, dans la mesure où la fraction cultivable ne représente qu'une partie des bactéries

du sol, nous avons voulu tester, sur la matrice sol, les outils moléculaires ciblés sur une portion du gène *atsA* développés dans le chapitre précédent, ceci afin de caractériser par une approche clonale la structure et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle possédant l'activité arylsulfatase. Nous considérerons les sols rhizosphériques de colza et d'orge, pour lesquels la structure des communautés bactériennes totales et fonctionnelles cultivables a été précédemment montrée comme différente. De plus, cette étude sera envisagée à deux stades phénologiques : formation des boutons floraux et floraison pour le colza; montaison et épiaison pour l'orge.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Echantillonnage de sol

Le sol calcaire, de type rendzine brunifié (Typic rendolls), utilisé dans cette étude a été prélevé sur deux parcelles adjacentes de 12500 m², cultivées soit avec du colza d'hiver (*Brassica napus* var. Twister), soit avec de l'orge d'hiver (*Hordeum vulgare* var. Nikel) sur la commune de Martincourt (54). Il s'agit d'un sol représentatif des sols lorrains. Ce sol contient 357, 301, 309, 28,8, 3,1 et 0,59 g kg⁻¹ de sol respectivement d'argile, de limon, de sable, de carbone organique, d'azote organique et de soufre organique. Le pH est alcalin (pH mesuré à l'eau : 8,2). La rotation dans le cas du colza était : colza-blé-orge de printemps et pour l'orge : colza-orge de printemps-orge d'hiver.

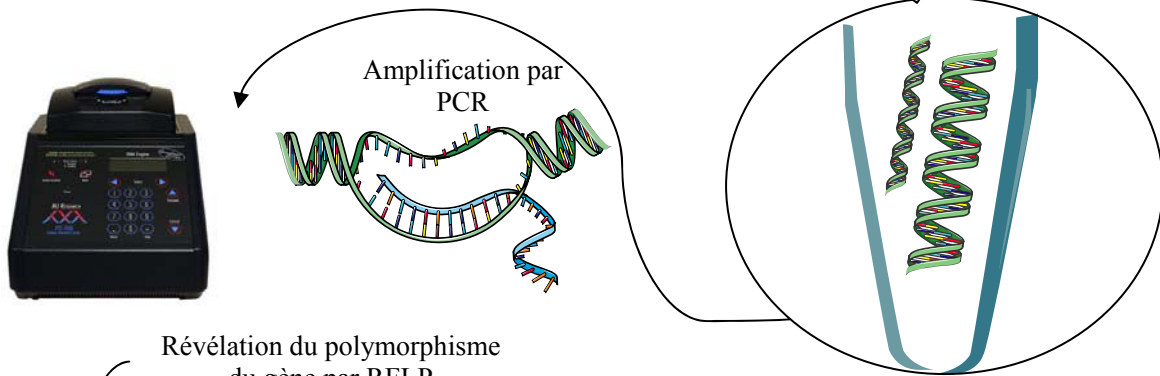
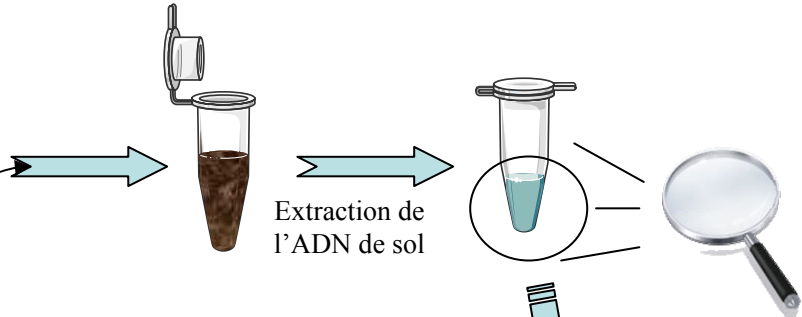
Chaque parcelle (de colza et d'orge) a été divisée en cinq sous parcelles de 2500 m² (100 x 25 m). Les prélèvements ont été réalisés de manière aléatoire en cinq points au sein de ces sous parcelles. Deux dates de prélèvement, correspondant à deux stades de développement des plantes, ont été considérées : formation des boutons floraux (le 19 Avril) et floraison (le 10 Mai) pour le colza ; courant montaison (le 19 Avril) et épiaison (le 10 Mai) pour l'orge.

2.2. Extraction de l'ADN de sol rhizosphérique

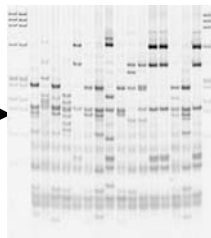
Au laboratoire, le système racinaire de chaque plante a été délicatement agité et le sol rhizosphérique a été défini comme la fraction de sol adhérent aux racines. Le sol est tamisé à 5 mm et des échantillons sont ensuite aliquotés (1 g) et stockés à -20 °C. L'ADN a été extrait de ces échantillons de sol, selon la méthode de Martin-Laurent *et al.*, (2001), par lyse

Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Prélèvement de sol
rhizosphérique

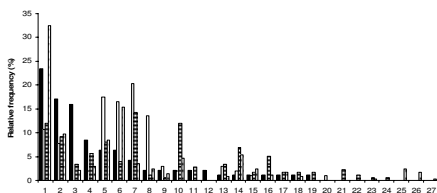


Révélation du polymorphisme
du gène par RFLP



Séquençage systématique des
types RFLPs

Distribution des types RFLP



mécanique dans un tampon d'extraction en présence de billes de verre (106 µm et 1 mm) dans un broyeur (pendant 30 sec à 1.600 rpm) et par différentes centrifugations successives. Les protéines, par la suite, ont été précipitées par un ajout d'acétate de sodium à 3 M, puis ont été éliminées par une étape de centrifugation. Après précipitation à l'isopropanol à -20 °C et lavage à l'éthanol 70%, l'ADN subit plusieurs purifications successives, sur colonne de Sépharose puis sur colonne de PVPP et enfin par le kit de purification de l'ADN GeneClean selon les instructions du fournisseur. Ensuite l'ADN est conservé à -20 °C. Lors de son utilisation, l'ADN de chaque échantillon est déposé sur gel d'agarose à 1 % afin d'évaluer sa qualité. Il est ensuite dosé à 260 nm à l'aide d'un BioPhotometer (Eppendorf, Hambourg, Germany). Chaque échantillon d'ADN est dilué dans de l'eau ultra pure à une concentration finale de 10 ng µl⁻¹.

2.3. Amplification d'un fragment du gène *atsA* codant l'unité catalytique de l'arylsulfatase

Une première série d'amorces a été dessinée à partir de l'alignement de séquences codant l'unité catalytique, *AtsA*, du gène de l'arylsulfatase. Ces amorces *atsAF* et *atsAR* ont été dessinées afin de cibler une portion de 800 pb du gène, *atsA*, codant pour l'activité arylsulfatase (Tableau 1). L'amplification de l'ADN a été réalisée avec un thermocycleur (i-cycler, Biorad) en utilisant les conditions suivantes : 4 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 60 °C, et 2 min à 72 °C, plus un cycle supplémentaire de 15 min à 72 °C. Les produits d'amplification par PCR du gène *atsA* ont été contrôlés par une révélation au BET après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 %. Le fragment de la taille attendue n'a pas été observé à l'aide de ce premier jeu d'amorces. Etant donné que les amorces *atsAF* et *atsAR* ciblant une portion de 800 pb du gène, *atsA*, n'ont pu permettre d'amplifier directement un fragment à la taille attendu sur sol, une PCR gigogne constituée de deux amplifications successives a été mise au point afin d'abaisser le seuil de détection de la PCR *atsA*. La première amplification a été conduite avec les amorces *atsAF* et *atsAR* selon les conditions décrites précédemment. La seconde réaction d'amplification a été réalisée avec les amorces *atsA175F* (amorce « forward », plus interne de 175 pb, Tableau 1) et *atsAR*, avec 1,5 µl de matrice provenant de la première PCR, en utilisant les conditions suivantes : 4 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 60 °C, et 2 min à 72 °C, plus un supplément de 15 min cycle à 72 °C.

Les fragments PCR du gène *atsA* ont été purifiés par une migration sur gel d'agarose (2,2 %) à 70V pendant 4 h. Puis, les produits PCR ont été excisés et purifiés par le kit Qiaquick Gel

Extraction de Qiagen (Fr), suivant les instructions du fournisseur. Les produits PCR purifiés ont été clonés dans un vecteur plasmidique pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Fr) et ont été transformés au sein d'Escherichia coli JM109, chimio-compétentes. La vérification de la présence d'un insert dans le plasmide pGEM[®]-T Easy a été réalisée par un criblage blanc/bleue en suivant les recommandations du fournisseur. Puis, l'amplification de la séquence de l'insert a été réalisée avec les amorces T7 et SP6 (Tableau 1) dans un thermocycleur (i-cycler, Biorad) en utilisant les conditions suivantes : 4 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 54 °C, et 2 min à 72 °C, plus un cycle supplémentaire de 15 min à 72 °C. Après, contrôle de l'amplification PCR, de la même manière que précédemment, les produits de PCR purifiés ont été digérés par l'enzyme AluI pendant 12 h à 37 °C.

Tableau 1 : Identification et séquences des amorces moléculaires utilisée au cours de cette étude

<i>Dénomination de l'amorce PCR</i>	<i>Séquence nucléotidique dans le sens 5'-3'</i>
<i>atsAF</i>	CG (GC) (GT) C (AG) (AT) (CT) GCTGCT(GC) ACCGG
<i>atsA175F</i>	(GCT) CGGG (GC) AA (AG) TGGCACCT(GC)
<i>atsAR</i>	(CT) (CT) GGCGCCGTT (AG) TCGG
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>SP6</i>	ATTTAGGTGACACTATAGAA

Enfin, les échantillons digérés ont été soumis à une migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide natif à 6 % pendant 11 h à 4 mA puis ont été révélés au SYBRGreen I, sous UV. Les échantillons présentant le même profil de digestion ont été regroupés en type RFLP et plusieurs représentants de chaque type RFLP ont été séquencés par GATC Biotech (Fr).

2.4. Analyse statistique

Une analyse de raréfaction a été réalisée sur les données de structures issues des banques de clones réalisées pour chaque couvert, à l'aide du logiciel, en freeware, aRarefactWin (<http://www.uga.edu/~strata/AnRareReadme.html>).

2.5. Analyse phylogénétique

Un arbre phylogénétique a été dessiné, à partir des résultats de l'alignement des séquences de gènes codant l'arylsulfatase, par l'utilisation de la méthode du neighbour joining. La topologie de l'analyse en bootstrap de l'arbre phylogénétique a été réalisée par la création de 10000 permutations avec le logiciel ClustalX, (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) (Thompson *et al.*, 1997).

2.6. Numéros d'entrée dans la GenBank des séquences nucléotidiques

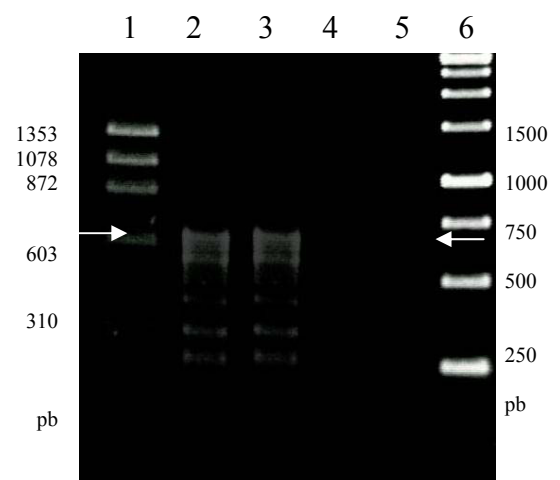
Les séquences partielles du gène de l'unité catalytique de l'arylsulfatase, *atsA*, seront soumises à la GenBank lors de la soumission de ces travaux à une revue.

3. Résultats et discussion

3.1. Amplification par PCR d'*atsA* sous couvert de colza et d'orge

La PCR gigogne a permis l'obtention d'un produit PCR à la taille attendue (633 pb) dans les échantillons d'ADN extraits sous couvert de colza pour les deux stades de développement considérés (Photographie 1). Par contre, il ne nous a pas été possible d'obtenir d'amplifiats à la taille attendue pour les sols rhizosphériques d'orge suggérant certainement un nombre de copie de la cible inférieur au seuil de détection.

*Photographie 1 : Gel électrophorétique de l'amplification d'*atsA* par PCR gigogne. L'ADN total utilisé comme matrice provient des sols rhizosphériques sous couvert de colza aux stades de formations des boutons floraux (piste 2) et de floraison (piste 3) et des sols rhizosphériques sous couvert d'orge aux stades de montaison (piste 4) et de formation des épis (piste 5). Les pistes 1 et 6 correspondent respectivement aux marqueurs de poids moléculaires Φ -X-174/Hae III, (Q-BIOgene, fr) et 1kb Ladder (Invitrogen, Fr)*

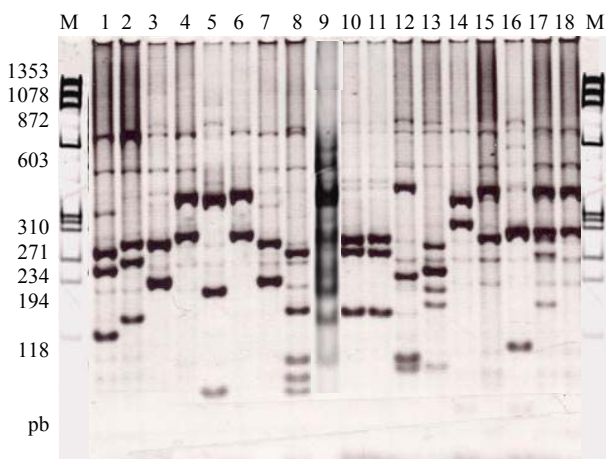


3.2. Structure et diversité de la communauté fonctionnelle

Les produits d'amplification sur sol obtenus ont été purifiés. A l'issue de cette purification, nous avons, dans un premier temps, digéré directement l'amplifiat afin d'obtenir une empreinte génétique (Piste 9, Photographie 2). Dans ce cas, l'empreinte génétique de la

communauté bactérienne fonctionnelle a été réalisée en triplicat, à partir de trois PCR indépendantes, et s'est avérée reproductible, en nombre de bandes et en intensité relative pour chacune d'entre elles. Par ailleurs, plus d'une cinquantaine de bandes de restriction ont pu être observé sur chacune de ces empreintes génétiques. Ainsi, d'après ces empreintes génétiques, la communauté bactérienne fonctionnelle, présente dans la rhizosphère de colza pour les deux stades considérés, semble relativement diversifiée. Toutefois, du fait de la méconnaissance de cette communauté bactérienne fonctionnelle, nous avons préféré appréhender sa structure par une approche clonale qui permet notamment d'accéder à la diversité de séquences des produits PCR.

Ainsi, dans un second temps nous avons cloné ce fragment, puis échantillonné et digéré par *AluI* environ 200 clones, de façon à établir une banque pour étudier la structure et la diversité de la communauté fonctionnelle. Les profils de digestion identiques ont été regroupés en types RFLP (Photographie 2). Sur les 200 clones, 59 profils de digestion ont été discriminés (Figure 1).



Photographie 2 : Profils de digestion du fragment du gène atsA obtenu avec les amorces atsA175F et atsAR et digéré par l'enzyme de restriction AluI. Les pistes M, correspondent aux marqueurs de poids moléculaires (Φ -X-174/Hae III, (Q-BIOgene, fr)) et les pistes de 1 à 8 et de 10 à 18 correspondent à des profils de digestion obtenus pour 1 clone transformé. Enfin, la piste 9 correspond au profil génétique obtenu après digestion par AluI du fragment du gène atsA obtenu avec les amorces atsA175F et atsAR sur l'ADN extrait du sol

Nous avons utilisé différentes techniques afin de représenter la structure et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle à partir des données issues du criblage des deux banques de clones provenant de la rhizosphère du colza aux deux stades phénologiques étudiés, *i.e.* la formation des boutons floraux et la floraison. Nous avons tout d'abord tracé les diagrammes rang / fréquence relative de façon à représenter la répartition des clones entre les différents types RFLP (Figure 1). La comparaison de la structure aux deux stades de développement du colza montre des différences notables suggérant que certains types RFLP sont spécifiques d'un stade de développement de la plante. En effet, les types RFLP annotés de 8 à 15 et de 24 à 46 semblent spécifiques du stade de formation des boutons floraux et ceux

codés de 47 à 59 semblent spécifiques du stade floraison du colza. Enfin, les types RFLP notés de 1 à 7 et de 15 à 23 sont communs aux 2 stades de développement du colza même si ils ne sont pas présents aux mêmes fréquences. En effet, les types RFLP codés 1 à 5 sont dominants au stade formation des boutons floraux, alors qu'au stade floraison les plus abondants sont, par ordre décroissant, les types RFLP 4, 16, 47, 17, 18, 19, 2, 3, 6, 7, 20, 48. Ainsi, la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle sous couvert de colza, évolue selon le stade de développement de la plante. Ceci apparaît en adéquation avec ce que nous avons observé précédemment pour la communauté bactérienne rhizosphérique totale (Chapitre 2) : au stade floraison du colza, la communauté bactérienne fonctionnelle présente une structure différente de celle observée lors de la formation des boutons floraux.

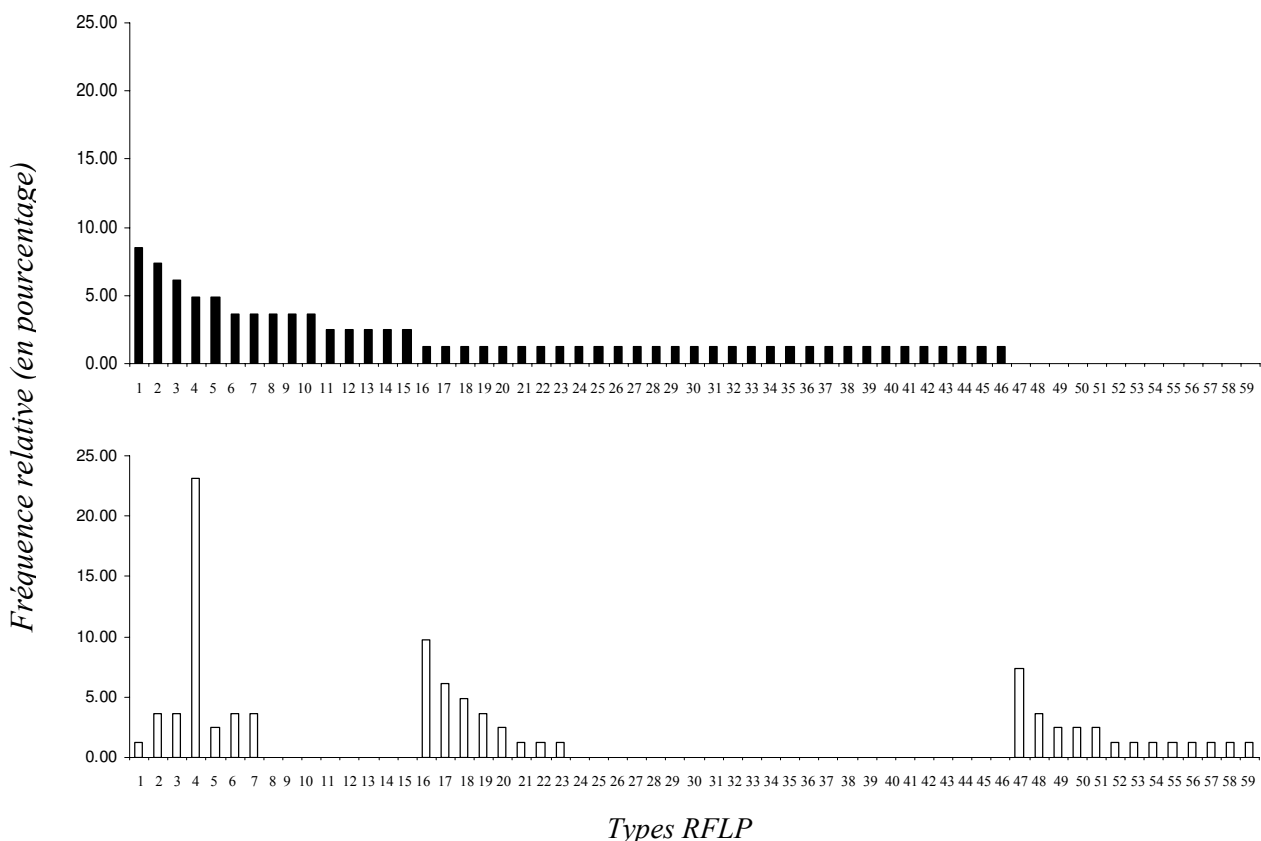


Figure 1 : Distribution des types RFLP isolés de la rhizosphère de colza pour les stades de développement boutons floraux (■) et floraison (□)

Afin de savoir si la taille de notre échantillon (200 clones analysés) est suffisante pour conclure en terme de diversité, nous avons tracé les courbes de raréfaction pour chacun des deux stades de développement (Figure 2).

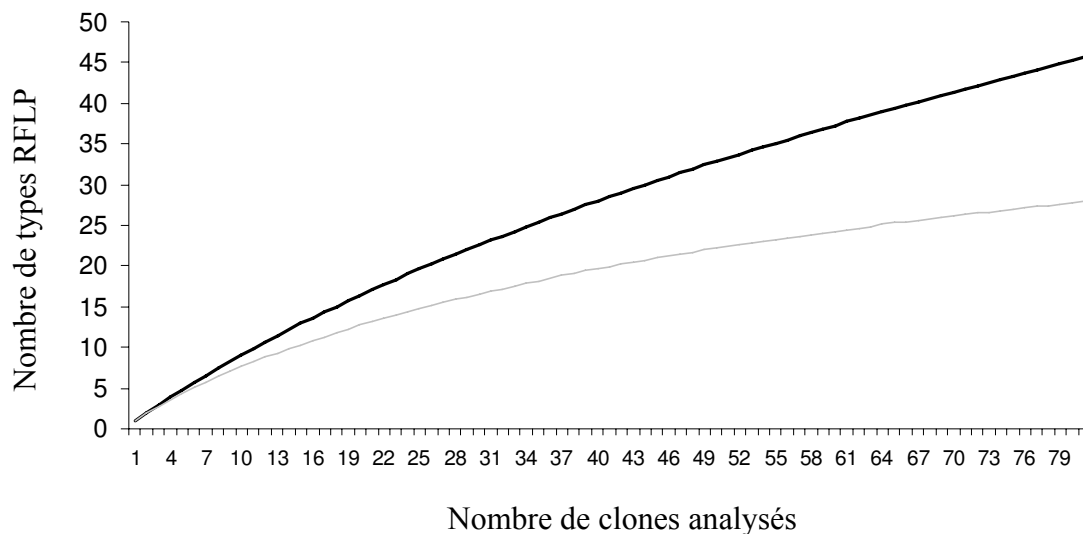


Figure 2 : Courbes de raréfaction correspondant aux stades phénologiques boutons floraux (noir) et floraison (en gris)

Les courbes de raréfaction permettent d'estimer le nombre types RFLP (richesse spécifique) pour un nombre donné d'individus. En outre, l'allure des courbes de raréfaction permet d'avoir une idée de l'effort d'échantillonnage. Dans notre cas, le plateau semble pouvoir être atteint plus rapidement dans le cas du stade floraison que dans le cas du stade boutons floraux pour lequel la pente de la droite est encore importante. Ce résultat suggère que dans le cas du stade floraison, un nombre acceptable de clones a été analysé et qu'un échantillonnage plus important de clones n'apportera probablement qu'un nombre restreint d'espèces additionnelles (espèces rares). Ces données sont en accord avec celles obtenues dans d'autres travaux concernant la structure des communautés bactériennes fonctionnelles. En effet, concernant l'étude de la structure de la communauté fonctionnelle *narG*, (première étape de la dénitrification et de la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium), une richesse spécifique de 25 à 38 types RFLP a été observée pour un effort d'échantillonnage de 100 à 120 clones par répétition (Chèneby *et al.*, 2003). De plus, d'autres études mettent en évidence des richesses spécifiques équivalentes pour des communautés bactériennes méthanotrophes (Zhang *et al.*, 2007) ou résistantes aux métaux lourds (Liebner *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans le cadre de nos travaux, la comparaison des deux courbes de raréfaction met en évidence une différence de diversité entre les deux stades considérés avec une richesse spécifique plus importante au stade boutons floraux (46 types RFLP) qu'au stade floraison (28 types RFLP) pour un échantillonnage de 82 clones analysés.

Afin d'affiner notre étude de structure et de comparer les deux stades de développement, nous avons calculé des indices de diversité rendant compte à la fois du nombre de types RFLP présents et de l'abondance relative de ces types RFLP (Tableau 2).

Tableau 2 : Indice de diversité afférents aux banques de clones atsA, des communautés bactériennes fonctionnelles rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate, aux deux stades de développement du colza

	Boutons floraux	Floraison
Nombre de clones	82	82
Richesse spécifique	46	28
Diversité spécifique (H')	5,18	4,18
Equitabilité	0,94	0,87

Etant donné que nous n'avons pas de répétition pour chaque stade de développement, nous ne pouvons pas réaliser d'analyses statistiques. Néanmoins, comme les courbes de raréfaction semble l'indiquer, la diversité spécifique (indice de Shannon) semble supérieure pour le stade boutons floraux (5,18) que pour le stade floraison (4,18) avec une équitabilité qui a tendance à être supérieure dans le cas du premier stade de développement.

L'ensemble des résultats suggère donc que la structure de la communauté est différente entre les deux stades de développement avec notamment une richesse spécifique et une diversité spécifique de la communauté fonctionnelle supérieures dans l'environnement rhizosphérique du colza au stade boutons floraux correspondant à la mise en place des organes reproducteurs. Or, la nature et la quantité des composés exsudés varient au cours du temps et la rhizodéposition diminue, en particulier, lors des stades reproducteurs des végétaux (Kuzyakov et Domanski, 2000). En effet, lors de la floraison de la plante, les organes reproducteurs constituent des organes puits (Kuzyakov et Domanski, 2000) limitant de ce fait la rhizodéposition dans le sol ce qui pourrait expliquer la diminution de diversité de la communauté fonctionnelle présente dans le sol rhizosphérique à ce deuxième stade. D'autres hypothèses peuvent être également émises comme la libération, à des stades plus tardifs comme celui de la floraison, de composés biocides, susceptibles d'altérer la diversité de la communauté fonctionnelle. En effet, le renouvellement racinaire est à l'origine d'une desquamation des cellules racinaires qui sont alors susceptibles de libérer, lors de leur dégradation, des composés biocides, *i.e.* des dérivés des glucosinolates, chez certaines crucifères. Enfin, cette expérimentation a été réalisée en conditions de plein champ. Ainsi, la diminution de la diversité de cette communauté fonctionnelle pourrait être due aux conditions

pédo-climatiques (notamment la température et le potentiel hydrique du sol) qui sont différentes à cette date plus tardive.

3.3. Etude de diversité des séquences arylsulfatases obtenues

Des représentants de chaque famille de clones ont été séquencés et les séquences obtenues ont été analysées sous Blastn et Blastx puis alignées afin de construire les relations phylogénétiques entre ces séquences et des séquences de référence. La quasi-totalité des produits PCR séquencés (environ une centaine) présentent une forte homologie de séquences d'acides aminés avec le gène de l'arylsulfatase (entre 53 % et 99 %) suggérant une bonne spécificité d'amplification. De plus, il ressort, suite au séquençage, que des familles de clones différentes présentaient des affiliations phylogénétiques proches. Dans ce sens, plusieurs profils de digestion peuvent présenter une même affiliation phylogénétique comme les profils de digestion : 11, 20 et 51 qui sont affiliés à l'arylsulfatase putative de *Rhodopirellula* ou les profils de digestion : 1, 5, 6, 7 qui sont affiliés à l'arylsulfatase de *Pseudomonas fluorescens*. Ceci suggère que l'approche RFLP nous permet de mettre en évidence des différences de séquences mais que vu le peu de séquences affiliées à des arylsulfatases disponibles actuellement dans la Genbank, les résultats d'alignement montrent majoritairement des affiliations à l'arylsulfatase de *Rhodopirellula baltica* SH-1 et de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Par ailleurs, l'affiliation phylogénétique des séquences d'acides aminés a mis en évidence des homologies variables (53 % à 99%) avec les séquences de *Rhodopirellula baltica* SH-1 et de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Les résultats d'alignement des séquences sont présentés sur la Figure 3. L'alignement des séquences met en évidence une affiliation à des arylsulfatases présentes chez différentes familles bactériennes (α -, γ -protéobactéries, Actinobactéries, Planctomycètes). La forte représentativité de séquences affiliées à des séquences d'arylsulfatase présentes d'une part chez *Pseudomonas fluorescens* PfO1 et *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 et d'autre part chez *Mycobacterium smegmatis*, *Rhodococcus* sp. RHA1 peut être en partie liée au fait que les amorces ont initialement été dessinées à partir d'alignement du gène codant l'arylsulfatase chez 3 espèces, *Pseudomonas aeruginosa* (Beil *et al.*, 1995), *Klebsiella pneumoniae* (anciennement *Klebsiella aerogenes*) (Murooka *et al.*, 1990) et *Mycobacterium avium* 104. Indépendamment des résultats présentés dans ce chapitre, lors de la mise au point des conditions d'amplification avec les amorces, nous avons obtenu, pour le même sol, des séquences *atsA* affiliées à des δ -protéobactéries tels que celles affiliées aux séquences putatives de *Myxococcus xanthus*, à des Acidobacteria affiliées à celles de *Solibacter usitatus* et à des β -protéobactéries affiliées à celles de *Verminephrobacter eiseniae*

ou de *Delftia acidovorans* et aux Bacterioidetes. Toutefois, ces séquences obtenues lors de la mise au point du protocole PCR n'ont pas été re-isolées dans les banques de clones que nous avons analysées dans ce chapitre, avec pourtant des conditions d'amplification PCR similaires.

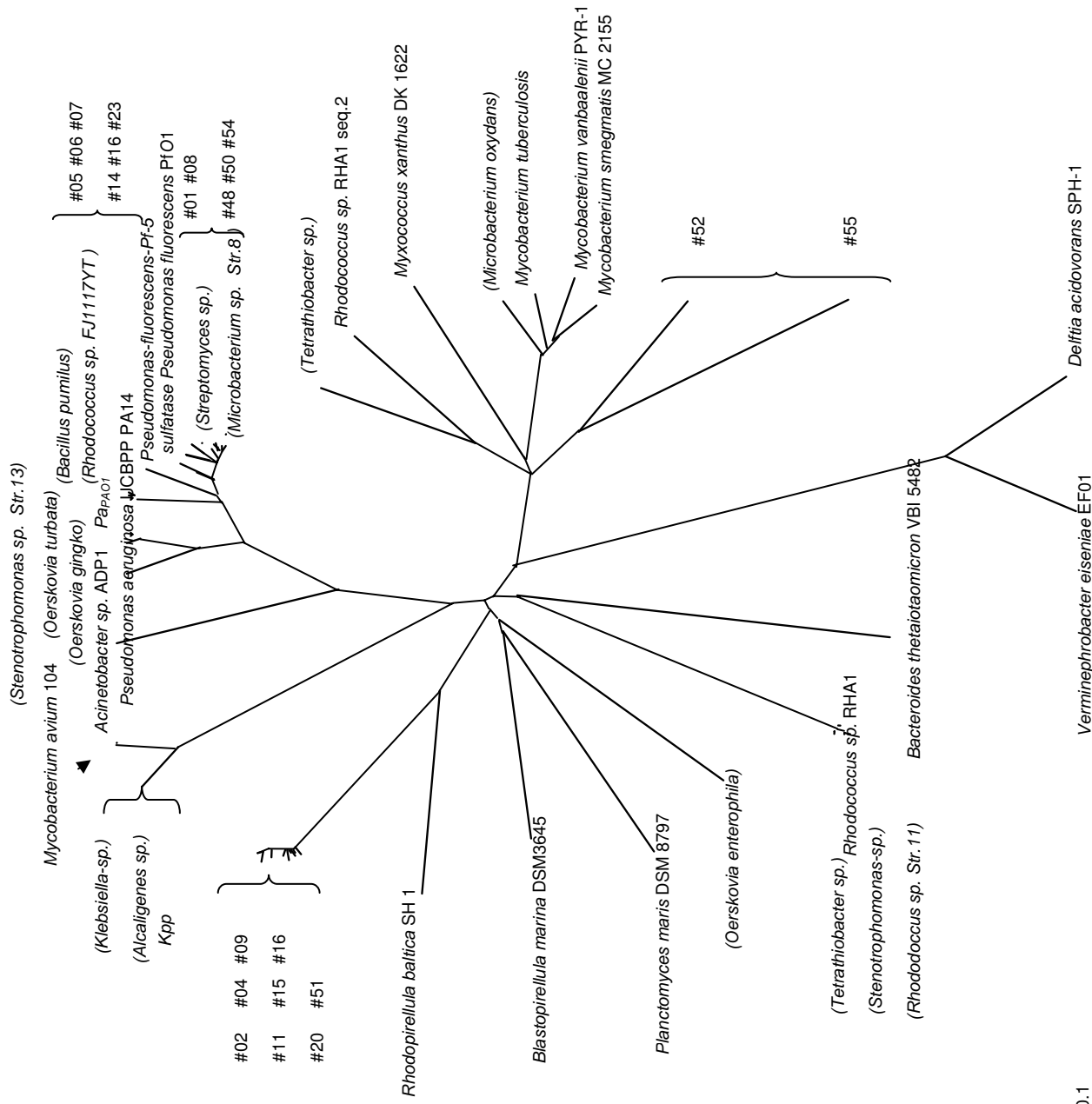


Figure 3 : Relation phylogénétique des séquences en acides aminés des clones *atsA*. Les distances phylogénétiques ont été déterminées par une analyse en neighbour-joining. Enfin, les séquences que nous avons obtenues dans cette étude sont précédées d'un dièse (#) alors que les séquences *atsA* que nous avons précédemment isolées dans le chapitre 4-1 sont notées entre parenthèses

4. Conclusion

L'utilisation d'outils moléculaires ciblés sur une portion du gène codant l'arylsulfatase nous a permis d'étudier la structure et la diversité de la communauté fonctionnelle impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate. Cette approche basée sur l'amplification directe par PCR, de l'ADN extrait directement du sol s'avère complémentaire des méthodes d'analyses de structure et de diversité, basées sur la culture des microorganismes (Chapitre 3.2). En effet, par cette approche directe, nous avons pu mettre en évidence une importante diversité de gènes potentiellement impliqués dans la minéralisation des esters de sulfate dans les sols, et notamment des gènes arylsulfatases affiliés notamment aux α -, β -, δ , γ -protéobactéries et à des Actinobactéries. Cette approche a également permis la détection de quelques séquences proche celles de références, déjà répertoriées dans la littérature *i.e.* les unités catalytiques *AtsA* répertoriées chez *Pseudomonas aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae*. Enfin, nous avons pu mettre en évidence une modification de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza au cours du développement de cette plante avec une diversité spécifique plus importante au stade formation des boutons floraux qu'au stade floraison. Ceci suggère un impact de la plante mais aussi des facteurs pédo-climatiques sur cette communauté bactérienne fonctionnelle.

Enfin, à partir du développement des méthodologies initiées par Schmalenberger et Kertesz (2007) et celles présentées durant cours de cette étude, la mise en place d'approches intégrées, ciblant la minéralisation des deux pools majoritaires de soufre dans les sols (que sont les esters de sulfate et les sulfonates), permettrait de mieux cerner le rôle et la régulation du processus de minéralisation du soufre dans les sols.

5. Références bibliographiques

Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1975. Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 172: 2131-2140.

- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W, Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A., 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). FEBS, European Journal of Biochemistry. 229: 385-394.
- Chèneby D, Hallet S., Mondon M., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2003. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. Microbial Ecology. 46: 113–121.
- Cregut M., Piutti S., Vong P.C., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., Benizri E. 2009. Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. Soil Biology & Biochemistry. 41: 704-710.
- Devers M., Rouard N., Martin-Laurent F. 2008. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. Environmental Microbiology. 10: 676-684.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatases of Microbial Origin, vol. I and II. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. pp 103-169.
- El Azhari N., Bru D., Sarr A., Martin-Laurent F. 2008. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. European Journal of Soil Science. 59: 665-673.
- El Azhari N., Chabaud S., Percept A., Bru D., Martin-Laurent F. 2007. *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in the soil environment. Pest Management Science. 63: 459-467.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Applied and Environmental Microbiology. 72: 5181-5189.

- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle – Metabolism of sulfonates and sulphate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 135-175.
- Kertesz M.A., Leisinger T., Cook A.M. 1993. Protein induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 175: 1187-1190.
- Kuzyakov Y., Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163: 421-431.
- Le Roux X., Poly F., Currey P., Commeaux C., Hai B., Nicol G.W., Prosser J.I., Schloter M., Attard E., Klumpp K. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal*. 2: 221-232.
- Liebner S., Rublack K., Stuehrmann T., Wagner D. 2009. Diversity of aerobic methanotrophic bacteria in a permafrost active layer soil of the Lena delta, Siberia. *Microbial Ecology*. 57: 25-35.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C. Soulas G., Catroux G. 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2354-2359.
- Murooka Y., Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashi M. 1990. A sulfur- and tyramine- regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.
- Paterson E., Thornton B., Midwood A.J., Osborne S.M., Sim A., Millard P. 2008. Atmospheric CO₂ enrichment and nutrient additions to planted soil increase mineralization of soil organic matter, but do not alter microbial utilisation of plant- and soil C- sources. *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 2434-2440.
- Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Hallet S., Germon J.C. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize planted soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 6121-6128.

- Piceno Y.M., Lovell C.R. 2000_a. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*. 39: 32-40.
- Piceno Y.M., Lovell C.R. 2000_b. Stability in natural bacterial communities. II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*. 39: 41-48.
- Poly F., Jocteur Monrozier L., Bally R. 2000. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*. 152: 95-103.
- Schmalenberger A., Hodge S., Hawkesford M.J., Kertesz M.A. 2009. Sulfonate desulfurization in *Rhodococcus* from wheat rhizosphere communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 67: 140-150.
- Schmalenberger A., Hodge S., Bryant A., Hawkesford M.J., Singh B.K., Kertesz M.A. 2008. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environmental Microbiology*. 10: 1486-1500.
- Schmalenberger A., Kertesz M.A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria – high diversity of the *asfA* gene. *Environmental Microbiology*. 9: 535-545.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Arylsulphatase activity in soils. Factors affecting arylsulfatase activity. *Soil Society of American Proceedings*. 34: 225-229.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24: 4876–4882.

- Udiković Kolić N., Martin-Laurent F., Devers M., Petrić I., Begonja Kolar A., Hršak D. 2008. Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from a herbicide factory effluent. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 1334-1343.
- Zhang Y., Dong J., Yang Z., Zhang S., Wang Y. 2008. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Archives of Microbiology*. 190: 19-28.
- Zhang H.-B., Yang M.-X., Shi W., Zheng Y., Sha T., Zhao Z.-W. 2007. Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium. *Microbial Ecology*. 54: 705-712.

Chapitre 6. Discussion générale et Perspectives

Discussion générale et perspectives

1. Discussion générale

Le soufre (S), constituant d'acides aminés essentiels et de liaisons disulfure, joue un rôle essentiel dans la formation de protéines et d'enzymes dans la plante. En Europe, du fait de la réduction des dépositions atmosphériques depuis une quinzaine d'années, le S est devenu l'un des éléments les plus limitants de la production agricole (Zhao *et al.*, 2002). Actuellement un apport systématique de S minéral est réalisé sur colza pour éviter les carences susceptibles de diminuer le rendement et améliorer la qualité des produits, notamment la teneur en huile (Merrien, 1996). Dans le cas du blé tendre, l'apport systématique n'est pas toujours rentable (Bouthier et Danjou, 2009) même si le statut soufré est corrélé à la composition protéique du grain et à la qualité boulangère (Zhao *et al.*, 1999).

Le soufre assimilable par la plante se trouve sous forme de sulfates dans les sols. Cette forme très mobile est facilement lessivable ce qui peut induire des carences au niveau des cultures mais aussi des problèmes de concentration dans les ressources en eau. A la vue de ces éléments, la recherche d'optimisation économique par les agriculteurs dans un contexte de durabilité environnemental passe par une meilleure maîtrise de la fertilisation soufrée. Faute d'appliquer un bilan prévisionnel, les règles de décision de la fertilisation soufrée restent encore très empiriques (Bouthier *et al.*, 2007). L'ensemble de ces éléments met en exergue la nécessité de développer des recherches visant à mieux connaître la dynamique du S dans le sol et à identifier les déterminants biotiques et abiotiques de celle-ci. En effet, même si l'apport d'engrais minéraux permet de limiter les carences au cours de la saison, il n'influence que peu le cycle de S des sols, ce qui soulève le problème à long terme du maintien de la fertilité des agrosystèmes (Bünemann *et al.*, 2006). Concernant la dynamique de S dans le sol, si des données de flux de minéralisation annuelle existent dans la littérature (Eriksen, 1996), les travaux relatifs à la caractérisation de la microflore (en terme de taille, structure et diversité) impliquée dans ces flux sont inexistantes. Aussi, les expérimentations réalisées durant ce doctorat ont eu pour objectif de mieux caractériser la communauté bactérienne (en terme de taille, structure et diversité) impliquée dans la minéralisation du S organique des sols

en prenant l'activité arylsulfatase comme marqueur microbien de la minéralisation. Pour cela nous avons choisis de travailler sur un sol argilo-calcaire (Martincourt) bien caractérisé depuis plusieurs années au sein de l'équipe en terme d'activité potentielle arylsulfatase (Dedourge *et al.*, 2003 ; Vong *et al.*, 2002 ; Vong *et al.*, 2003). L'orge et le colza ont été choisis comme plantes modèles en raison de leurs besoins en S contrastés. En effet, pour assurer une croissance optimale, le colza possède des besoins en S en moyenne deux fois supérieurs à ceux de l'orge (respectivement : 20 à 30 kg de S ha⁻¹ et 15 à 20 kg de S ha⁻¹).

Une première expérimentation (Chapitre 2), réalisée au champ, a permis de caractériser la taille (quantification par qPCR) et la structure génétique (par *b*-RISA) de la communauté bactérienne globale. Des différences de structure ont été mises en évidence alors que la taille de la communauté bactérienne est identique entre les deux couverts végétaux. De plus, dans la rhizosphère de colza, la structure de la communauté bactérienne évolue plus au cours du développement de la plante que celle présente dans la rhizosphère d'orge. Le colza, dicotylédone, est une plante connue pour libérer davantage de composés organiques solubles que l'orge, monocotylédone (Zagal, 1994 ; Vong *et al.*, 2007_b). Ces composés organiques solubles sont directement accessibles à la microflore tellurique et induisent potentiellement des modifications des activités microbiennes génériques (Tarafdar et Jungk, 1987 ; Cheng *et al.*, 1996 ; Grayston *et al.*, 1998 ; Philippot *et al.*, 2006), des modifications de la densité microbienne (Behera et Wagner, 1974 ; Baudoin *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2006) et de sa diversité (Grayston *et al.*, 1998 ; Baudoin *et al.*, 2003 ; Philippot 2006 ; Benizri *et al.*, 2007). Ainsi, l'observation d'une communauté bactérienne, dont la structure génétique est différente, semble rendre compte d'un effet rhizosphère plus marqué concernant le colza comparé à celui de l'orge. Donc, la plante, et notamment le colza, pourrait, de par son effet rhizosphère, sélectionner une communauté bactérienne particulière. Ces données sont néanmoins en contradiction avec certains travaux dans la littérature concernant l'effet rhizosphère qui montrent que les plantes de la famille des crucifères par exemple ont un rapport R/S faible en comparaison avec les légumineuses.

Cette première partie du travail menée sur la communauté bactérienne globale a permis de mettre en évidence un effet rhizosphère différent entre les deux plantes étudiées. Néanmoins rien ne nous permet d'extrapoler cet effet à la communauté fonctionnelle, impliquée dans la minéralisation du soufre, d'où les chapitres suivants consacrés à son étude. Ne disposant

d'aucun outil de criblage des bactéries possédant l'activité arylsulfatase, nous avons développé, dans un premier temps une approche de microbiologie classique permettant la détection et la caractérisation des bactéries capables de minéraliser les esters de sulfate. Cette approche nous a permis de caractériser, pour la première fois, des souches bactériennes du sol capables de minéraliser les composés organiques soufrés possédant des liaisons esters de sulfate (Chapitre 3.2). Les bactéries isolées par cette approche dans les sols rhizosphériques de colza et d'orge sont affiliées à différentes familles taxonomiques telles des α -, γ -protéobactéries dont notamment des Entérobactéries ainsi que des Firmicutes (bactéries Gram+ à basse teneur en GC) et des Actinobactéries (bactéries Gram+ à haute teneur en GC) affiliées notamment aux Micrococccinae et aux Nocardiaceae. Dans la rhizosphère de colza, la structure de cette communauté bactérienne fonctionnelle évolue au cours du développement de la plante suggérant une influence de cette plante sur la densité, la structure et la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle. A l'inverse, dans la rhizosphère d'orge, la structure de la communauté évolue de façon moins prononcée au cours du temps. Par conséquent, le couvert de colza, comme pour la communauté bactérienne rhizosphérique totale, semble exercer une pression de sélection plus importante, que le couvert d'orge, sur la communauté bactérienne fonctionnelle indigène du sol. En effet, Dedourge *et al.*, (2004) rapportent une biomasse microbienne soufrée plus importante par gramme de sol rhizosphérique sous couvert de colza comparée à celle sous couvert d'orge. Ceci pourrait résulter :

- d'une part, de prélèvements de sulfates plus importants sous colza que sous orge qui conditionneraient la stimulation d'une communauté bactérienne apte à minéraliser des sources de soufre organique. Ainsi, cela se traduirait par une augmentation de la densité et donc de l'immobilisation puis ensuite de l'activité arylsulfatase de la communauté bactérienne fonctionnelle en réponse à la diminution du sulfate, lié à cette immobilisation dans la biomasse soufrée,

- d'autre part, d'un effet rhizosphère spécifique au couvert. En effet, le carbone présent dans les racines de colza est plus important en quantité et différent en nature sous couvert de colza comparée à l'orge. Ainsi, la plante, par son effet rhizosphère, pourrait moduler directement la communauté microbienne dans l'environnement rhizosphérique selon deux hypothèses : (i) la rhizodéposition plus importante sous couvert de colza pourrait potentiellement aboutir à un enrichissement de l'environnement rhizosphérique en carbone et en azote plus important en comparaison avec le couvert d'orge. Cet enrichissement aurait pour conséquence une

augmentation des ratios C/S et N/S dans l'environnement rhizosphérique. Ceci pourrait alors induire une limitation relative du S par rapport aux autres éléments et cela pourrait favoriser le développement de microorganismes aptes à minéraliser le S organique grâce à certaines activités enzymatiques, comme l'ARS, afin de se pourvoir en sulfates ; (ii) la rhizodéposition particulière du colza, qui se caractérise par la libération dans le sol de composés soufrés tels les isothiocyanates, pourrait sélectionner une communauté bactérienne rhizosphérique fonctionnelle spécifique qui serait plus apte à minéraliser le soufre organique du sol.

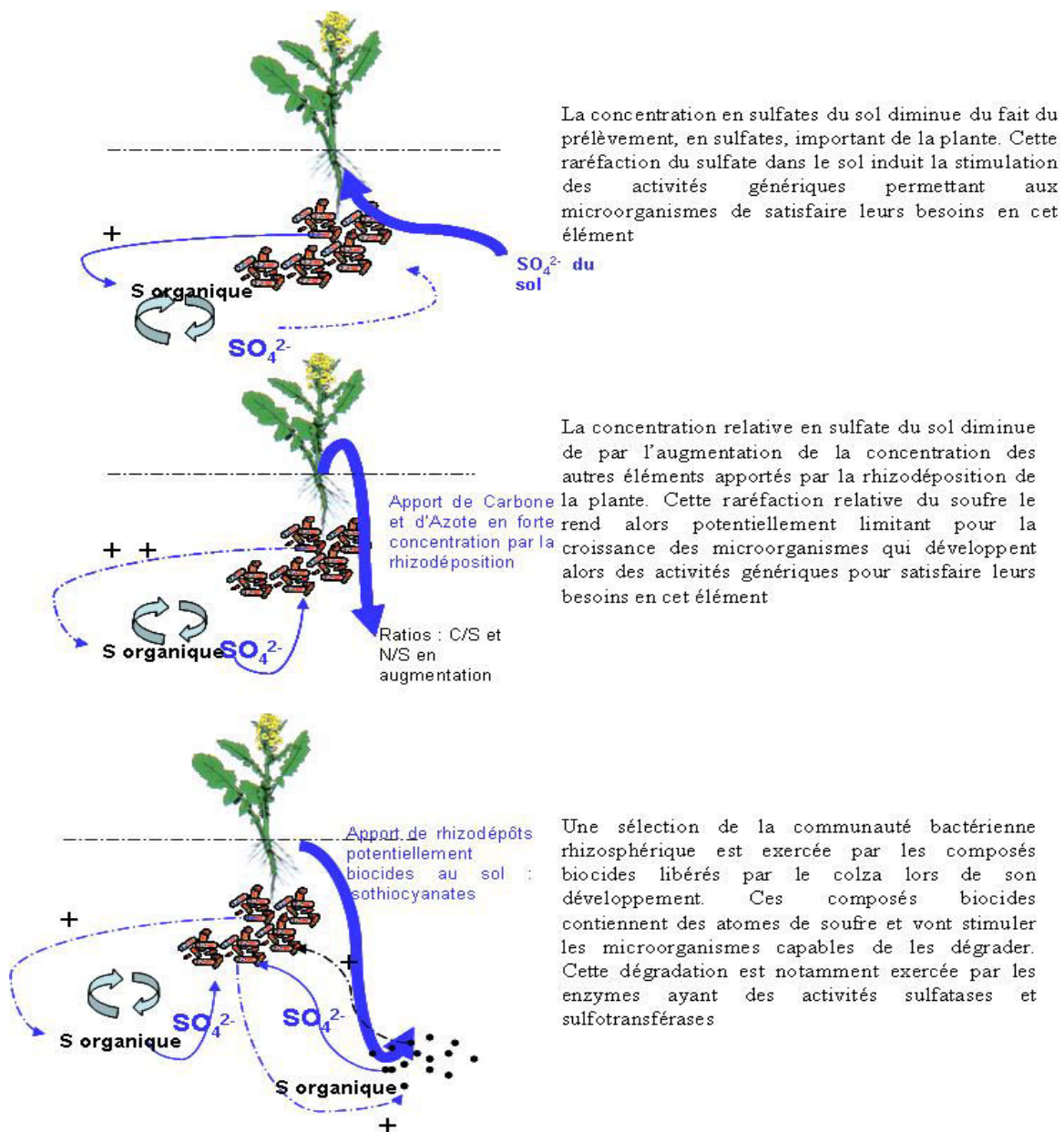


Figure 1 : Présentation des différents scénarii qui pourraient stimuler l'activité arylsulfatase produite par la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza

L'ensemble de ces observations est à pondérer malgré tout dans la mesure où moins de 1 % des microorganismes sont considérés comme cultivables avec les milieux de culture traditionnels. Ainsi, nos résultats ne concernent qu'une fraction de la communauté fonctionnelle et limitent notre perception des réels changements que peut subir la communauté fonctionnelle totale, sous l'influence de ces deux couverts.

Nous avons entrepris par la suite, afin de mieux cerner le rôle et l'importance potentielle de l'activité des microorganismes dans le turn-over du cycle du S, une caractérisation fonctionnelle de l'ARS (son niveau d'activité) chez différents isolats (en particulier des bactéries affiliées aux Actinobactéries et une bactérie affiliée à *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7, dans le but de comparer l'ensemble de nos résultats avec un microorganisme plus proche des bactéries de références) de la communauté bactérienne rhizosphérique. Nous avons vu qu'il existait deux modes de régulation répertoriés dans la littérature : le « mode 1 », présent chez les champignons filamenteux et les Entérobactéries (Harada et Spencer, 1962 ; Harada et Spencer, 1964 ; Adachi *et al.*, 1975 ; Murooka *et al.*, 1977 ; Murooka *et al.*, 1990) et « le mode 2 » caractéristique des *Pseudomonas* (Kertesz *et al.*, 1993 ; Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999). Nos résultats tendent à mettre en évidence, chez les Actinomyceteaceae, deux modes d'induction de l'arylsulfatase, dont l'un est proche du « mode 1 » et un mode d'induction intermédiaire au « mode 1 » et au « mode 2 » (caractérisé chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et caractérisé chez les champignons et *Klebsiella pneumoniae*), que nous qualifierons de « mode 3 ». Enfin, les bactéries Gram+ étudiées semblent posséder un type d'arylsulfatase membranaire, alors que celle des protéobactéries semble largement intracellulaire.

De façon plus générale, nos résultats tendent à discriminer finalement 3 types d'inductions de l'arylsulfatase chez les bactéries étudiées :

- le « mode 1 », observé chez les souches affiliées à *Microbacterium sp.* 5 et *Rhodococcus sp.* PLL-1, pour lequel l'induction de l'arylsulfatase dépend essentiellement de la demande en sulfate (et les intermédiaires directs de la voie de biosynthèse de la cystéine) ou de la présence du substrat de l'enzyme,

- le « mode 2 », observé pour *Stenotrophomonas sp.*, dans notre étude, pour lequel l'induction de l'arylsulfatase est régulée uniquement par la demande en sulfate ou en intermédiaires de la voie de biosynthèse de la cystéine. Ce type d'induction a été mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Beil *et al.*, 1995),

- le « mode 3 », pour lequel l'induction de l'arylsulfatase semble régulée par la demande en sulfate (et les intermédiaires directs de la voie de biosynthèse de la cystéine) et dont le niveau d'activité semble modulé par le substrat de l'arylsulfatase. Ce type d'induction a été observé dans notre étude pour *Streptomyces sp.*

Afin d'accéder à la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle, dans son ensemble, nous avons développé des outils moléculaires dessinés dans des zones conservées du gène codant l'arylsulfatase caractérisé notamment chez *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Chapitre 5-1). Ces deux gènes codent tous deux pour des enzymes ayant une activité arylsulfatase. Toutefois, les séquences primaires de ces enzymes AtsA ne possèdent que 37 % d'identité de leur séquence peptidique (Murooka *et al.*, 1990 ; Beil *et al.*, 1995 ; Kertesz, 1999). Cependant, la littérature met en exergue quelques régions relativement bien conservées. La première de ces régions conservée porte un motif caractéristique des sulfatases de type CXP/AXR ou SXPXR (Berteau *et al.*, 2006). Ainsi, dans une recherche de spécificité portant sur le ciblage du gène de l'arylsulfatase, il ne nous a pas semblé opportun de cibler un motif commun à l'ensemble des sulfatases. Ainsi, le premier jeu d'amorces moléculaires a été dessiné à proximité de ce premier motif dans une zone légèrement moins conservée. Par ailleurs, à partir des récents travaux sur la caractérisation des sulfatases et des arylsulfatases (Yamada *et al.*, 1989 ; Murooka *et al.*, 1990 ; Beil *et al.*, 1995 ; Franco *et al.*, 1995 ; Goodwin *et al.*, 2000 ; Mougous *et al.*, 2002 ; Sardiello *et al.*, 2005) et d'analyses *in silico*, nous avons pu mettre en évidence la présence d'une signature spécifique aux arylsulfatases (motif relativement bien conservés d'acides aminés de type GKWHL). Cette zone a directement été utilisée comme site spécifique pour l'établissement d'une amorce moléculaire à 175 pb de la première amorce qui a été définie. Ainsi, sur la séquence du gène de l'arylsulfatase, seules trois amorces moléculaires ont ainsi pu être définies et nommées respectivement : *atsAF*, *atsA175F* et *atsAR* (Figure 2).

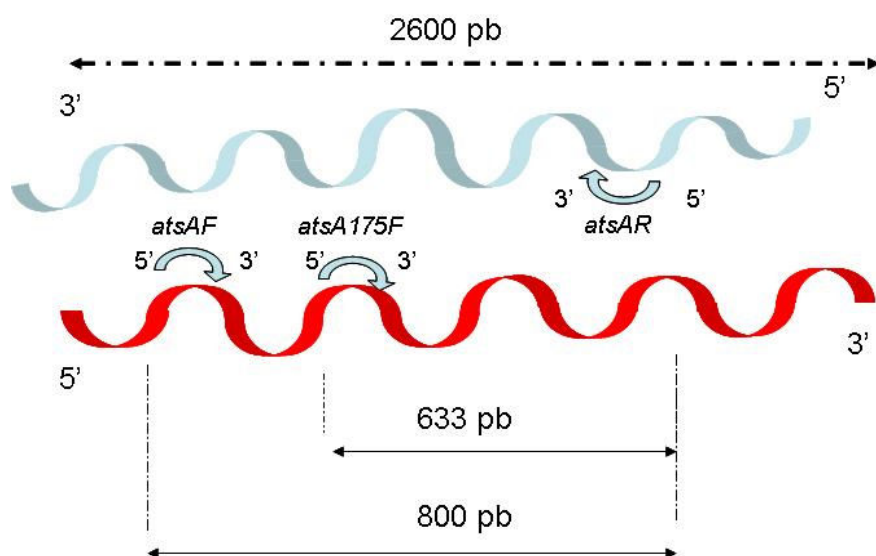


Figure 2 : Représentation du gène, de 2600pb, de l'unité catalytique de l'arylsulfatase, *AtsA*, et les sites utilisés pour l'établissement d'amorces moléculaire

De nombreuses séries d'amplifications avec notamment les amorces *atsAF* et *atsAR* ont permis l'amplification d'une portion du gène de l'arylsulfatase chez différents isolats, taxonomiquement très éloignés, que nous avons préalablement isolées lors de l'étude portant sur la caractérisation de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable. L'amplification systématique d'un fragment du gène de l'arylsulfatase chez des bactéries appartenant à des groupes phylogénétiques variés et qui, en outre, possèdent une activité arylsulfatase, montre la robustesse de nos amorces. De plus, ces amorces ont permis une amplification du gène *atsA* chez des bactéries ayant différents modes de régulation (Ser- ou Cys- type) et possédant ou non un peptide signal dans la séquence de leur gène *atsA*. Ainsi, il nous a été possible d'amplifier le gène de l'arylsulfatase référencé chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, qui possède un résidu de type cystéine et pas de peptide signal (Beil *et al.*, 1995). En outre, chez une souche appartenant au genre *Klebsiella*, nous avons pu amplifier le gène de l'arylsulfatase alors que *Klebsiella pneumoniae* possède une séquence *atsA* présentant un peptide signal et un résidu de type sérine (Murooka *et al.*, 1990). Ainsi, pour la première fois, nous avons pu obtenir une première banque de séquences de gènes affiliées aux arylsulfatases et notamment pour des bactéries isolées du sol, phylogénétiquement éloignées des bactéries de l'environnement clinique, qui avaient été utilisées pour définir les amorces. La comparaison pour chacun des isolats de la séquence du gène codant l'arylsulfatase et la séquence codant l'ADNr 16S ne met pas en évidence de congruence entre ces gènes. Cette non congruence laisse supposer soit, (i) l'existence de processus évolutifs particuliers et propres aux gènes

atsA, (ii) l'isolement de séquences putatives non fonctionnelles d'*atsA*. Ainsi, des études phylogénétiques complémentaires, basées notamment sur l'affiliation des séquences des ARNm transcrits, à partir du gène *atsA*, au sein de microorganismes possédant des modes de régulation contrastés, pourraient nous permettre de statuer sur l'existence probable de l'implication de gènes de différente nature codant cette même activité enzymatique.

L'amplification directe du gène *atsA* à partir de l'ADN extrait du sol par une démarche de type nested PCR a permis d'appréhender, pour la première fois, la diversité d'*atsA* au sein de la communauté bactérienne fonctionnelle (Chapitre 5-2). Les amorces utilisées dans ce cadre ont permis l'obtention de fragments de 633 pb et non plus de 800 pb, impliquant une diminution apparente de diversité. Toutefois, de nombreuses études se limitent lors d'analyses de la structure des unités catalytiques à des séquences plus petites que 633 pb. En effet, certaines techniques comme la DGGE/TGGE ou la SSCP permettant d'étudier la structure, par empreintes génétiques, de gènes fonctionnels sont menées sur des fragments de petites tailles (Muyzer et Smalla, 1998 ; Schmalenberger *et al.*, 2007 ; Schmalenberger *et al.*, 2008).

Dans notre cas, la diversité génétique d'*atsA* a été abordée suite à la réalisation d'une banque de clones à partir d'ADN extrait du sol rhizosphérique de colza. Cette approche a permis non seulement de re-isoler des séquences affiliées à *atsA* que nous avons déjà obtenues (les séquences du gène de l'unité catalytique de l'arylsulfatase affiliées aux Entérobactéries, aux γ -protéobactéries et aux Actinobactéries) mais aussi de nouvelles séquences affiliées aux α -, β -, σ -protéobactéries et aux Planctomycètes. La diversité totale obtenue avec l'utilisation de ces outils moléculaires est présentée dans la Figure 3.

Par ailleurs, cette étude, concernant le colza, a révélée des modifications de la diversité de la communauté fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate au cours du développement de la plante. Par contre, concernant l'orge, l'approche par PCR nichée ne nous a pas permis d'obtenir un produit PCR de la taille attendue. Ainsi, pour les sols rhizosphériques d'orge, il est possible que le nombre de copies de gènes fonctionnels dans ces sols soit trop faible ou que les gènes présentent trop de dissimilitudes avec nos amorces pour être amplifiés. De plus, la réaction PCR a pu être inhibée du fait de la présence d'inhibiteurs de réaction en trop forte concentration.

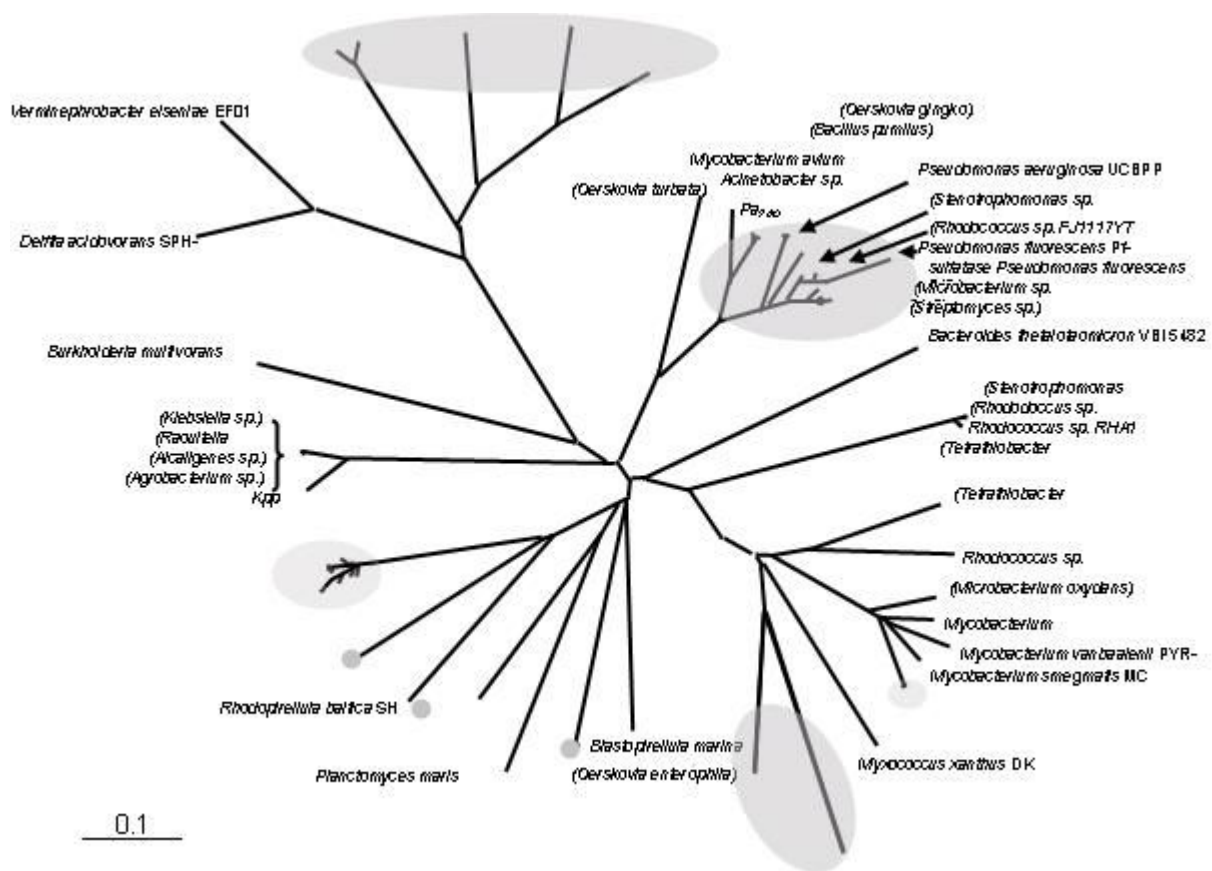


Figure 3 : Relation phylogénétique des séquences en acides aminés des clones *atsA*. Les distances phylogénétiques ont été déterminées par une analyse en neighbour-joining. Les séquences que nous avons obtenues, à partir des amorces moléculaires directement utilisées sur le sol, sont représentées par des ellipses grises alors que celles que nous avons précédemment isolées (chapitre 5-1) sont notées entre parenthèses

2. Perspectives

En perspectives, forts de l'ensemble des résultats obtenus au travers de cette thèse, il nous apparaît que différentes expérimentations complémentaires pourraient être réalisées afin de répondre en partie à certaines interrogations toujours présentes à l'issue de ce travail de doctorat. En effet le colza semble stimuler plus particulièrement la communauté fonctionnelle arylsulfatase que l'orge. Afin de mieux appréhender cet effet rhizosphère, des approches de type DNA-SIP (Stable Isotope Probing) basées sur un marquage au carbone ^{13}C des plantes permettraient de voir si la communauté bactérienne fonctionnelle est influencée par les

rhizodépôts. Cette technique a été utilisée ces dernières années pour tracer les populations actives (Dumont et Murrell, 2005 ; Lu *et al.*, 2006 ; Deneff *et al.*, 2007) ou des populations impliquées dans la dégradation de différents substrats (Yevdokimov *et al.*, 2006 ; Bernard *et al.*, 2007). Ainsi le marquage de colza et d'orge à plus de 90% au ^{13}C pourraient permettre d'isoler les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation des rhizodépôts spécifiques de chaque plante (Haichar *et al.*, 2008). L'amplification de cet ADN ^{13}C avec des amorces fonctionnelles ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase révélerait les groupes microbiens dégradant les rhizodépôts et possédant potentiellement une activité de minéralisation du soufre organique. Parallèlement à ce suivi de la dynamique de la communauté fonctionnelle *via* la technique DNA-SIP, des mesures d'activité potentielle arylsulfatase ainsi que des bilans de flux nets de soufre (grâce à l'utilisation du traceur ^{35}S apporté dans le sol) pourraient être effectués.

Afin d'interpréter plus finement l'effet rhizosphère, il conviendrait de mettre en place des expérimentations permettant de mieux cerner l'impact de la plante sur les communautés microbiennes minéralisant les esters de sulfate. Plusieurs expérimentations seraient envisageables. Nous pourrions, afin de cerner l'effet « prélèvement de sulfates par la plante », mettre en place des microcosmes indépendants contenant soit un, deux, trois...plants de colza. Ce nombre croissant de plants impliquerait, *a priori*, des prélèvements croissants en sulfates par les plantes. Nous verrions ainsi si l'augmentation des prélèvements stimule au final la communauté microbienne fonctionnelle.

Les résultats préliminaires obtenus sur l'induction de l'arylsulfatase chez des souches bactériennes du sol permettent dès à présent d'ouvrir une nouvelle voie d'étude des arylsulfatases. En effet, à la vue des différents modes d'inductions et de compartimentation de l'arylsulfatase que nous avons observés, la mise en place d'approche mécanistiques ainsi que de nouvelles approches écologiques restent à entreprendre :

- concernant les nouvelles approches écologiques, compte tenu des différences d'induction et de compartimentation de l'arylsulfatase que nous avons observés chez des microorganismes telluriques, la mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées, dans des systèmes sols-plantes, semble importante afin de clarifier le rôle de cette activité enzymatique dans le sol. En effet, dans un milieu de culture fermé, le sulfate libéré par une activité extracellulaire

va directement bénéficier au microorganisme. A l'inverse, dans le sol qui est un système ouvert, le sulfate libéré par l'activité de l'arylsulfatase, va faire l'objet d'une compétition entre le microorganisme synthétisant l'activité, la plante et les autres microorganismes du sol, qui possèdent également des besoins en sulfate. Ainsi, l'étude de ces différentes activités arylsulfatases dans l'environnement rhizosphérique semble importante, compte tenu de l'existence de ces différents modes d'induction et de compartimentation. Par ailleurs, le couplage de ces plans d'expérimentations avec des approches de marquage au ^{34}S , permettrait de déterminer quel est le pool préférentiel de S, organique ou minéral, qui est réellement utilisé par la microflore. En outre, nous pourrions également déterminer si l'immobilisation du soufre organique dans les microorganismes peut véritablement profiter à la nutrition de la plante, du fait du rapide turn-over microbien. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre et prédire le rôle et le devenir des esters de sulfate du sol dans la nutrition soufrée des organismes vivants (plantes et microorganismes),

- sur l'aspect mécanistique, la mise en place d'approches biochimiques et de protéomiques couplées à des approches de biologie moléculaire permettraient notamment de caractériser les arylsulfatases présentes chez ces souches, leurs modes de régulation (par la création de banques de mutants).

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

3. Références bibliographiques

Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1975. Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.

- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil land maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1183-1192.
- Behera A., Wagner G.H. 1974. Microbial growth rate in glucose-amended soil. *Soil Science Society of America*. 38: 591-594.
- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W, Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *FEBS European Journal of Biochemistry*. 229: 385-394.
- Benizri E., Nguyen C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 1230-1233.
- Bernard L., Mougél C., Maron P.-A., Nowak V., Lévêque J., Henault C., Haichar F.E.Z., Berge O., Marol C., Balesdent J., Gibiat P., Lemanceau P., Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*. 9: 752-764.
- Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. 2006. A new type of bacterial Sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 22464-22470.
- Bouthier A., Danjou D. 2009. Céréales à pailles : bilan de deux campagnes d'essais de fertilisation soufrée. *Perspectives agricoles*. 353 : 48-51.
- Bouthier A., Bonnifet J.P., Drieu Y., Seguin A. 2007. Fertilisation soufrée des céréales : mieux prévoir le risque de déficience. *Perspectives agricoles*. 330: 54-59.
- Bünemann E.K., Schwenke G.D., Van Zwieten L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms- a review. *Australian Journal of Soil Research*. 44: 379-406.

- Cheng W., Zhang G., Coleman D.C., Carroll C.R., Hoffman C.A. 1996. Is available Carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology & Biochemistry*. 28: 1283-1288.
- Dedouge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science*. 55: 649-656.
- Dedouge O., Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 181-185.
- Denef K., Bubenheim H., Lenhart K., Vermeulen J., Van Cleemput O., Boeckx P., Müller C. 2007. Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO₂. *Biogeosciences*. 4: 769-779.
- Dumont M.G., Murrell C. 2005. Stable isotope probing – linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 499-504.
- Eriksen J. 1996. Incorporation of S into soil organic matter in the field as determined by the natural abundance of stable S isotopes. *Biology and Fertility of Soils*. 22: 149-155.
- Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 1011-1016.
- Felske A., Engelen B., Nübel U., Backhaus H. 1996. Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4162-4167.

- Franco B., Meroni G., Parenti G., Levilliers J., Bernard L., Gebbia M., Cox L., Maroteaux P., Sheffield L., Rappold G.A., Andria G., Petit C., Ballabio A. 1995. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell*. 81: 15-25.
- Goodwin P.H., Li J., Jin S. 2000. Evidence for sulphate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 169-176.
- Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 30: 369-378.
- Haichar F.E.Z., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J.I., Prosser J.I., Balesdent J., Heulin T., Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*. 2: 1221-1230.
- Harada T., Spencer B. 1964. Repression and induction of arylsulphatase synthesis in *Aerobacter aerogenes*. *Biochemistry Journal*. 93: 373-378.
- Harada T., Spencer B. 1962. The effect of sulphate assimilation on the induction of arylsulphatase synthesis in fungi. *Biochemistry Journal*. 82: 148-156.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5181-5189.
- Henry S., Baudoin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 59: 327-335.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.

- Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2296-2303.
- Lu Y., Rosencrantz D., Liesack W., Conrad R. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology*. 8: 1351-1360.
- López-Gutiérrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G., Philippot L. 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 57: 339-407.
- Merrien A. 1996. Apport de soufre sur colza d'hiver^o: un délicat compromis entre rendement et qualité. *Perspectives agricoles*. 210 : 72-74.
- Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J.B., Brenner S.E., Bertozzi C.R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry & Biology*. 9: 767-776.
- Murooka Y., Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashi M. 1990. A sulfur- and tyramine- regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.
- Murooka Y., Adachi T., Okamura H., Harada T. 1977. Genetic control of arylsulfatase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 130: 74-81.
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127-141.
- Okano Y., Hristova K.R., Leutenegger C.M., Jackson L.E., Denison R. F., Gebreyesus B., Lebauer D., Scow K.M. 2004. Application of real-time PCR to study effects of Ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1008-1016.

- Philippot L., Kuffner M., Cheneby D., Depret G., Laguerre G., Martin-Laurent F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. *Plant and Soil*. 287: 177-186.
- Qiu X.Y., Hurt R.A., Wu L.Y., Chen C.H., Tiedje J.M., Zhou J.Z. 2004. Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 59: 199-210.
- Sardiello M., Annunziata I., Roma G., Ballabio A. 2005. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*. 14: 3203-3217.
- Schmalenberger A., Kertesz M.A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. *Environmental Microbiology*. 9: 535-545.
- Schmalenberger A., Tebbe C.C., Kertesz M.A., Drake H.L., Küsel K. 2008. Two-dimensional single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene fragments reveals highly dissimilar bacterial communities in an acidic fen. *European Journal of Soil Biology*. 44: 495-500.
- Sessitsch A., Gyamfi S., Stralis-Pavese N., Weilharter A., Pfeifer U. 2002. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods*. 51: 171-179.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970. Forms of sulfur and carbon, nitrogen and sulfur relationships in Iowa soils. *Soil Science*. 114: 380-386.
- Tarafdar J.C., Jungk A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*. 3: 199-204.

- Vong P.C., Nguyen C., Guckert A., 2007_a. Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type. *European Journal of Agronomy*. 27: 35-43.
- Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007_b. Water-Soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil*. 294: 19-29.
- Vong P.C., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1651-1661.
- Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2002. Mobilization of labeled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizosphere soil. *Journal of Plant Nutrition*. 25: 2191-2204.
- Yamada K., Akasaka K., Shimada H. 1989. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 186: 405-410.
- Yevdomikov I., Ruser R., Buegger F., Marx M., Munch J.C. 2006. Microbial immobilisation of ¹³C rhizodeposits in rhizosphere and root-free soil under continuous ¹³C labelling of oats. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 1202-1211.
- Zagal E. 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system (*Hordeum vulgare* L.), ryegrass (*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a ¹⁴CO₂-atmosphere. *Plant and Soil*. 166: 63-74.
- Zhao F.J., McGrath S.P., Blake-Kalf M.M.A., Link A., Tucker M. 2002. Crop responses to sulphur fertilisation in Europe. *Proceedings N° 504, International Fertiliser Society, York, UK*. 27 p.
- Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science*. 30: 1-17.

Chapitre 7. Références bibliographiques

- Achouak W., Sutra L., Heulin T., Meyer J.M., Fromin N., Degraeve S., Christen R., Gardan L. 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 9-18.
- Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1975. Regulation of arylsulfatase synthesis by sulfur compounds in *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 172: 2131-2140.
- Adachi T., Okamura H., Murooka Y., Harada T. 1974. Catabolite repression and derepression of arylsulfatase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. Journal of Bacteriology. 120: 880-885.
- Adachi T., Murooka Y., Harada T. 1973. Derepression of arylsulfatase synthesis in *Aerobacter aerogenes* by tyramine. Journal of Bacteriology. 116: 19-24.
- Allgaier M., Brückner S., Jaspers E., Grossart H.-P. 2007. Intra- and inter-lake variability of free-living and particle-associated *Actinobacteria* communities. Environmental Microbiology. 9: 2728-2741.
- Alvey S., Yang C.H., Buerkert A., Crowley D.E. 2003. Cereal legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. Biology and Fertility of Soils. 37: 73-82.
- Asmar F., Gahoonia T.S., Nielsen N.E. 1995. Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere. Plant and Soil 172: 117-122.
- Autry A.R., Fitzgerald J.W. 1991. Organosulfur formation in forest soils: Site comparison of kinetic parameters. Soil Biology & Biochemistry. 23: 689-693.
- Autry A.R., Fitzgerald J.W. 1990. Sulfonate S – A major form of forest soil organic sulfur. Biology and Fertility of Soils. 10: 50-56.

- Bach H.J., Tomanova J., Schloter M., Munch J.C. 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. Journal of Microbiological Methods. 49: 235-245.

- Bacic H.P., Moody S.F., McComb J.A., Hinch J.M. 1987. Extracellular polysaccharides from shaken liquid cultures of *Zea mays*. *Australian Journal Plant Physiology*. 14: 633-641.
- Badalucco L., Kuikman P.J., Nannipieri P. 1996. Protease and deaminase in wheat rhizosphere and their relation to bacterial and protozoan populations. *Biology and Fertility of Soils*. 23: 99-104.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with Plants and other Organisms. *The Annual Review of Plant Biology*. 57: 233-266.
- Bandick A.K., Dick R.P. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology & Biochemistry*. 31: 1471-1479.
- Banerjee M.R., Chapman S.J. 1996. The significance of microbial biomass sulphur in soil. *Biology and Fertility of Soils*. 22: 116-125.
- Barbeyron T., Potin P., Richard C., Collin O., Kloareg B. 1995. Arylsulphatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology*. 141: 2897-2904.
- Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F. 1980a. Further studies on the substrate specificity and inhibition of the stereospecific CS₂ secondary alkylsulphohydrolase of *Comamonas terrigena*. *The Biochemical Journal*. 191: 467-473.
- Barett C.H., Dodgson K.S., White G.F., Payne W.J. 1980b. Preliminary observations on alcohol dehydrogenases in *Comamonas terrigena* that exhibit Stereospecificity towards secondary alcohols. *The Biochemical Journal*. 187: 703-709.
- Bartholomew B., Dodgson K.S., Matcham G.W.J., Shaw D.J., White G. 1977. A novel mechanism of enzymatic ester hydrolysis. *Biochemical Journal*. 165: 575-580.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil land maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1183-1192.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*. 19: 135-145.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology*. 37: 85-93.
- Behera A., Wagner G.H. 1974. Microbial growth rate in glucose-amended soil. *Soil Science Society of America*. 38: 591-594.
- Beil S., Kehrli H., James P., Staudenmann W, Cook A.M., Leisinger T., Kertesz M.A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 during growth in sulphate free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *FEBS European Journal of Biochemistry*. 229: 385-394.

- Benizri E., Amiaud B. 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 2055-2064.
- Benizri E., Nguyen C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 1230-1233.
- Benizri E., Dedourge O., Dibattista-Leboeuf C., Piutti S., Nguyen C., Guckert A. 2002. Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*. 21: 261-265.
- Benjdia A., Dehò., Rabot S., Berteau O. 2007_a. First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli aslB* and *ydeM* deletion mutants. *FEBS Letters*. 581: 1009-1014.
- Benjdia A., Leprince J., Guillot A., Vaudry H., Rabot S., Berteau O. 2007_b. Anaerobic sulfatase-maturing enzymes: Radical SAM Enzymes able to catalyze in vitro sulfatase post-translational modification. *Journal of the American Chemical Society*. 129: 3462-3463.
- Berger E.A., Heppel L.A. 1972. A binding protein involved in the transport of cysteine and diaminopimelic acid in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 7684–7694.
- Bernard L., Mougèl C., Maron P.-A., Nowak V., Lévêque J., Henault C., Haichar F.E.Z., Berge O., Marol C., Balesdent J., Gibiat P., Lemanceau P., Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*. 9: 752-764.
- Berteau O., Guillot A., Benjdia A., Rabot S. 2006. A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 22464-22470.
- Bertrand H., Nalin R., Bally R., Cleyet-Marel J.C. 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and Fertility of Soils*. 33: 152-156.
- Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1983. Sulphur cycling in soils. *In*: More A.I. (Ed), *Proceedings of Sulphur '82 Conference*. British Sulphur Corporation, London. Vol. 2 pp. 747–785.
- Blake-Kalff M.M.A., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 2000. Diagnosing sulphur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*. 225: 95-107.
- Blattner F.R., Plunkett 3rd G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado Vides J., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.M., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277: 1453-1474.

- Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. 2005. Influence of nitrogen and sulfur fertilization on the alliin content of onions and garlic. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 763-784.
- Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. 2005. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 763-784.
- Boltes I., Czapinska H., Kahnert A., von Bülow R., Dierks T., Schmidt B., von Figura K., Kertesz M.A., Usón I. 2001. 1.3 Å Structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure*. 9: 483-491.
- Bopaiiah B.M., Shetty H.S. 1991. Soil microflora and biological activities in the rhizospheres and root regions of coconut-based multi-storeyed cropping and coconut monocropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*. 23: 89-94.
- Bouthier A., Danjou D. 2009. Céréales à pailles : bilan de deux campagnes d'essais de fertilisation soufrée. *Perspectives agricoles*. 353 : 48-51.
- Bouthier A., Bonnifet J.P., Drieu Y., Seguin A. 2007. Fertilisation soufrée des céréales : mieux prévoir le risque de déficience. *Perspectives agricoles*. 330: 54-59.
- Bowen G.D., Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *In: Sparks D.L., (Ed.), Advances in Agronomy, Vol. 66. Academic Press, New York. pp. 1-102.*
- Brader G., Dalgaard Mikkelsen M., Halkier B.A., Palva .E.T. 2006. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *The Plant Journal*.46:758-767.
- Brader G., Tas E., Palva E.T. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*. 126: 849-860.
- Brady N.C. 1974. *In : The nature and properties of soils, Macmillian, New York.. 639 p.*
- Brückner R., Titgemeyer F. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology letters*. 209: 141-148.
- Bünemann E.K., Schwenke G.D., Van Zwieten L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms- a review. *Australian Journal of Soil Research*. 44: 379-406.
- Butler J.D., Levin S.W., Facchiano A., Miele L., Mukherjee A.B. 1972. Amino acid composition and N-terminal sequence of purified cystine binding protein of *Escherichia coli*. *Life Sciences*. 52: 1209–1215.

Commençant par la lettre

C

- Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C., Bazzicalupo M. 2000. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4785-4789.
- Castellano S.D., Dick R.P. 1991. Cropping and sulfur fertilization influence on sulfur transformations in soil. *Soil Science Society American Journal*. 55: 114-121.
- Ceccotti S.P. 1996. Plant nutrient sulphur: a review of nutrient balance, environment impact and fertilizers. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 43: 117-125.
- Chang C.W., Bandurski R.S. 1964. Exocellular enzymes of corn roots. *Plant Physiology*. 39: 60-64.
- Chapman S.J. 1987. Microbial sulphur in some Scottish soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 19: 301-305.
- Chen C.R., Condron L.M., Davis M.R., Sherlock R.R. 2001. Effects of land-use change from grassland to forest on soil sulfur and arylsulfatase activity in New Zealand. *Australian Journal of Soil Research*. 39: 749-757.
- Chèneby D, Hallet S., Mondon M., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2003. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. *Microbial Ecology*. 46: 113–121.
- Cheng W., Zhang Q., Coleman D.C., Ronald Carroll C., Hoffman C.A. 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology & Biochemistry*. 28: 1283-1288.
- CITEPA. 2008. http://www.citepa.org/emissions/nationale/Aep/aep_so2_en.htm
- Cloves J.M., Dodgson K.S., Payne W.J., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980_a. Purification and properties of the P2 primary alkylsulphohydrolase of the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. *The Biochemical Journal*. 185: 23-31.
- Cloves J.M., Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1980_b. Specificity of P2 primary alkylsulphohydrolase induction in the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. *The Biochemical Journal*. 185: 13-21.
- Cloves J.M. Dodgson K.S., Games D.E., Shaw D.J., White G.F. 1977. The mechanism of action of primary alkylsulphohydrolase and arylsulphohydrolase from a detergent-degrading micro-organism. *The Biochemical Journal*. 167: 843-846.
- Cooper P.J.M. 1972. Arylsulfatase activity in northern Nigeria soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 4: 333-337.

- Costa R., Götz M., Mrotzek N., Lottmann J., Berg G., Smalla K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology*. 56: 236-249.
- Cowan J.M., Urbanowski M.L., Talmi M., Stauffer G.V. 1993. Regulation of the *Salmonella typhimurium metF* gene by the MetR protein. *Journal of Bacteriology*. 175: 5862-5866.
- Cregut M., Piutti S., Vong P.C., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., Benizri E. 2009. Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barley. *Soil Biology & Biochemistry*. 41: 704-710.
- Crescenzi A.M.V., Dodgson K.S., White G.F. 1984. Purification and some properties of the D-lactate-2-sulphatase of *Pseudomonas syringae* GG. *The Biochemical Journal*. 223: 487-494.
- Curl E.A., Truelove B. 1986. The rhizosphere. Curl E.A., Truelove B. (Eds.) Springer-Verlag. New York. 288 p.

Commençant par la lettre

D

- Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA (Ed.) 383 pp.
- David M.B., Mitchell M.J. 1985. Sulfur constituents and cycling in waters, seston, and sediments of an oligotrophic lake. *Limnology and Oceanography*. 30: 1196-1207.
- Davison J., Brunel F., Phanopoulos A., Prozzi D., Terpsstra P. 1992. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene*. 114: 19-24.
- de Hostos E.L., Togasaki R.K., Grossman A. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reihardtii*. *Journal of Cellular Biology*. 106: 29-38.
- De la Paz Jimenez M., De la Hora A.M., Pruzzo L., Palma R.M. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 302-306.
- de Ridder-Duine A.S., Kowalchuk G.A., Klein Gunnewiek P.J.A., Smant W., van Veen J.A., de Boer W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 349-357.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-³⁵S, microbial biomass-

- ³⁵S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science*. 55: 649-656.
- Dedourge O., Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A. 2003. Immobilization of sulphur-35, microbial biomass and arylsulphatase activity in soils from field-grown rape, barley and fallow. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 181-185.
- DeLuca T.H., Keeney D.R. 1994. Soluble carbon and nitrogen pools of prairie and cultivated soils: seasonal variation. *Soil Science Society of America Journal*. 58: 835-840.
- Denef K., Bubenheim H., Lenhart K., Vermeulen J., Van Cleemput O., Boeckx P., Müller C. 2007. Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO₂. *Biogeosciences*. 4: 769-779.
- Deng S.P., Tabatabai M.A. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III - Phosphatases and arylsulfatase. *Biology and Fertility of Soils*. 24: 141-146.
- Deslile G.J., Milazzo F.H. 1972. Characterization of arylsulfatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 18: 561-568.
- Deslile G.J., Milazzo F.H. 1970. The isolation of arylsulfatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 212: 505-508.
- Devers M., Rouard N., Martin-Laurent F. 2008. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology*. 10: 676-684.
- Di Cello F., Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tavacchioni S., Dalmastri C., 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4485-4493.
- Di Giovanni G.D., Watrud L.S., Seidler R.J., Widmer F. 1999. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR (ERIC-PCR). *Microbiology Ecology*. 37: 129-139.
- Dias B., Weimer B. 1998. Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacili, and brevibacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3320-3326.
- Dierks T., Schmidt B., Borissenko L.V., Peng J., Preusser A., Mariappan M., von Figura K. 2003. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C_α-formylglycine generating enzyme. *Cell*. 113: 435-444.
- Dierks T., Lecca M.R., Schlotterhose P., Schmidt B., von Figura K. 1999. Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *The EMBO Journal*. 18: 2084-2091.

- Dierks T., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M.A., von Figura K. 1998. Posttranslational formation of formylglycine in Prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 25560-25564.
- Dilkes N.B., Jones L.D., Farrar J.F. 2004. Temporal dynamic of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology*. 134: 706-715.
- Dionisi H.M., Harms G., Layton A.C., Gregory I.R., Parker J., Hawkins S.A., Robinson K.G., Saylor G.S. 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6597-6604.
- Dodgson K.S., White G.F., Fitzgerald J.W. 1982. Sulfatases of microbial origin. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. Vol. 1. pp 103-169.
- Dubuis P.H., Marazzi C., Städler E., Mauch F. 2005. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *Journal of Phytopathology*. 153: 27–36.
- Dubuis P.H. 2004. Effect of sulfur deficiency on the resistance of oilseed rape to fungal pathogens and expression profiling of the glutathione Stransferase family of *Arabidopsis thaliana*. Institute of Plant Biology University of Fribourg (Switzerland) Thesis No. 1442. 86 p.
- Duineveld B.M., Kowalchuk G.A., Keijzer A., van Elsas J.D., van Veen J.A. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 172-178.
- Duineveld B.M., Rosado A.S., van Elsas J.D., van Veen J.A. 1998. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4950-4957.
- Dumont M.G., Murrell .C. 2005. Stable isotope probing – linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 499-504.

Commençant par la lettre

E

- Eichhorn E., van der Ploeg J.R., Kertesz M.A., Leisinger T. 1997. Characterization of α -ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherchia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 23031-23036.

- El Azhari N., Bru D., Sarr A., Martin-Laurent F. 2008. Estimation of the density of the protocatechuate-degrading bacterial community in soil by real-time PCR. *European Journal of Soil Science*. 59: 665-673.
- El Azhari N., Chabaud S., Percept A., Bru D., Martin-Laurent F. 2007. *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate-degrading bacterial community in the soil environment. *Pest Management Science*. 63: 459-467.
- Elsgaard L., Vinther F.P. 2004. Modeling of the fine-scale temperature response of arylsulfatase activity in soil. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*. 167: 196-201.
- Eriksen J. 1996. Incorporation of S into soil organic matter in the field as determined by the natural abundance of stable S isotopes. *Biology and Fertility of Soils*. 22: 149-155.
- Eriksen J., Lefroy R.D.B., Blair G.J. 1995. Physical protection of soil organic S studied by extraction and fractionation of soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 1011-1016.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

Commençant par la lettre

F

- Fang Q., Peng J., Dierks T. 2004. Post-translational formylglycine modification of bacterial sulfatases by the radical *S*-Adenosylmethionine protein AtsB. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 14570-14578.
- Felske A., Engelen B., Nübel U., Backhaus H. 1996. Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4162-4167.
- Fernandez M., Kleerebezem M., Kuipers O.P., Siezen R.J., van Kranenburg R. 2002. Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 184: 82-90.
- Fernandez M., van Doesburg W., Rutten G.A., Marugg J.D., Alting R., van Kranenburg R., Kuipers O.P. 2000. Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine β -lyase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 42-48.
- Filoux A., Bally M., Soscia C., Murgier M., Lazdunski A. 1988. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*- like genes. *Molecular and General Genetics*. 212: 510-513.

- Fitzgerald J.W. 1978. Naturally occurring organosulfur compounds in soil. *In*: Nriagu J.O. (Ed.), Sulfur in the environment, part 2. John Wiley and Sons, New York, pp. 391-443.
- Fitzgerald J.W., George J.R. 1977. Localization of arylsulfatase in *Pseudomonas* C12B. *Applied and Environmental Microbiology*. 34: 107-108.
- Fitzgerald J.W., Laslie W.W. 1975. Loss of primary alkylsulfatase and secondary alkylsulfatases (S-1 and S-2) from *Pseudomonas* C12B: effect of culture conditions, cell-washing procedures, and osmotic shock. *Canadian Journal of Microbiology*. 21:59-68.
- Fitzgerald J.W., Milazzo F.H. 1975. Further studies on the heterogeneity of arylsulfatase from *Proteus rettgeri* and some properties of one chromatographic form of the enzyme. *The International Journal of Biochemistry*. 6: 769-774.
- Fitzgerald J.W., Milazzo F.H. 1970. Arylsulfatase multiplicity in *Proteus rettgeri*. *Canadian Journal of Microbiology*. 16: 1109-1115.
- Floyd R.A., Ohlrogge A.J. 1970. Gel formation on nodal root surfaces of *Zea mays*. I. Investigation of the gel's composition. *Plant and Soil*. 33: 331-341.
- Foster R.C. 1985. The biology of the rhizosphere. *In*: Ecology and management of soil borne plant pathogens. Parker C.A, Moore K.J., Wong P.T.W., Rovira A.D. et Kollmorgen J.K. (Eds.) American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, pp. 75-79.
- Foster R.C. 1982. The fine structure of epidermal cell mucilages of roots. *The New Phytologist*. 91: 727-740.
- Foster R.C., Bowen G.D. 1982. Plant surfaces and bacterial growth: the rhizosphere and rhizoplane. *In*: Mount M.S., Lacy G.H. (Eds) *Phytopathogenic prokaryotes*, vol 1. Academic Press, New York. pp. 159-185.
- Franco B., Meroni G., Parenti G., Levilliers J., Bernard L., Gebbia M., Cox L., Maroteaux P., Sheffield L., Rappold G.A., Andria G., Petit C., Ballabio A.. 1995. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell*. 81: 15-25.
- Freeman C., Liska G., Ostle N.J., Lock M.A., Reynolds B., Hudson J. 1996. Microbial activity and enzymatic decomposition processes following peatland water table draw-down. *Plant and Soil*. 180:121-127.
- Freney J.R. Melville G.E., Williams C.H. 1975. Soil organic matter fractions as sources of plant available sulfur. *Soil Biology & Biochemistry*. 7: 177-183.
- Fromageot C. 1950. Sulfatase. *In*: Summer J.B., Myrbäck K. (Eds). *The enzymes*. Vol. 1. Part 1. Academic Press, New York. pp. 517-526.

- Gadler P., Faber K. 2007. New enzymes for biotransformations : microbial alkyl sulfatases displaying stereo- and enantioselectivity. *TRENDS in Biotechnology*. 25: 83-88.
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1800-1809.
- Glick B.R., Liu C., Ghosh S., Dumbroff E.B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology & Biochemistry*. 29: 1233-1239.
- Goodwin P.H., Li J., Jin S. 2000. Evidence for sulfate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 169-176.
- Gransee A., Wittenmeyer L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences*. 163: 381-385.
- Gray K.A., Pogrebinsky O.S., Mrachko G.T., Xi L., Monticello D.J., Squires C.H. 1996. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnology*. 14: 1705-1709.
- Grayston S.J., Campbell C.D., Bardgett R.D., Mawdsley J.L., Clegg C.D., Ritz K., Griffiths B.S., Rodwell J.S., Edwards S.J., Davies W.J., Elston D.J., Millard P. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology*. 25: 63-84.
- Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 30: 369-378.
- Grayston S.J., Campbell C.D. 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology*. 16: 1031-1038.
- Greaves M.P., Darbyshire J.F. 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biology & Biochemistry*. 4: 443-449.
- Gregory P.J., Atwell B.J. 1991. The fate of the carbon in pulse-labelled crops of barley and wheat. *Plant and Soil*. 136: 205-213.

- Grundy F.J., Henkin T.M. 1998. The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 30: 737-749.
- Grundy C.E., Ayling P.D. 1992. Fine structure mapping and complementation studies of the metD methionine transport system in *Salmonella typhimurium*, *Genetical Research*. 60: 1-6.
- Guckert A., Breish H., Reisinger O. 1975. Interface sol-racine. I. Etude au microscope électronique des relations mucigel-argile-microorganismes. *Soil Biology & Biochemistry*. 7: 241-250.
- Gunderson L.H. 2000. Ecological resilience- in theory and application. *Annual Review Ecology Systematics*. 31: 425-439.
- Gupta V.V.S.R., Germida J.J. 1989. Microbial biomass and extractable sulphate sulfur levels in native and cultivated soils as influenced by air drying and rewetting. *Canadian Journal of Soil Science*. 69: 889-894.
- Gupta V.V.S.R., Germida J.J. 1988. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology & Biochemistry*. 20: 777-786.
- Gürtler V., Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.

Commençant par la lettre

H

- Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Kolmar L., Tümmler B., Heinz D.W., Schubert W.D. 2006. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103: 7631-7636.
- Haichar F.E.Z., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J.I., Prosser J.I., Balesdent J., Heulin T., Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*. 2: 1221-1230.
- Hale M.G., Moore L.D. 1979. Factors affecting root exudation II: 1970-1978. *In Advances in Agronomy*. Brady N.C. (Ed.), Academic Press, London Vol. 31. pp. 93-124.
- Hallin S., Lindgren P.E. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1252-1256.

- Hallman A., Sumper M. 1994. An inducible arylsulfatase of *Volvox carteri* with properties suitable for a reporter-gene system : Purification, characterisation and molecular cloning. FEBS European Journal of Biochemistry. 221: 143-150.
- Hamlen R. Lukezic F., Bloom J. 1972. Influence of age and stage development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. Canadian Journal of Plant Science. 52: 633-642.
- Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. 2004. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. Angewandte Chemie International Edition. 43: 5736-5763
- Harada T., Spencer B. 1964. Repression and induction of arylsulphatase synthesis in *Aerobacter aerogenes*. Biochemistry Journal. 93: 373-378.
- Harada, T., Spencer B. 1962. The effect of sulfate assimilation on the induction of arylsulfatase synthesis in fungi. Biochemical Journal. 82:148-156.
- Harms G., Layton A.C., Dionisi H.M., Gregory I.R., Garrett V.M., Hawkins S.A., Robinson K.G., Sayler G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environmental Science and Technology. 37: 343-351.
- Harris P.J., Northcote D.H. 1970. Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root-tips. Biochemistry Journal. 120: 479-491.
- Helal H.M., Sauerbeck D.R., 1989. Carbon turnover in the rhizosphere. Zeitschrift für Pflanzenzernährung und Bodenkunde. 152: 211-216.
- Helal H.M., Sauerbeck D.R. 1986. Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. Zeitschrift für Pflanzenzernährung und Bodenkunde. 149: 181-188.
- Henry S., Texier S., Hallet S., Bru D., Dambreville C., Chèneby D., Bizouard F., Germon J.C., Philippot L. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. Environmental Microbiology. 10: 3082-3092.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Applied and Environmental Microbiology. 72: 5181-5189.
- Henry S., Baudoin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. Journal of Microbiological Methods. 54: 327-335.
- Hiltner L. 1904. Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie unter besonderer nerücksichtigung der gründung und brache. Arbeiten aus dem Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft. 98: 59-78.

- Hinsinger P., Plassard C., Jaillard B. 2006. Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration*. 88: 210-213.
- Hojati S., Nourbakhsh F. 2006. Enzyme activities and microbial biomass carbon in a soil amended with organic and inorganic fertilizers. *Journal of Agronomy*. 5: 563-579.
- Hoshi M., Moriya T. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea urchins. *Developmental Biology*. 106: 29-38.
- Hsu Y.C. 1965. Detergent-splitting enzyme from *Pseudomonas*. *Nature*. 207: 385-388.
- Hummerjohann J., Kuttel E., Quadroni M., Ragaller J., Leisinger T., Kertesz M.A. 1998. Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 141: 1375-1386.
- Hryniewicz M.M., Kredich N.M. 1991. The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: Characterization of two binding sites for CysB protein, studies of *in vivo* transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *Journal of Bacteriology*. 173: 5876-5886.

Commençant par la lettre

I

- Inada T., Kimata K., Aiba H. 1996. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to Cells*. 1: 293-301.
- Iwanicka-Nowicka R., Zielak A., Cook A.M., Thomas M.S., Hryniewicz M.M. 2007. Regulation of sulphur pathways in *Burkholderia cenocepacia*: Identification of transcription factors CysB and SsuR and their role in control of target genes. *Journal of Bacteriology*. 189: 1675-1688.
- Iwanicka-Nowicka R., Hryniewicz M.M. 1995. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli cys* regulon. *Gene*. 166: 11-17.

Commençant par la lettre

J

- Jansen H.J., Hart C.A., Rhodes J.M., Saunders J.R., Smalley J.W., 1999. A novel mucin-sulphatase activity found in *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 48: 551-557.

- Jenkins M.B., Franzluebbers A.J., Humayoun S.B. 2006. Assessing short-term responses of prokaryotic communities in bulk and rhizosphere soils to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*. 289: 309-320.
- Jones D.L., Hodge A., Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *The New Phytologist*. 163: 459-480.
- Jones D.D., Morre D.J. 1973. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. III. Control by Exogenous Sugars. *Physiologia Plantarum*. 29: 68-75.

Commençant par la lettre

K

- Kadner R.J., Watson W.J. 1974. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems. *Journal of Bacteriology*. 119: 401-409.
- Kahnert A., Kertesz M.A. 2000. Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *The Journal of Biological Chemistry*. 41: 31661-31667.
- Kahnert A., Mirleau P., Wait R., Kertesz M.A. 2002. The LysR-type regulator is involved in soil survival and sulphate ester metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*. 4: 225-237.
- Kandeler E., Kampichler C., Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biological and Fertility of Soils*. 23: 299-306.
- Kertesz M.A. 2001. Bacterial transporters for sulphate and organosulfur compounds. *Research in Microbiology*. 152: 279-290.
- Kertesz M.A. 1999. Riding the sulfur cycle - Metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 135-175.
- Kertesz M.A., Cook A.M., Leisinger T. 1994. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiological Reviews*. 15: 195-215.
- Kertesz M.A., Leisinger T., Cook A.M. 1993_a. Protein Induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 175: 1187-1190.
- Kertesz M.A., Kölbener P., Stockinger H., Cook A.M. 1993_b. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 60: 2296-2303.

- Kim D.H., Kim B., Kim H.S., Sohng I.S., Kobashi K. 1994. Sulfation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17:1326-1328.
- King J.E., Quinn J.P. 1997. The utilization of organosulphonates by soil land freshwater bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 474-478.
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. 2000. rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1328-1333.
- Klein D.A., Frederick B.A., Biodini M., Trlica M.J. 1988. Rhizosphere micro-organisms effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil*. 110: 19-25.
- Klose S., Ajwa H.A. 2004. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1625-1635.
- Klose S., Wernecke K.D., Makeschin F. 2004. Microbial activities in forest soils exposed to chronic depositions from a lignite power plant. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 1913-1923.
- Klose S., Moore J.M., Tabatabai M.A. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*. 29: 46-54.
- Knauff U., Schulz M., Scherer H.W. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*. 19: 215-223.
- Knee E.M., Gong F.C., Gao M.S., Teplitski M., Jones A.R., Foxworthy A., Mort A.J., Baur W.D. 2001. Root mucilage from pea and its utilisation by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 14: 315-322.
- Knights J.S., Zhao F. J., McGrath S.P., Magan N. 2001. Long-term effects of land use and fertiliser treatments on sulphur transformations in soils from the Broadbalk experiment. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1797-1804.
- Kowalchuk G.A., Buma D.S., de Boer W., Klinkhamer P.G.L., van Veen J.A., 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *AV Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 81: 509-520.
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H. 1984. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*. 16: 315-322.
- Kredich, N.M. 1996. Biosynthesis of cysteine. *In*: Neidhart F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Umberger K.B. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*: Cellular and molecular biology, American Society for Microbiology Press, Washington D.C. pp. 514-527.

- Kredich N.M. 1992. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhirium* and *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 6: 2747-2753.
- Kredich N.M. 1971. Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth on varying sulphur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 246: 3474-3484.
- Kuske C.R., Ticknor L.O., Miller M.E., Dunbar J.M., Davis J.A., Barns S.M., Belnap J. 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1854-1863.
- Kuzyakov Y., Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163: 421-431.

Commençant par la lettre

L

- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F., Lemanceau P. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2449-2456.
- Le Roux X., Poly F., Currey P., Commeaux C., Hai B., Nicol G.W., Prosser J.I., Schloter M., Attard E., Klumpp K. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *The ISME Journal*. 2: 221-232.
- Lemanceau P., Samson R., Alabouvette C. 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies.XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*. 8: 243-249.
- Liebner S., Rublack K., Stuehrmann T., Wagner D. 2009. Diversity of aerobic methanotrophic bacteria in a permafrost active layer soil of the Lena delta, Siberia. *Microbial Ecology*. 57: 25-35.
- Lorenz E., Stauffer G.V. 1996. MetR-mediated repression of the *glyA* gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 144: 229-233.
- Lu Y., Rosencrantz D., Liesack W., Conrad R. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology*. 8: 1351-1360.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C. 1999. What make *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*. 1: 9-13.
- Lynch J.M., Whipps J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 129: 1-10.

López-Gutiérrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G., Philippot L. 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 57: 339-407.

Commençant par la lettre

M

Malhi S.S., Gan Y., Raney J.P. 2007. Yield, seed quality, and sulfur uptake of *Brassica* oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal*. 99: 570-577.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Vol. 3 pp A2.2.

Mansilla M.C., de Mendoza D. 2000. The *Bacillus subtilis cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology*. 146: 815-821.

Marcial-Gomes N.C., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N.G., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3758-3766.

Mares R., Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1992. Regulation of the *Salmonella typhimurium metA* gene by the MetR protein and homocysteine. *Journal of Bacteriology*. 174: 390-397.

Marilley J., Aragno M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*. 13: 127-136.

Marschner P., Crowley D., Yang C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*. 261: 199-208.

Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1437-1445.

Martin J.K. 1978. Biology of the rhizosphere. *In: Microbial Ecology*. Loutit M.W. Miles J.A.R. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 685-692.

Martin J.K. 1977. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. *Soil Biology & Biochemistry*. 9: 1-7.

Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C. Soulas G., Catroux G. 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2354-2359.

- Marzluf G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annual Reviews of Microbiology*. 51: 73-96.
- Marzluf G.A. 1994. Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in fungi. *Advances in Genetics*. 31: 187-206.
- Matula J., Pechova M. 2002. Sulfur and sulphate concentrations in leaves of oilseed rape under field conditions. *Rostlinná Výroba*. 48: 433-440.
- Maxon M.E., Redfield B., Cai X.Y., Shoeman R., Fujita. K., Fisher W., Stauffer G.V., Weissbach H., Brot N. 1989. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*: effect of the MetR protein on the expression of the *metE* and *metA* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 85-89.
- Maynard D.G., Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1984. Sulfur cycling in grassland and parkland soils. *Biogeochemistry*. 1: 97-111.
- Mazel D., Marliere P. 1989 Adaptive eradication of methionine and cysteine from bacterial light-harvesting proteins. *Nature*. 341: 245-248.
- Mc Donald N.W., Zak D.R., Pregitzer K.S. 1995. Temperature effects on kinetics of microbial respiration and net nitrogen and sulfur mineralization. *Soil Science Society American Journal*. 59: 233-240.
- Mc Gill W.B., Cole C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*. 26: 267-286.
- McLaren R.G., Kerr J.I., Swift R.S. 1985. Sulphur transformations in soils using sulphur-35 labelling. *Soil Biology & Biochemistry*. 17: 73-79.
- Meharg A.A., Killham K. 1988. A comparison of carbon flow from pre-labelled and pulse-labelled plants. *Plant and Soil*. 112: 225-231.
- Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 162: 787-796.
- Merrien A. 1996. Apport de soufre sur colza d'hiver^o: un délicat compromis entre rendement et qualité. *Perspectives agricoles*. 210 : 72-74.
- Miah M.Y., Kanazawa S., Chiu C.L. Hayashi H., Chino M. 2000. Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. *Soil Sciences and Plant Nutrition*. 46: 787-796.
- Miethling R., Wieland G., Backhaus H., Tebbe C.C. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L 33. *Microbiology Ecology*. 40: 43-56.

- Misko A.L., Germida J.J. 2002. Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the root of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*. 42: 399-407.
- Mitsunaga-Nakatsubo K., Akasaka K., Akimoto Y., Akiba E., Kitajima T., Tomita M., Hirano H., Shimada H. 1998. Arylsulfatase Exists as Non-Enzymatic Cell Surface Protein in Sea Urchin Embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 280: 220–230.
- Mol L. 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. II. Quantitative analysis of the luring effect of crops. *European Journal of Plant Pathology*. 101: 679-685.
- Morel J.L. Habib L., Plantureux S., Guckert A. 1991. Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant and Soil*. 136: 111-119.
- Morre D.J., Jones D.D., Mollenhauer H.H. 1967. Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of *Zea mays*. I. Kinetics and secretory pathway. *Planta*. 74. 286-301.
- Mougel C., Offre P., Corberand T., Robin C., Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn cv. Jemalong J5. *The New Phytologist*. 170: 165-175.
- Mougous J.D., Green R.E., Williams S.J.B., Brenner S.E., Bertozzi C.R. 2002. Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chemistry & Biology*. 9: 767-776.
- Mounier E., Hallet S., Chèneby D., Benizri E., Gruet Y., Nguyen C., Piutti S., Robin C., Slezaack-Deschaumes S., Martin-Laurent F., Germon J.C., Philippot L. 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology*. 6: 301-312.
- Müller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levnikov V.M., Fogg M.J., Wilson K.S., Wilkinson A.J. 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Molecular Microbiology*. 57: 143-155.
- Muller S., Schmidt A. 1986. Substrate-dependent arylsulfatase activity in the cyanobacterium *Plectonema* 73110. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C, Biosciences*. 41: 820-824.
- Murooka Y., Azakami H., Yamashi M. 1996. The monoamine regulon including syntheses of arylsulfatase and monoamine oxidase in bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60: 935-941.
- Murooka Y., Ishibashi K., Yasumoto M., Sasaki M., Sugino H., Azakami H., Yamashi M. 1990. A sulfur- and tyramine- regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene. *Journal of Bacteriology*. 172: 2131-2140.
- Murooka Y., Adachi T., Okamura H., Harada T. 1977. Genetic Control of Arylsulfatase Synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 130: 74-81.

Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127–141.

Commençant par la lettre

N

Ndiaye E.L., Sandeno J.M., Mc Grath D., Dick R.P. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*. 15: 26-36.

Nguyen C. 2007. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour la plante. Ecole Doctorale Ressources, Produits, Procédés, Environnement, Habilitation à Diriger des Recherches, Nancy. 136 pp..

Nguyen C., Todorovic C., Robin C., Christophe A., Guckert A. 1999. Continuous monitoring of rhizosphere respiration after labelling of plant shoots with $^{14}\text{CO}_2$. *Plant and Soil*. 212: 191-201.

Nicholls R.G., Roy A.B. 1971. Arylsulfatases. *In* : The Enzymes. Boyer, P.D., (Ed.) Academic, New York. Oades. Vol 5. pp. 21-41.

Norton J.M., Firestone M.K. 1991. Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of Ponderosa pine seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*. 22: 449-455.

Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., McNicol J.W., Prosser J.I. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6784-6792.

Commençant par la lettre

O

Oades J.M. 1977. Mucilages at the root surface. *European Journal of Soil Science*. 29: 1-16.

Okano Y., Hristova K.R., Leutenegger C.M., Jackson L.E., Denison R. F., Gebreyesus B., Lebauer D., Scow K.M. 2004. Application of real-time PCR to study effects of Ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1008-1016.

Osborn A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant and Cell*. 8: 1821-1831.

- Osteras M., Boncompagni E., Vincent N., Poggi M.C., LeRudulier D. 1998. Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95: 11394-11399.
- Ostrowski J., Kredich N.M. 1990 *In vitro* interactions of CysB protein with the *cysJIIH* promoter of *Salmonella typhimurium*: iInhibitory effects of sulfide. Journal of Bacteriology. 172: 779-785.
- Ostrowski J., Kredich N.M. 1989. Molecular characterization of the *cysJIIH* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by CysB protein and *N*-acetyl-L-serine. Journal of Bacteriology. 171: 130-140.

Commençant par la lettre

P

- Paietta J.V. 1989. Molecular cloning and regulatory analysis of the arylsulfatase structural gene of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology. 9: 3630-3637.
- Parenti G., Meroni G., Ballabio A. 1997. The sulfatase gene family. Current Opinion in Genetics and Development. 7: 386-391.
- Paterson E., Thornton B., Midwood A.J., Osborne S.M., Sim A., Millard P. 2008. Atmospheric CO₂ enrichment and nutrient additions to planted soil increase mineralization of soil organic matter, but do not alter microbial utilisation of plant- and soil C- sources. Soil Biology & Biochemistry. 40: 2434-2440.
- Paterson E., Sim A. 2000. Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. Journal of Experimental Botany. 51: 1449-1457.
- Paterson E., Sim A. 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. Plant and Soil. 216: 155-164.
- Philippot L., Kuffner M., Cheneby D., Depret G., Laguerre G., Martin-Laurent F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. Plant and Soil. 287: 177-186.
- Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Hallet S., Germon J.C. 2002. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize planted soil. Applied and Environmental Microbiology. 68: 6121-6128.
- Picard C., Frascaroli E., Bosco M. 2004. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbred lines and their hybrid. FEMS Microbiology Ecology. 49: 207-215.

- Piceno Y.M., Lovell C.R. 2000_a. Stability in natural bacterial communities. I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*. 39: 32-40.
- Piceno Y.M., Lovell C.R. 2000_b. Stability in natural bacterial communities. II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology*. 39: 41-48.
- Piutti S., Cregut M., Slezack-Deschaumes S., Crovisier I., Vong P.C., Benizri E. A selective differential medium for detection and enumeration of arylsulfatase bacteria in soil (en preparation).
- Poly F., Monrozier L.J., Bally R. 2000. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*. 152: 95-103.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 1999. *Microbiologie* (3ème Eds). DeBoeck Université (Ed.) Bruxelles Belgique. 1014 pp..

Commençant par la lettre

Q

- Qiu X.Y., Hurt R.A., Wu L.-Y., Chen C.-H., Tiedje J.M., Zhou J.-Z. 2004. Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 59: 199-210.
- Quadroni M., James P., Dainese-Hatt P., Kertesz M.A. 1999. Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulphate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 266: 986-996.
- Quadroni M., Staudenmann W., Kertesz M.A., James P. 1996. Analysis of global response by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis : Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 239: 773-781.
- Quan J.A., Schneider B.L., Paulsen I.T., Yamada M., Kredich N.M., Saier Jr M.H. 2002. Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. 148: 123-131.
- Quian J.H., Doran J.W. 1996. Available C released from crop roots during growth as determined by C-13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal*. 14: 828-831.

- Rammler D.H., Grado C., Fowler L.R. 1964. Sulfur metabolism of *Aerobacter aerogenes*. I. A repressible sulfatase. *Biochemistry*. 3: 224-230.
- Ranjard L., Lejon D.P.H., Mougél C., Scherer L., Merdinoglu D., Chaussod R. 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprint analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*. 5: 1111-1120.
- Roberts R.B., Abelson P.H., Cowie D.B., Bolton E.T., Britten R.J. 1955. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Institution Washington DC, 521 pp.
- Rousseaux S., Hartmann A., Soulas G. 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 211-222.
- Rouzaud G., Rabot S., Ratcliffe B., Duncan A.J. 2003. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*. 90: 395-404.
- Rovira A.D. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pesticide Science*. 4: 361-366.
- Rovira A.D. 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review*. 35: 35-55.
- Roy A.B. 1960. The synthesis and hydrolysis of sulfate esters. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. 22: 205-35.

- Saggar S., Bettany J.R., Stewart J.W.B. 1981. Measurement of microbial sulphur in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 13: 493-498.
- Saint-Girons I., Parsot C., Zakin M.M., Bârză O., Cohen G.N. 1988. Methionine biosynthesis in Enterobacteriaceae: Biochemical, regulatory, and evolutionary aspects. *Critical Reviews in Biochemistry*. 23: 1-42.
- Sands D.C., Rovira A.D. 1971. *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizosphere. *Journal of Applied Bacteriology*. 34: 261-275.

- Sardiello M., Annunziata I., Roma G., Ballabio A. 2005. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*. 14: 3203-3217.
- Scherer H.W. 2001. Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy*. 14: 81-111.
- Schirmer A., Kolter R. 1998. Computational analysis of bacterial sulfatases and their modifying enzymes. *Chemistry & Biology*. 5: 181-186.
- Schmalenberger A., Kertesz M.A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. *Environmental Microbiology*. 9: 535-545.
- Schmalenberger A., Hodge S., Hawkesford M.J., Kertesz M.A. 2009. Sulfonate desulfurization in *Rhodococcus* from wheat rhizosphere communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 67: 140-150.
- Schmalenberger A., Hodge S., Bryant A., Hawkesford M.J., Singh B.K., Kertesz M.A. 2008_a. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environmental Microbiology*. 10: 1486-1500.
- Schmalenberger A., Tebbe C.C., Kertesz M.A., Drake H.L., Küsel K. 2008_b. Two-dimensional single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene fragments reveals highly dissimilar bacterial communities in an acidic fen. *European journal of Soil Biology*. 44: 495-500.
- Schnug E. 1997. Significance of sulphur for the nutritional and technological quality of domesticated plants. In Cram W.J., De Kok L.J., Stulen I., Brunold C., Rennenberg H. (Eds). *Sulfur metabolisms in higher plants - molecular, ecophysiological and nutritional aspects*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp.109-130.
- Schönwitz R., Ziegler H. 1989. Interactions of maize roots and rhizosphere microorganisms. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152: 217-222.
- Schönwitz R., Ziegler H. 1982. Exudation of water-soluble vitamins and of some carbohydrates by intact roots of maize seedlings (*Zea mays* L.) into a mineral nutrient solution. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 107: 7-14.57.
- Scott W.A., Metznerberg R.L. 1970. Location of aryl sulfatase in conidia and young mycelia of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 104: 1254-1265.
- Seitz A.P., Leadbetter E.R., Godchaux I.W. 1993. Utilization of sulfonates as sole sulfur source by soil bacteria including *Comamonas acidovorans*. *Archives of Microbiology*. 159: 440-444.
- Sessitsch A., Gyamfi S., Stralis-Pavese N., Weilharter A., Pfeifer U. 2002. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods*. 51: 171-179.

- Siciliano S.D., Germida J.J. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology*. 29: 263-272.
- Siciliano S.D., Theoret C.M., De Freitas J.R., Huel P.J., Germida P.J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 844-851.
- Simon-Sylvestre G. 1969. Les sulfates solubles du sol. *Annales Agronomiques*. 25: 645-653.
- Singh B.K., Munro S., Potts J.M., Millard P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology*. 36: 147-155.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4742-4751.
- Smit E., Leeftang P., Gommans S., Van Den Broek J., Van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
- Sommer K., Sudau M., Kasten P. 1986. Stichprobenuntersuchungen zur Schwefelversorgung des Weizens in Nordhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. *Kali-Briefe (Büntehof)*. 18: 1-12.
- Steer J., Harris J.A. 2000. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biology & Biochemistry*. 32: 869-878.
- Stevenson F.J., Cole M.A. 2005. The sulfur cycle. *In*: Stevenson F.J., Cole M.A. (Eds) . *Cycle of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Wiley J. and Sons, New York. pp. 333-335.
- Stevenson F.J., Cole M.A. 1999. The sulfur cycle. *In*: Stevenson F.J., Cole M.A. (Eds) . *Cycle of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Wiley J. and Sons, New York. pp. 340-348.
- Stewart J.W.B. 1984. Interrelation of carbon, nitrogen, sulfur, and phosphorus cycles during decomposition processes in soil. *In*: Reddy, C.A., Klug, M.J. (Eds). *Current Perspectives in Microbial Ecology*. Proceedings of the 3rd International Symposium, American Society of Microbiology, Washington DC. pp. 442-446.
- Stewart J.W.B., Bettany J.R. 1982. Dynamics of soil organic phosphorus and sulfur. 12th International Congress of Soil Science, New Dehli, India. p14.

- Stults J.R., Snoeyenbos-West O., Methe B., Lovley D.R., Chandler D.P. 2001. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2781-2789.
- Suhardi. 1992. Importance du soufre organique du sol dans la nutrition soufrée du blé (*Triticum aestivum* L.). Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France, pp. 147.
- Swinnen J., van Veen J.A., Merckx R. 1994. Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: model calculations based on ¹⁴C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biology & Biochemistry*. 27: 211-217.
- Szameit C., Miech C., Balleininger M., Schmidt B., von Figura K., Dierks T. 1999. The iron sulfur protrein AtsB is required for a posttranslational formation of formylglycine in the *Klebsiella* sulfatase. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 2071-2076.

Commencant par la lettre

T

- Tabatabai M.A. 1996. Sulphur. *In*: Sparks D.L. (Ed). *Methods of soil Analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Science Society of America. Book Madison. Series 5. pp. 921-960.
- Tabatabai M.A. 1994. Soil enzymes. *In*: Weaver R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicsek D., Smith S., Tabatabai A., Wollum A. (Eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America. Book Madison. Series 5. pp. 775-833
- Tabatabai M.A. 1984. Importance of sulphur in crop production. *Biogeochemistry* 1: 45-62.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970_a. Forms of sulfur and carbon, nitrogen and sulfur relationships in Iowa soils. *Soil Science*. 114: 380-386.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1970_b. Arylsulfatase activity in soils. Factors affecting arylsulfatase activity. *Proceedings - Soil Science Society of America*. 34: 225-229.
- Tarafdar J.C., Jungk A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*. 3: 199-204.
- Thioulouse J., Chessel D., Dolédec S., Olivier J. M.. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistic and Computing*. 7: 75-83.
- Thomas O.R.T., Matts P.J., White G. 1988. Localization by electron microscopy of alkylsulphatases in bacterial cells. *Journal of General Microbiology*. 134:1229-1236.

- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Tierens K.F.M.J., Bart T.P.H.J., Brouwer M., Schmidt J., Kistner K., Porzel A., Mauch-Mani B., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology*. 125: 1688-1699.
- Tomioka H., Saito H., Katsumasa S., Dawson D.J. 1990. Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2104-2106.
- Traoré O., Groleau-Renaud V., Plantureux S., Tubeileh A., Boeuf-Tremblay V. 2000. Effect of root mucilage and modelled root exsudates on soil structure. *European Journal of Soil Science*. 51: 575-581.
- Tscherko D., Kandeler E. 1997. Ecotoxicological effects of fluorine deposits on microbial biomass enzyme activity in grassland. *European Journal of Soil Society*. 3: 329-335.
- Tubeileh A., Groleau-Renaud V., Plantureux S., Guckert A. 2003. Effect of soil compaction on photosynthesis and carbon partitioning within a maize-soil system. *Soil and Tillage Research*. 71: 151-161.

Commençant par la lettre

U

- Udiković Kolić N., Martin-Laurent F., Devers M., Petrić I., Begonja Kolar A., Hršak D. 2008. Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from a herbicide factory effluent. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 1334-1343.
- Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1989. Genetic and biochemical analysis of the MetR activator-binding site in the *metE metR* control region of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 171: 5620-5629.
- Urbanowski M.L., Stauffer G.V. 1987. Regulation of the *metR* gene of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 169: 5841-5844.
- Uren N.C. 1993. Mucilage secretion and its interaction with soil, and contact reduction. *Plant and Soil*. 155/156: 79-82.

Commençant par la lettre

V

- van den Bogaard P.T.C., Kleerebezem M., Kuipers O.P., de Vos W.M. 2000. Control of lactose transport, β -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *Journal of Bacteriology*. 182: 5982-5989.
- van Veen J.A., Merckx R., van de Geijn C. 1989. Plant- and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant and Soil*. 115: 197-188.
- Vermeij P., Kertesz M.A. 1999. Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*. 181: 5833-5837.
- Vermeij P., Wietek C., Kahnert A., Wüest T., Kertesz M.A. 1999. Genetic organization of sulfur-controlled aryl desulfonation in *Pseudomonas putida* S-313. *Molecular Microbiology*. 32: 913-926.
- Vis H., Goujard O. 2005. Comprendre la place du soufre dans la fertilisation. 7èmes rencontres COMIFER/GEMAS.
- Vong P.C., Piutti S., Slezack-Deschaumes S., Benizri E., Guckert A. 2008. Sulphur immobilization and arylsulphatase activity in two calcareous arable and fallow soils as affected by glucose additions. *Geoderma*. 148: 79-84.
- Vong P.C., Nguyen C., Guckert A., 2007_a. Fertilizer sulphur uptake and transformations in soil as affected by plant species and soil type. *European Journal of Agronomy*. 27: 35-43.
- Vong P.C., Piutti S., Benizri E., Slezack-Deschaumes S., Robin C., Guckert A. 2007_b. Water-Soluble carbon in roots of rape and barley: impacts on labile soil organic carbon, arylsulfatase activity and sulphur mineralization. *Plant and Soil*. 294: 19-29.
- Vong P.C., Dedourge O., Guckert A. 2004. Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. *Plant and Soil*. 258: 227-239.
- Vong P.C., Dedourge O., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 1651-1661.
- Vong P. C., Lasserre-Joulin F., Guckert A. 2002. Mobilization of labeled organic sulfur in rhizosphere of rape and barley and in non-rhizosphere soil. *Journal of Plant Nutrition*. 25: 2191-2204.

- Wanner B.L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *In*: Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaetetcher M., Umberger H.E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2nd Ed. ASM Press. Washington DC. pp. 1357-1381.
- Wardle D.A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews*. 67: 312–358.
- Warembourg F.R. 1975. Applications de techniques radioisotopiques à l'étude de l'activité biologique dans la rhizosphère des plantes. *Revue d'Ecologie et de Biologie des Sols*. 12: 261-272.
- Warembourg F.R., Estelrich H.D. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 1291-1303.
- Warembourg F.R., Paul E.A. 1977. The use of C¹⁴O₂ canopy techniques for measuring carbon transfer through the plant–soil system. *Plant and Soil* 38: 331–345.
- Waschütza S., Hofman N., Nieman E.G., Fendrich I. 1992. Investigations on root exsudates of Korean rice. *Symbiosis*. 13: 181-189.
- Watwood M.E., Fitzgerald J.W., Gosz J.R. 1986. Sulfur processing in forest soil and litter along an elevational and vegetative gradient. *Canadian Journal of Forest Research*. 16:689-695.
- Weissbach H., Brot N. 1991. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 5:1593-1597.
- Wheatley R., Ritz K., Griffiths B. 1990. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. *Plant and Soil*. 127:157-167.
- Whipps J.M. 1990. Carbon economy. *In*: Lynch J.M. Mitchell J.M. (Eds) *The Rhizosphere*. Wiley J. and Sons. Chichester. pp. 59-97.
- Whipps J.M. 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedlings grown in soil. *Plant and Soil*. 103: 95-100.
- Whipps J.M., Lynch J.M. 1983. Substrate flow and utilization in the rhizosphere of cereals. *The New Phytologist*. 95: 605-623.
- Whitehead J.E.M., Morrison A.R., Young L. 1952. Bacterial arylsulfatase. *Biochemical Journal*. 51: 585-594.
- Whiteley G.M., Dexter A.R. 1984. Displacement of soil aggregates by elongating roots and emerging shoots of crop plants. *Plant and Soil*. 77: 131-140.

Wu J., O'Donnell A.G., He Z.L., Syers J.K. 1994. Fumigation – extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biology & Biochemistry*. 26: 117-125.

Wyss C. 1989. *Campylobacter-Wolinella* group organisms are the only oral bacteria that form arylsulfatase-active colonies on a synthetic indicator medium. *Infection and Immunity*. 57: 1380-1383.

Commençant par la lettre

X

Xu J.G., Juma N.G. 1993. Above-and below-ground transformation of photosynthetically fixed carbon by two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in a typic cryoboroll. *Soil Biology & Biochemistry*. 25: 1263-1272.

Commençant par la lettre

Y

Yamada K., Akasaka K., Shimada H. 1989. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene. *FEBS European Journal of Biochemistry*. 186: 405-410.

Yamada T., Murooka Y., Harada T. 1978. Comparative immunological studies on arylsulfatase in bacteria of the family Enterobacteriaceae: occurrence of latent arylsulfatase protein regulated by sulfur compounds and tyramine. *Journal of Bacteriology*. 133: 536-541.

Yang C.H., Crowley D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 345-351.

Yevdomikov I., Ruser R., Buegger F., Marx M., Munch J.C. 2006. Microbial immobilisation of ¹³C rhizodeposits in rhizosphere and root-free soil under continuous ¹³C labelling of oats. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 1202-1211.

Young M. 1998. Biophysical interactions at the root–soil interface: a review. *The Journal of Agricultural Science*. 130: 1-7.

Commençant par la lettre

Z

- Zagal E. 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a soil-plant system with barley (*Hordeum vulgare* L.), ryegrass (*Lolium perenne*) and rape (*Brassica napus* L.) grown in a ¹⁴CO₂-atmosphere. *Plant and Soil*. 166: 63-74.
- Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry*. 26: 1101-1108.
- Zhang H.-B., Yang M.-X., Shi W., Zheng Y., Sha T., Zhao Z.-W. 2007. Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium. *Microbial Ecology*. 54: 705-712.
- Zhang Y., Dong J., Yang Z., Zhang S., Wang Y. 2008. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Archives of Microbiology*. 190: 19-28.
- Zhao F.J., Lehmann J., Solomon D., Fox M.A., McGrath S.P. 2006. Sulphur speciation and turnover in soils: evidence from sulphur K-edge XANES spectroscopy and isotope dilution studies. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 1000-1007.
- Zhao F.J., McGrath S.P., Blake-Kalf M.M.A., Link A., Tucker M. 2002. Crop responses to sulphur fertilisation in Europe. *Proceedings N° 504, International Fertiliser Society, York, UK*. 27 p.
- Zhao F.J., McGrath S.P., Hawkesford M.J. 2001. Sulphur nutrition and the sulphur cycle. Available at: Institute of Arable Crop. Research Report. 2000-2001.
- Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science*. 30: 1-17.
- Zhao F.J., Withers P.J.A., Evans E.J., Monaghan J., Salmon S.E., Shewry P.R., McGrath S.P. 1997. Sulphur nutrition : An important factor for the quality of wheat and rapeseed. *Soil Science and Plant Nutrition*. 43: 1137-1142.
- Zhao F.J., Hawkesford M.J., Warrilow A.G.S., McGrath S.P., Clarkson D.T. 1996. Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant and Soil*. 181: 317-327.
- Zürrer D., Cook A.M., Leisinger T. 1987. Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 1459-1463.

Annexes

Sommaire des Figures

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

- Figure 1* : Emissions de SO₂ dans l'air en France métropolitaine (CITEPA, 2008) **p 23**
- Figure 2* : Proportions des différentes formes de soufre dans les lacs (David et Mitchell, 1985), les prairies (Watwood et al., 1986) et les sols forestiers (Autry et Fitzgerald, 1990), (sulfates : en blanc, sulfonates : en gris clair, esters de sulfate : en gris foncé, acides aminés soufrés : en noir. Dans le cas des lacs, les acides aminés et les sulfonates sont représentés en gris clair) **p 26**
- Figure 3* : Représentation du cycle du soufre dans le sol (Brady, 1974) **p 27**
- Figure 4* : Voie de l'assimilation et de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine. Les noms des enzymes sont suivis par les noms probables des gènes chez *Bacillus subtilis* ; les homologues chez *Escherichia coli* figurent entre parenthèses lorsqu'ils diffèrent. Les flèches nommées S représentent les gènes issus de la S box family (Grundy et Henkin, 1998) **p 30**
- Figure 5* : Voie de la biosynthèse de la méthionine chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ; les homologues de ces gènes, chez *Bacillus subtilis*, sont soulignés. L'activation des gènes est provoquée par CysB (^{+B}) et MetR (^{+R}), alors que la répression de l'expression est exercée par MetJ (⁻). Il est à noter que la conversion de la cystathionine en cystéine n'est pas décrite chez *Escherichia coli* CBL, ni chez *Salmonella typhimurium*, alors que cette réaction est obtenue in vitro chez *Bacillus subtilis* (Fernandez et al., 2002) **p 32**
- Figure 6* : Assimilation du soufre au sein de la cellule bactérienne, lors d'une situation de carence en soufre minéral **p 35**
- Figure 7* : Représentation du pool de soufre organique dans les sols **p 36**
- Figure 8* : Mécanisme proposé par Kertesz (1999) dans le cas de la désulfonation des alcanesulfonates. La Flavine mononucléotide (FMN) est réduite par une FMN réductase utilisant le NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide réduite) ou le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme donneur d'électron. La FMNH agit alors comme co-substrat dans le processus de désulfonation par les protéines SsuD ou MsuD qui produisent l' α -hydroxysulfonate qui décompose le produit en aldéhyde et libère du sulfite **p 37**
- Figure 9* : Comparaison de la voie de désulfuration par *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gray et al., 1996) et *Pseudomonas putida* S-313 (Vermeij et al., 1999). Concernant *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, le soufre du thiophène est oxydé en 2 étapes. Dans un premier temps, une DBT-monoxygénase produit du DBT-dioxyde qui par la suite est clivée par une DBT-dioxyde monoxygénase en 2-(2-

hydroxyphényl)benzènesulfonate (HPBS). Puis, le groupement sulfinat est finalement libéré par une HPBS sulfinase, cette seconde étape oxygénolytique est produite par une FMN réductase (DszD). Concernant, *Pseudomonas putida* S-313, les protéines AtsBC sont impliquées dans le transport du sulfonate. Puis, les protéines SsuDE sont impliquées dans le clivage du sulfinat encore une fois par une réaction oxygénolytique **p 38**

Figure 10 : Les différents mécanismes régulant les sulfatases au sein des procaryotes. Le système anSME présent chez *Klebsiella pneumoniae* semblent apte à minéraliser les 2 types de résidu cible. A l'inverse, le système FGE de *Pseudomonas aeruginosa* et celui d'*Escherichia coli* semble spécifique au résidu Cystéine **p 44**

Figure 11 : Structure des clusters de gènes des sulfatases pour *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997 ; Schirmer et Kolter, 1998) ; *Klebsiella pneumoniae* (Murooka *et al.*, 1990 ; Szameit *et al.*, 1999) ; *Sinorhizobium meliloti* (Osteras *et al.*, 1998) et *Pseudomonas aeruginosa* (Beil *et al.*, 1995). Les ORFs non caractérisés de *Pseudomonas aeruginosa* ont des fonctions de sulfatases hypothétiques obtenus par Blast (Kertesz, 1999). Le gène contenant une sulfatase de type sérine est coloré en noir et ceux encodant une sulfatase de type cystéine sont colorés en gris **p 45**

Chapitre 2. Caractérisation et évolution de la taille et de la structure de la communauté bactérienne totale sous couvert d'orge (*Hordeum vulgare* var. Nickel) et de colza (*Brassica napus* var. Twister)

Figure 1 : Quantification du gène de l'ADNr 16S d'origine bactérienne, pour les sols rhizosphériques sous couvert de colza (barres blanches) et d'orge (barres noires) par gramme de sol. Les barres (n = 5) avec une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0.05$, (Test de Newman Keuls). Les points de prélèvements SR1 correspondent au stade Rosette et Fin de tallage, SR2 : à Boutons accolés et Début Montaison, SR3 : Boutons séparés et Courant Montaison, SR4 : Floraison et Epiaison et enfin SR5 : Fin de floraison et Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge **p 80**

Figure 2 : Quantification du gène de l'ADNr 16S, pour les sols rhizosphériques sous couvert de colza (barres blanches) et d'orge (barres noires). Les barres (n = 5) avec une lettre différente sont significativement différentes à $P < 0.05$, (Test de Newman Keuls). Les points de prélèvements SR1 correspondent au stade Rosette et Fin de tallage, SR2 : à Boutons accolés et Début Montaison, SR3 : Boutons séparés et Courant Montaison, SR4 : Floraison et Epiaison et enfin SR5 : Fin de floraison et Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge **p 82**

Figure 3 : Profil b-RISA (bacterial-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) réalisé à partir de l'ADN extrait des sols rhizosphériques durant la phénologie du colza et de l'orge. Les points de prélèvements correspondent aux stades SRC1: Rosette et SRO1: Fin

de tallage, SRC2 : aux Boutons accolés et SRO2 : Début Montaison, SRC3 : aux stades Boutons séparés et SRO3 : Courant Montaison, SRC4 : aux stades Floraison et SRO4 : Epiaison et enfin SRC5 au stade Fin de floraison et SRO5 Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge **p 84**

Figure 4 : Analyse en Composantes Principales de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza et d'orge. Les points de prélèvements correspondent aux stades SRC1: Rosette et SRO1: Fin de tallage, SRC2 : aux Boutons accolés et SRO2 : Début Montaison, SRC3 : aux stades Boutons séparés et SRO3 : Courant Montaison, SRC4 : aux stades Floraison et SRO4 : Epiaison et enfin SRC5 au stade Fin de floraison et SRO5 Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge (n=5) **p 85**

Figure 5 : Analyses en Composantes Principales de la structure génétique des communautés bactériennes rhizosphériques sous couvert de colza (**A**) et d'orge (**B**). Les points de prélèvements SRC1 et SRO1 correspondent aux stades Rosette et Fin de tallage, SRC2 et SRO2 : aux stades Boutons accolés et Début Montaison, SRC3 et SRO3 : aux stades Boutons séparés et Courant Montaison, SRC4 et SRO4 : aux stades Floraison et Epiaison et enfin SRC5 et SRO5 : aux stades Fin de floraison et Grains laiteux respectivement pour le colza et l'orge (n=5) **p 87**

Chapitre 3. Caractérisation de la communauté bactérienne cultivable minéralisant les esters de sulfate par des approches de microbiologie pasteurienne

Chapitre 3-1. Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate

Figure 1 : Évolution de la densité des bactéries fonctionnelles cultivables au cours de la saison de culture du colza. Les moyennes (n=5) avec différentes lettres sont significativement différentes à $P < 0.05$ **p 104**

Figure. 2. Régression linéaire entre l'activité arylsulfatase en $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1}$ de sol h^{-1} et la densité bactérienne fonctionnelle en log de CFU g^{-1} de sol sec ■ 4 Avril, ◆ 10 Mai, □ 5 juin, ◇ 25 juin. **p 105**

Chapitre 3-2. Densité, structure et diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate dans les rhizosphères d'orge et de colza

Figure 1 : Relation linéaire observée entre l'activité ARS et la densité de la communauté bactérienne fonctionnelle cultivable sous rhizosphère de colza (A) et d'orge (B) au cours des différents stades phénologiques des plantes avec ● correspondant au 21 Mars, ■ correspondant au 19 Avril, ▲ correspondant au 10 Mai et ● correspondant au 5 Juin **p 121**

Figure 2 : Comparaison, par Analyse en Composantes Principales, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère d'orge et de colza, au cours des différents stades de développement des plantes **p 122**

Figure 3 : Comparaison, par Analyse en Composantes Principales, de la structure génétique de la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza (A) et d'orge (B) au cours des différents stades de développement de la plante (les valeurs présentées sont les valeurs moyennes auxquelles est associé l'écart type correspondant pour n=5) **p 123**

Figure 4 : Distribution des OTUs isolées de la rhizosphère de colza (A) et de la rhizosphère d'orge (B) au cours des quatre stades phénologiques de la plante **p 125**

Chapitre 4. Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

Figure 1 : Croissance des microorganismes affiliés à *Streptomyces sp.* (A), *Rhodococcus sp.* PLL-1 (B), *Microbacterium sp.* 5 (C) et *Stenotrophomonas sp.* (D) en présence de différentes sources de soufre (à gauche) et leur activité arylsulfatase respective au cours du temps (à droite). Les différentes sources de soufre utilisées dans cette étude sont : le sulfate (●) ; la cystéine (■) ; la méthionine (▲) ; le *p*-nitrophénylsulfate (▼/_) et le *p*-nitrocatécholsulfate (◆) **p 152**

Chapitre 5. Caractérisation moléculaire de la communauté bactérienne minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

Figure 1 : Alignement à partir de ClustalX, des séquences *atsA* des souches de références, qui ont été utilisées pour dessiner les amorces. Ces séquences sont présentes dans la Genbank et correspondent aux séquences *atsA* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Klebsiella pneumoniae* et *Mycobacterium avium* 104. Les repères sur la figure

correspondent respectivement aux sites ciblés par les amorces *atsAF* (A) et *atsAR* (B) **p 174**

Figure 2 : Alignement des séquences partielles d'*atsA* obtenues à partir de l'amplification par PCR à l'aide des amorces *atsAF* et *atsAR*. L'alignement des séquences a été réalisé par ClustalX et les zones conservées sont annotées : 1, 2 et 3 lorsqu'elles correspondent à une région conservée pour l'ensemble des séquences analysées et sont annotées : A, B, C et D lorsqu'elles correspondent à une région conservée pour certaines séquences analysées **p 182**

Figure 3 : Analyse en Neighbour joining des séquences du gène *atsA* (A) et de l'ADNr 16S (B) au sein des souches bactériennes extraites de sols rhizosphériques. Les valeurs en 'Bootstrap' correspondent à 10000 permutations et sont présentées en pourcentage à chaque noeuds lorsque celles-ci possèdent une valeur supérieure à 75 %. Il est à noter que les séquences arylsulfatases des souches notées : Str.X-X correspondent à l'obtention de plusieurs séquences putatives du gène *atsA* **p 184-185**

Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Figure 1 : Distribution des types RFLP isolés de la rhizosphère de colza pour les stades de développement boutons floraux (■) et floraison (□) **p 204**

Figure 2 : Courbes de raréfaction correspondant aux stades phénologiques boutons floraux (noir) et floraison (en gris) **p 205**

Figure 3 : Relation phylogénétique des séquences en acides aminés des clones *atsA*. Les distances phylogénétiques ont été déterminées par une analyse en neighbour-joining. Enfin, les séquences que nous avons obtenues dans cette étude sont précédées d'un dièse (#) alors que les séquences *atsA* que nous avons précédemment isolées dans le chapitre 4-1 sont notées entre parenthèses **p 208**

Chapitre 6. Conclusion générale et Perspectives

Figure 1 : Présentation des différents scénarii qui pourraient stimuler l'activité arylsulfatase produite par la communauté bactérienne fonctionnelle dans la rhizosphère de colza **p 220**

Figure 2 : Représentation du gène, de 2500pb, de l'unité catalytique de l'arylsulfatase, *AtsA*, et les sites utilisés pour l'établissement d'amorces moléculaire **p 223**

Figure 3 : Relation phylogénétique des séquences en acides aminés des clones *atsA*. Les distances phylogénétiques ont été déterminées par une analyse en neighbour-joining. Enfin, les séquences que nous avons obtenues, à partir des amorces moléculaires directement utilisées sur le sol, sont représentées par les patates alors

que celles que nous avons précédemment isolées dans le chapitre 5-1 sont notées
entre parenthèses **p 225**

Sommaire des Tableaux

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Situation du soufre dans le sol (Vis et Goujard, 2005) **p 24**

Chapitre 2. Caractérisation et évolution de la taille et de la structure de la communauté bactérienne totale sous couvert d'orge (*Hordeum vulgare* var. Nikel) et de colza (*Brassica napus* var. Twister)

Tableau 1 : Dates des prélèvements de sols et stades de développement des plantes **p 75**

Tableau 2 Analyse physico-chimique du sol de Martincourt réalisée par le laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras **p 75**

Chapitre 3. Caractérisation de la communauté bactérienne cultivable minéralisant les esters de sulfate par des approches de microbiologie pasteurienne

Chapitre 3-1. Mise au point d'un milieu de culture sélectif permettant la détection et la caractérisation de bactéries du sol possédant l'activité arylsulfatase impliquée dans la minéralisation des esters de sulfate

Tableau 1 : Activité arylsulfatase des souches bactériennes. ¹*Pseudomonas aeruginosa* a été utilisé comme contrôle positif pour l'activité arylsulfatase : activité ARS ++++ > 10 ; 10 > +++ > 5 ; 5 > ++ > 1 ; 1 > + > 0,5 µg de pNP libéré par heure et par mg de protéine **p 106**

Chapitre 4. Induction de l'activité arylsulfatase chez différentes bactéries Gram+, isolées de la rhizosphère, en conditions limitantes en sulfates

Tableau 1 : Récapitulatif des μ_{\max} obtenus après la modélisation des sigmoïdes de croissance bactérienne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Newman-Keuls) **p 151**

Tableau 2 : Compartimentation cellulaire de l'activité arylsulfatase après 9h de culture chez les souches affiliées à *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7, *Streptomyces sp.*, *Rhodococcus sp.* PLL-1 et *Microbacterium sp.* 5, dans un milieu M9 + *p*-NPS (Activité intracellulaire : A i, Activité membranaire : A m, Activité extracellulaire A e) **p 154**

Tableau 3 : Induction de l'activité arylsulfatase dans les différents compartiments cellulaire chez les souches affiliées à *Stenotrophomonas sp.* 4 O 7, *Streptomyces sp.*, *Rhodococcus sp.* PLL-1 et *Microbacterium sp.* 5 en présence d'une source de sulfate minéral variable et d'une source de *p*-NPS constante avec l'Activité intracellulaire notée A i et l'Activité membranaire notée A m **p 154**

Chapitre 5. Caractérisation moléculaire de la communauté bactérienne minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

Tableau 1 : Pourcentage d'affiliation des souches bactériennes isolées des rhizosphères d'orge et de colza avec la séquence 16S la plus proche présente dans la Genbank. Il est à noter que les souches *Acinetobacter sp.* ADP1 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ont été utilisées comme contrôle positif et la souche *Flavobacterium sp.* comme contrôle négatif. Ces trois souches bactériennes ne proviennent pas des sols rhizosphériques étudiés **p 173**

Tableau 2 : Récapitulatif des amorces moléculaires utilisées au cours de cette étude. Les conditions d'amplification par PCR sont présentées et les chiffres entre parenthèses correspondent aux différents cycles de la PCR **p 175**

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats d'amplification par PCR de la collection de souches avec les différents jeux d'amorces utilisés dans cette étude. Il est à noter que les souches *Acinetobacter sp.* ADP1 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ont été utilisées comme contrôle positif et la souche *Flavobacterium sp.* comme contrôle négatif. Ces trois souches bactériennes ne proviennent pas des sols rhizosphériques étudiés **p 179**

Tableau 4 : Homologie, des séquences *atsA*, en acides aminés avec la séquence de référence répertoriée dans la Genbank, présentée en pourcentage avec respectivement Bm :

Blastopirellula marina DSM 3645 ; *Kp* : *Klebsiella pneumoniae* ; *Kpp* : *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* ; *Ma* : *Mycobacterium avium* 104 ; *Ms* : *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 ; *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *Pa*_{PAO1} : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ; *PfO-1* : *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 ; *Pf-5* : *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 et *Rh* : *Rhodococcus sp.* RHA1 **p 181**

Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Tableau 1 : Identification et séquences des amorces moléculaires utilisée au cours de cette étude **p 201**

Tableau 2 : Indice de diversité afférents aux banques de clones *atsA*, des communautés bactériennes fonctionnelles rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate, aux deux stades de développement du colza **p 206**

Sommaire des Photographies

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Photographie 1 : Mise en évidence de déficiences en soufre chez une culture de blé (Zhao *et al.*, 2001) **p 22**

Chapitre 5. Caractérisation moléculaire de la communauté bactérienne minéralisant les esters de sulfate

Chapitre 5-1. Mise au point d'amorces ciblées sur le gène codant l'arylsulfatase, *atsA*, et étude de la diversité de ce gène chez des isolats bactériens rhizosphériques minéralisant les esters de sulfate

Photographie 1 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsPsAF* et *atsAR* (1) : 1k ladder (Invitrogen) ; (2) : *Oerskovia sp.* ; (3) : *Stenotrophomonas sp.* ; (4) : *Theatrathiobacter kashmirensis*; (5) : *Rhodococcus sp.* ; (6) : *Bacillus pumilus*; (7) : *Oerskovia sp.* ; (8): *Alcaligenes sp.* ; (9) : *Microbacterium sp.* ; (10) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) ; (11) : *Streptomyces sp.* ; (12) : *Klebsiella sp.* ; (13) : *Rhodococcus sp.* PLL-1 ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : *Acinetobacter sp.* ADP1 ; (16) : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ; (17) : *Stenotrophomonas sp.* ; (18) : *Flavobacterium sp.* ; (19) : *Oerskovia ginkgo* **p 176**

Photographie 2 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsAF* et *atsAR* (1) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) ; (2) : *Oerskovia sp.* ; (3) : *Stenotrophomonas sp.* ; (4) : *Theatrathiobacter kashmirensis* ; (5) : *Rhodococcus sp.* ; (6): *Bacillus pumilus* ; (7): *Oerskovia sp.* ; (8) : *Alcaligenes sp.* ; (9) : *Microbacterium sp.* ; (10) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) ; (11) : *Streptomyces sp.* ; (12) : *Klebsiella sp.* ; (13) : *Rhodococcus sp.* PLL-1 ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : *Acinetobacter sp.* ADP1 ; (16) : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ; (17) *Stenotrophomonas sp.* ; (18) : *Flavobacterium sp.* ; (19) : *Oerskovia ginkgo* ; (20) : Smart Ladder SF ladder (Invitrogen) **p 177**

Photographie 3 : Gel électrophorétique de l'amplification du gène *atsA* par PCR à partir d'ADN extrait des souches bactériennes à l'aide des amorces *atsA175F* et *atsAR* (1) : 100bp ladder (Fermentas) ; (2) : *Oerskovia sp.* ; (3) : *Stenotrophomonas sp.* ; (4) : *Theatrathiobacter kashmirensis sp.* ; (5) : *Rhodococcus sp.* ; (6) : *Bacillus pumilus* ; (7) : *Oerskovia sp.* ; (8) : *Alcaligenes sp.* ; (9) : *Microbacterium sp.* ; (10) : 100bp ladder (Fermentas) ; (11) : *Streptomyces sp.* ; (12) : *Klebsiella sp.* ; (13) : *Rhodococcus sp.* PLL-1 ; (14) : *Microbacterium oxydans* ; (15) : témoin négatif ; (16) : témoin négatif ; (17) *Stenotrophomonas sp.* ; (18): *Flavobacterium sp.* ; (19) : *Oerskovia ginkgo* ; (20) : 100bp ladder (Fermentas) **p 178**

Chapitre 5-2. Analyse de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate par approche moléculaire

Photographie 1 : Gel électrophorétique de l'amplification d'*atsA* par PCR gigogne. L'ADN total utilisé comme matrice provient des sols rhizosphériques sous couvert de colza aux stades de formations des boutons floraux (piste 2) et de floraison (piste 3) et des sols rhizosphériques sous couvert d'orge aux stades de montaison (piste 4) et de formation des épis (piste 5). Les pistes 1 et 6 correspondent respectivement aux marqueurs de poids moléculaires Φ -X-174/Hae III, (Q-BIOgene, fr) et 1kb Ladder (Invitrogen, Fr) **p 202**

Photographie 2 : Profils de digestion du fragment du gène *atsA* obtenu avec les amorces *atsA175F* et *atsAR* et digéré par l'enzyme de restriction AluI. Les pistes M, correspondent aux marqueurs de poids moléculaires (Φ -X-174/Hae III, (Q-BIOgene, fr)) et les pistes de 1 à 8 et de 10 à 18 correspondent à des profils de digestion obtenus pour 1 clone transformé. Enfin, la piste 9 correspond au profil génétique obtenu après digestion par AluI du fragment du gène *atsA* obtenu avec les amorces *atsA175F* et *atsAR* sur l'ADN extrait du sol **p 203**

Nb : Certaines illustrations au sein de ce document ont été réalisées grâce à Servier Medical Art et sont disponibles à l'adresse suivante http://www.servier.fr/smart/home_smart.asp.

Glossaire

A-RISA :

Acronyme de Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis. L'**A-RISA** est une technique de biologie moléculaire qui permet par l'établissement d'empreintes génétiques d'observer le polymorphisme de séquences existant dans l'espace non codant entre 2 gènes ribosomiques.

ACP :

L'Analyse en Composantes Principale ou **ACP** est une méthode mathématique d'analyse des données qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre n variables aléatoires.

ADN :

L'Acide DéoxyriboNucléique ou **ADN** est une molécule, retrouvée dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme.

ARN :

L'Acide RiboNucléique ou **ARN** est produit par transcription à partir de l'**ADN** situé dans le noyau. L'**ARN** est donc une copie d'une région de l'un des brins de l'**ADN**.

Les **ARN** produits peuvent avoir trois grands types de fonctions, ils peuvent être support de l'information génétique d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines (on parle alors d'**ARN** messagers), ils peuvent adopter une structure secondaire et tertiaire stable et accomplir des fonctions catalytiques (par exemple l'**ARN** ribosomique), ils peuvent enfin servir de guide ou de matrice pour des fonctions catalytiques accomplies par des facteurs protéiques (par exemple les micro**ARN**).

ATP :

L'Adénosine TriPhosphate (**ATP**) est une molécule utilisée chez tous les organismes vivants pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques.

ATPases :

Les **ATPases** membranaires sont une classe d'enzymes liées au métabolisme énergétique, qui hydrolysent ou synthétisent les molécules d'adénosine-triphosphate (**ATP**) tout en transférant des ions d'un côté à l'autre de la membrane. Il en existe plusieurs classe, selon qu'elles synthétisent ou hydrolysent l'**ATP**, selon le type d'ion qu'elles transportent.

Alkylsulfatase :

L'**alkylsulfatase** est une enzyme catalysant une activité enzymatique qui hydrolyse les esters de sulfate aliphatique (uniquement) en sulfate.

AluI

AluI est une endonucléase de restriction, originaire d'*Arthrobacter luteus*, cette enzyme est utilisée en biologie moléculaire pour l'analyse du polymorphisme de certaines séquences d'**ADN**.

Amplicon :

L'**amplicon** désigne une portion d'**ADN** définie par un couple d'amorces.

Arbre Phylogénétique :

Un **arbre phylogénétique** est un arbre schématique qui montre les relations de parentés entre des entités supposées avoir un ancêtre commun.

Arylsulfatase :

L'**arylsulfatase** est une enzyme catalysant une activité enzymatique qui hydrolyse les esters de sulfate en sulfate.

atsA :

Acronyme du gène codant l'**arylsulfatase**.

AtsA :

Acronyme de l'unité catalytique de l'**arylsulfatase** (l'enzyme).

atsK :

Acronyme du gène codant l'**alkylsulfatase**.

AtsK :

Acronyme de l'unité catalytique de l'**alkylsulfatase**, enzyme hydrolysant les esters de sulfate aliphatique.

Amorces ou **Primers** ou **Amorces de PCR :**

Courtes séquences d'**ARN** ou d'**ADN**, complémentaires du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une **ADN polymérase**.

AMOVA :

L'Analyse MOléculaire de Variance est un test statistique apparenté à l'**ANOVA** mais qui a été adaptée pour les données provenant de biologie moléculaire (disparités entre des pools de séquences d'**ADN**).

ANOVA :

L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais **ANOVA** : ANalysis Of VAriance) est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population.

APS :

Adénosine PhosphoSulfate.

ARS :

Acronyme de l'**arylsulfatase**, enzyme d'origine microbienne, dans les sols, qui hydrolyse les esters de sulfate aromatique en sulfate.

CFU :

Acronyme de Colonies Formant une Unité.

Colloïde :

Un **colloïde** est une substance sous forme de liquide qui contient en suspension des particules suffisamment petites pour que le mélange soit homogène.

DGGE :

La **DGGE** (Denaturing gradient gel electrophoresis) est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques (**ADN** ou **ARN**) de même taille. Son principe consiste à déposer un échantillon d'acide nucléique sur un gel d'électrophorèse contenant un agent dénaturant (par exemple l'urée).

DNA-SIP :

La technique dite de **DNA-SIP** (pour DNA-Stable isotope probing) est basée sur l'utilisation d'une sonde isotopique stable pour marquer l'**ADN** notamment ¹³C et permet l'isolement sélectif d'**ADN** des microorganismes qui sont activement impliqués dans la consommation de ces substrats marqués.

Electrophorèse :

La technique de l'**électrophorèse** est fondée sur le déplacement d'ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'**électrophorèse** ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

FAME :

L'analyse **FAME** est une technique de biochimie basée sur l'analyse de la composition en Acides Gras d'Ester Méthylique (Fatty Acids Methyl Esters).

Gène putatif :

Un **gène putatif** est un gène qui est soupçonné d'être codant ou fonctionnel.

Humus :

L'**humus** est la couche supérieure du sol créée et entretenue par la décomposition de la matière organique, essentiellement par l'action combinée des animaux, des bactéries et des champignons du sol. L'**humus** est une matière souple et aérée, qui absorbe et retient bien l'eau et de **pH** variable selon que la matière organique soit liée ou non à des minéraux.

Hydrolyse :

L'**hydrolyse** d'une substance est sa décomposition par l'eau grâce aux ions H₃O⁺ et HO⁻ provenant de la dissociation de l'eau.

In vitro :

« dans le verre » : ou plus généralement hors de l'organisme. Ce terme s'oppose à **in vivo**.

In vivo :

« Au sein du vivant » ou plus généralement dans l'organisme.

Isozyme :

Un **isoenzyme** (ou **isozyme**) est une enzyme présentant une séquence d'acides aminés différente d'une enzyme de référence mais catalysant la même réaction chimique.

kDa :

En biochimie, on appelle également l'unité de masse des atomes le dalton (symbole **Da**), en l'honneur de John Dalton pour son travail sur la théorie atomique.

NADP :

Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (**NADP**) est un coenzyme d'oxydoréduction. Il est très proche du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Sa forme réduite est désignée par NADPH ou NADPH₂ ou encore NADPH⁺H⁺.

***narG* :**

Le gène ***narG*** code la nitrate réductase membranaire.

Nested PCR ou PCR gigogne :

La **PCR** emboîtée, **PCR gigogne** ou **PCR nichée (Nested PCR)** est une **PCR** en deux étapes successives, avec deux couples d'amorces différents, le second liant des séquences situées à l'intérieur du premier **amplicon**. Cette technique était initialement utilisée pour réduire le risque de contamination (le produit final devait pouvoir interagir avec deux couples d'amorces, donc deux niveaux de spécificité).

OTU :

OTU pour Operational Taxonomic Unit.

p-NC :

Le **p-NC** ou para-nitrocatechol est le produit de l'hydrolyse du **p-NCS** par l'arylsulfatase. Le **p-NC** possède une absorbance dans le rouge.

p-NCS :

Le **p-NCS** ou para-nitrocatecholsulfate est un ester de sulfate aromatique qui possède une absorbance dans le jaune.

p-NP :

Le **p-NP** ou para-nitrophénol est le produit de l'hydrolyse du **p-NPS** par l'arylsulfatase. Le **p-NP** possède une absorbance dans le jaune.

p-NPS :

Le **p-NPS** ou para-nitrophénylsulfate est un ester de sulfate aromatique qui est incolore.

PAPS :

PhosphoAdénosine-PhosphoSulfate.

PCR :

La réaction en chaîne par polymérase (**PCR** est l'abréviation anglophone de Polymerase Chain Reaction) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'**ADN** ou d'**ARN** connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence spécifique d'**ADN** (l'**Amplicon**) ou amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides.

PCR en temps réel ou qPCR :

La **PCR** quantitative (synonymes : **PCR** en temps réel, **qPCR**) permet de mesurer la quantité initiale d'**ADN**. En réalité, la **PCR** quantitative mesure le nombre d'amplifiats.

PCR gigogne :
Voir **nested PCR**.

pH :

Le potentiel hydrogène (ou **pH**) mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le **pH** mesure l'acidité ou la basicité d'une solution.

Photosystème :

Un photosystème est un ensemble formé par des protéines et des pigments - dont la chlorophylle - et se trouve dans les membranes thylakoïdales des cyanobactéries et des chloroplastes dans les cellules végétales. Les photosystèmes interviennent dans les mécanismes de la photosynthèse en absorbant les photons de la lumière.

PVP :

Acronyme de PolyVinylPyrrolidone. Le PVP est un polymère qui dans sa forme pure est totalement inerte. Comme tel, il est utilisé dans les plasmas sanguins ou comme adjuvant en raison de sa solubilité dans l'eau et les solvants polaires.

PVPP :

Acronyme de **Polyvinylpyrrolidone**. Le **PVPP** est un polymère organique de synthèse qui est insoluble dans l'eau et présente une forte affinité pour les polyphénols. Cette propriété est utilisée pour éliminer certains acides (acides cinnamiques), tanins ou quinones.

RFLP :

Acronyme de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism en Anglais). La RFLP est une technique de biologie moléculaire qui permet d'observer un polymorphisme entre différents fragments d'ADN ou d'ARN. Ce polymorphisme s'observe alors selon la présence/absence et la fréquence de certaines séquences cibles, dans le fragment d'ADN ou d'ARN, et sera visualisée par l'apparition de plusieurs bandes (de tailles variables).

Rhizosphère :

La **rhizosphère** est la région du sol sous l'influence des racines vivantes et des microorganismes associés.

S box régulon :

Le **S box régulon** est défini comme un système global de contrôle de la demande en soufre au sein de la cellule ou d'un organisme.

SSI protéines :

Les **SSI protéines** « Sulfur Starvation proteins » sont des protéines induites durant la carence, au sein de la cellule, de façon à rechercher de nouvelles sources de S directement ou indirectement assimilables.

SSCP :

La **SSCP** ou Single Strand Conformation Polymorphism est une technique de biologie moléculaire qui vise à séparer différents allèles d'un même gène (allozyme) en misant sur la différence de migration dans un gel non dénaturant de leurs différentes conformations.

Sulfatation :

La **sulfatation** est le transfert d'un sulfate ou groupe de sulfates à un accepteur *via* une sulfotransférase.

Taq polymérase :

La **Taq polymérase** (aussi appelée "Taq pol" ou simplement "Taq") est une enzyme, plus particulièrement une ADN polymérase qui agit dans une certaine gamme de température. On l'utilise couramment en biologie moléculaire pour répliquer l'ADN *via* la PCR.

TGGE :

La **TGGE** ou Temperature Gradient Gel Electrophoresis est une technique proche de la **DGGE** mais la séparation des acides nucléiques est cette fois-ci basée sur un gradient de dénaturation produit par la température plutôt que chimiquement.

Thermocycleur :

Grossièrement dans cette thèse : Appareil à PCR.

UV :

Acronyme d'UltraViolet.

Xénobiotique :

En général, un **xénobiotique** est une molécule chimique polluante et très toxique, y compris à de faibles concentrations (par exemple les pesticides, médicaments). Cette toxicité s'explique simplement par l'inadaptation des organismes vivants qui n'ont jamais rencontré cette substance lors de leur évolution.

X-Sulf :

Le **X-Sulf** ou 5-Bromo-4-chloro-3-indolylsulfate est un ester de sulfate chromogène dont l'hydrolyse par l'arylsulfatase provoque la libération du chromogène (le **X**) qui donne une coloration bleue.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Alain BRAUMAN, Directeur de Recherche, Sup-Agro, INRA-IRD, Montpellier

Monsieur Georges BARBIER, Professeur, Université de Brest, Plouzané

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CRÉGUT Mickaël

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Caractérisation de la communauté bactérienne impliquée dans la minéralisation du
soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge"**

en vue de l'obtention du titre de :

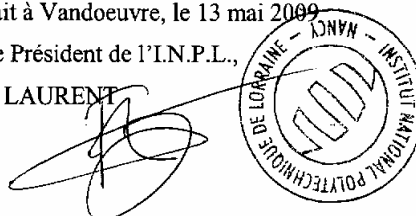
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 13 mai 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé :

Depuis une trentaine d'années, l'élément soufre (S) est devenu un des éléments les plus limitants pour la croissance des cultures du fait de nombreux facteurs, comme les nouvelles pratiques de gestion des sols et la limitation des pollutions anthropiques. Ainsi, des carences en S apparaissent au sein des cultures et particulièrement en Europe de l'Ouest.

Nos objectifs ont été d'appréhender la communauté bactérienne fonctionnelle du sol qui, de par son activité arylsulfatase, permet la minéralisation de la forme majoritaire du S en sulfate (forme de S assimilée par les plantes).

D'après nos résultats, la densité de cette communauté bactérienne fonctionnelle est plus importante dans les environnements où le S est potentiellement plus limitant (rhizosphère de colza vs orge). De plus, cette communauté fonctionnelle apparaît diversifiée et est notamment composée de divers genres bactériens affiliés à de nombreuses classes taxonomiques (Actinobactéries, Firmicutes, α -, β -, δ -, γ -protéobactéries et aux Planctomycètes). De plus, au sein de la rhizosphère du colza, des variations temporelles de structure et de diversité de cette communauté fonctionnelle ont également été mises en évidence.

En conclusion, l'ensemble des expérimentations semble mettre en évidence, que la communauté bactérienne fonctionnelle minéralisant les esters de sulfate apparaît stimulée sous colza comparée à celle présente sous orge. Ces résultats laissent présager le rôle potentiel de cette communauté fonctionnelle dans le turn-over du S dans les sols agricoles et la mise en place d'approches d'écologie fonctionnelle supplémentaires permettrait de mieux cerner son implication dans la nutrition soufrée des cultures.

Mots-clefs : arylsulfatase, activité arylsulfatase, *atsA*, esters de sulfate, communauté bactérienne fonctionnelle, rhizosphère, colza, orge

Abstract:

Over the past thirty years, Sulfur (S) has become one of the most limiting element for crop growth due to many factors, such as new soil management practices and depletion of the anthropogenic pollution. Thus, S deficiencies increase in crops, particularly in Western Europe.

Our objectives were to apprehend the soil functional bacterial community which, by its arylsulfatase activity, allows the mineralization of the majority form of S to sulfate (form of S assimilated by plants).

Based on our results, the density of the functional bacterial community are higher in environments where S is potentially limiting (rapeseed rhizosphere vs. barley rhizosphere). Moreover, this functional community appeared diverse and belonging to several taxonomic classes (Actinobacteria, firmicutes, α -, β -, δ -, γ -proteobacteria and Planctomycetea). In addition, in the rapeseed rhizosphere, temporal variations of the structure and diversity of this functional community have also been highlighted.

In conclusion, our experiments appear to demonstrate that this functional bacterial community mineralizing sulphate esters appeared stimulated in rapeseed rhizosphere compared to that present in barley rhizosphere. However, the establishment of new approaches to allow additional functional ecology bases for this community should be made to allow a better understanding of its potential involvement in sulfur nutrition of crops.

Key Words: arylsulfatase, arylsulfatase activity, *atsA*, sulphate esters, functional bacterial community, rhizosphere, rapeseed, barley