



HAL
open science

Impact des changements globaux sur le fonctionnement des tourbières : couplage C-N-S et interactions biotiques

Aurélien Gicquel

► To cite this version:

Aurélien Gicquel. Impact des changements globaux sur le fonctionnement des tourbières : couplage C-N-S et interactions biotiques. Interactions entre organismes. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT : 2012RENS051 . tel-00734604

HAL Id: tel-00734604

<https://theses.hal.science/tel-00734604>

Submitted on 24 Sep 2012

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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Aurélien Gicquel

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche 6553 « ECOBIO »
Ecosystèmes-Biodiversité-Evolution
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Impact des
changements globaux
sur le fonctionnement
des tourbières :
couplage C-N-S et
interactions biotiques**

**Thèse soutenue à Rennes
le 27 juin 2012**

devant le jury composé de :

Jean Charles MUNCH

Professeur, Université Technique de Munich / *rapporteur*

Cornelia RUMPEL

Directeur de Recherche, INRA Versailles-Grignon /
rapporteur

Fatima LAGGOUN-DEFARGE

Chargée de Recherche, Université d'Orléans / *examineur*

Gilles PINAY

Directeur de Recherche, Université de Rennes 1 /
examineur

Séverine PIUTTI

Maître de Conférences, Université de Lorraine /
examineur

André-Jean FRANCEZ

Maître de Conférences, Université de Rennes 1 /
directeur de thèse

Françoise BINET

Directeur de Recherche, Université de Rennes 1 /
co-directeur de thèse

**Impact des changements globaux
sur le fonctionnement des tourbières :
couplage C-N-S et interactions biotiques**

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à mes directeurs de thèse, André-Jean Francez et Françoise Binet, qui ont su me faire profiter de leurs expériences et de leurs connaissances tout au long de ce travail.

Merci à Jean Charles Munch et Cornelia Rumpel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Fatima Laggoun-Défarge, Gilles Pinay et Séverine Piutti de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de pilotage, Séverine Piutti, Laurent Grasset, Emilie Jardé et Jean-François Soussana, qui ont fortement contribué à faire évoluer ce travail. Un grand merci à Christian Walter, mon tuteur de thèse, pour son implication et ses nombreux conseils, de mon M2 à l'aboutissement de cette thèse.

Je souhaite également remercier toute l'équipe RBPE pour m'avoir accueilli et soutenu, et plus particulièrement Nathalie Le Bris-Josselin et Marie-Paule Briand pour leur aide technique précieuse.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe « PEATWARM », et plus particulièrement Fatima Laggoun-Défarge, pour m'avoir accueilli et permis de participer à ce grand projet.

Merci également à Laurent Grasset pour ses précieux conseils et son accueil chaleureux lors de mon passage à Poitiers pour l'extraction et l'analyse des phospholipides. Merci à Claude Le Milbeau pour son aide aux analyses SIP ¹³C-PLFAs.

Je souhaite aussi fortement remercier mes collègues de bureau, Stéphane, Marie, Nico et Stéphane pour la bonne ambiance partagée.

Enfin, merci à toute ma famille et amis pour m'avoir soutenu et encouragé pour mener ce travail jusqu'à la fin. Et bien évidemment un grand merci à Jessica, sans qui rien n'aurait été possible.

Table des matières

CHAPITRE I Changements globaux et fonctionnement des tourbières : contexte scientifique, état de l'art et objectifs de la thèse 1

1. Les tourbières à Sphaignes et les changements globaux..... 3

1.1. Les tourbières à Sphaignes accumulent du carbone..... 3

1.1.1. Classification *fen-bog* 3

1.1.2. Fonction de « puits » de C 4

1.2. L'utilisation des tourbières dans le monde : la fonction de « puits » remise en cause 6

1.3. Changement climatique et devenir des réservoirs de carbone à l'échelle de la biosphère 9

1.4. La régénération des tourbières abandonnées après exploitation 10

2. Interactions biotiques et transformations biogéochimiques dans les écosystèmes..... 12

2.1. Les acteurs de transformations biogéochimiques : de l'individu à l'écosystème 12

2.1.1. Les sphères d'influences dans le sol 12

2.1.2. Les organismes ingénieurs 14

2.1.2.1. Les ingénieurs autotrophes..... 15

2.1.2.2. Les ingénieurs hétérotrophes 17

i) Les lombriciens : 17

ii) La bioturbation et les biostructures lombriciennes : 19

iii) Les enchytréides : 21

2.1.3. Les microorganismes et la boucle microbienne 21

2.1.4. Les traits fonctionnels et différences autotrophes - hétérotrophes 22

2.1.5. Les interactions biotiques et le couplage des cycles C-N-S 23

2.1.5.1. L'approche par les isotopes stables 23

2.1.5.2. L'approche par la stœchiométrie écologique 25

2.2. Les interactions biotiques en tourbières à Sphaignes face aux changements globaux 26

2.2.1. Modification de la production primaire 26

2.2.2. Modification des activités liées à la mésofaune et à la macrofaune..... 28

2.2.3. Modification des activités microbiennes..... 29

2.2.4. Modification des flux à l'échelle de l'écosystème 30

2.2.5. Conséquences : Impact sur le fonctionnement « puits » 31

3. Projets PEATWARM et ECCO-PNBC 33

3.1. Le projet PEATWARM..... 33

3.1. Le projet ECCO-PNBC..... 34

4. Objectifs du travail de recherche 35

Références 37

CHAPITRE II Sites d'études, protocoles et stratégies d'investigation à différents niveaux d'organisation 49

1. Choix des sites contraints aux changements globaux 51

1.1. Tourbière naturelle et impact du réchauffement climatique : Tourbière de Frasne (25).....	51
1.2. Tourbière en phase de régénération : Tourbière de Baupte (50)	54
2. Stratégies expérimentales à différents niveaux d'organisation	57
2.1. Prélèvements tourbe.....	57
2.1.1 Mésocosmes de tourbe : niveau des communautés et de l'écosystème.....	57
2.1.2 Microcosmes de tourbe : niveau de l'individu	59
2.2. Stratégies de marquage ¹³ C- ¹⁵ N- ³⁴ S	60
2.2.1. Marquage mésocosmes Frasne.....	61
2.2.2. Marquage lombriciens.....	61
2.2.3. Marquage plantes	63
3. Analyses et couplage d'outils	65
3.1. Mesure de la respiration C-CO ₂ et ¹³ C-CO ₂	65
3.2. Mesure des biomasses microbiennes C-N-S.....	66
3.3. Analyses isotopiques par EA-IRMS	66
3.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes : SIP ¹³ C-PLFAs	70
3.5. NanoSIMS.....	72
4. Traitements des données et analyses statistiques.....	75
4.1. Modèles « marquage-démarquage »	75
4.2. Calculs de recouvrements et estimation de flux	75
4.3. Analyses des flux de C des communautés microbiennes actives.....	77
4.4. Traitements d'images et calculs des abondances en ¹⁵ N et ³⁴ S avec la NanoSIMS.....	78
4.5. Analyses statistiques	78
Références.....	79
CHAPITRE III Turnovers C, N et S et devenir des transferts biogéniques de <i>L. rubellus</i> :	
approche écophysiologique et traits fonctionnels	
1. Synopsis.....	85
2. Ecological significance of physiological traits of earthworm (<i>Lumbricus rubellus</i> H.) in S-C-N nutrients availability and peatland functioning (article 1)	87
Summary.....	88
2.1. Introduction.....	89
2.2. Materials and methods	91
2.2.1. Peat enrichment in ¹³ C, ¹⁵ N and ³⁴ S.....	91
2.2.2. Triple isotopic labelling of earthworms.....	92
2.2.3. S-C-N- analyses	93
2.2.4. Data processing and statistical analyses	94
2.3. Results.....	96

2.3.1. Labelling, enrichments and tracer losses	96
2.3.2. C respiration losses, recoveries and biogenic inputs to peat	99
2.4. Discussion.....	103
2.4.1. Efficiency of <i>L. rubellus</i> in the recycling of S, C and N nutrients: expression of ecophysiological traits	103
2.4.2. S, C and N turnovers and functional diversity in lumbricids.....	105
2.4.3. Biogenic inputs of S, C and N on the ecosystem scale.....	106
References.....	109
3. Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry (article 2).....	
Abstract.....	114
3.1. Introduction.....	115
3.2. Materials and methods	116
3.2.1. Earthworm labelling and mesocosm preparation	116
3.2.2. Samples preparation for NanoSIMS analysis.....	118
3.2.3. NanoSIMS analyses.....	119
3.2.4. Image sampling and statistical analyses.....	119
3.3. Results.....	120
3.3.1. ¹⁵ N and ³⁴ S earthworm labelling.....	120
3.3.2. N transfers to peat	122
3.3.3. S transfers to peat	122
3.3.4. N and S linkage	125
3.4. Discussion.....	125
3.4.1. ¹⁵ N and ³⁴ S earthworm labelling.....	125
3.4.2. N transfers to peat	127
3.4.3. S transfers to peat	128
3.4.4. N and S linkage	128
References.....	130
CHAPITRE IV Rôle des interactions entre organismes ingénieurs sur les transferts C-N-S dans une tourbière en régénération après exploitation	
1. Synopsis.....	135
2. Rôle des interactions entre organismes ingénieurs sur les transferts C-N-S dans une tourbière en régénération après exploitation (article 3).....	
2.1. Introduction.....	138
2.2. Matériels et méthodes	140
2.2.1. Matériels d'étude	140
2.2.2. Triple marquage ¹³ C- ¹⁵ N- ³⁴ S des plantes et des vers de terre	141
2.2.3. Préparation des mésocosmes	142
2.2.4. Echantillonnage des compartiments et mesures de respiration.....	144
2.2.5. Analyses C-N-S.....	144
2.2.6. Traitements des données et analyses statistiques	145

2.3. Résultats	147
2.3.1. Vérification de la méthodologie de triple marquage ¹³ C, ¹⁵ N et ³⁴ S.....	147
2.3.2. Transferts C-N-S de la plante et effet du ver de terre.....	149
2.3.3. Transferts C-N-S du ver de terre et effet de la plante.....	151
2.3.4. Effet de la « source » de marquage sur les transferts C-N-S entre plantes et vers de terre.....	154
2.4. Discussion	156
2.4.1. Fiabilité du dispositif.....	156
2.4.2. Effet de <i>L. rubellus</i> sur la physiologie et les transferts de C, N et S d' <i>E. angustifolium</i> vers la tourbe.....	157
2.4.3. Effet d' <i>E. angustifolium</i> sur la physiologie et les transferts C-N-S de <i>L. rubellus</i> vers la tourbe.....	158
2.4.4. Impact d' <i>E. angustifolium</i> et <i>L. rubellus</i> sur la fonction de « puits » d'une tourbière en régénération.....	159
Références	160
CHAPITRE V Le changement climatique affecte le fonctionnement des tourbières à Sphaignes : réponses à l'échelle des communautés et de l'écosystème	165
1. Synopsis	167
2. Climatic changes reduce the microbial-C incorporation and C-cycling in a temperate Sphagnum-dominated peatland (article 4)	169
Abstract	170
2.1. Introduction	171
2.2. Materials and methods	172
2.2.1. Main characteristics of the study site.....	172
2.2.2. Experimental device and simulated OTC climate change.....	173
2.2.3. Mesocosm sampling and ¹³ C labelling.....	173
2.2.4. Microbial biomass.....	173
2.2.5. Structure of microbial communities - PLFAs.....	174
2.2.6. C-CO ₂ and ¹³ C-CO ₂ analyses.....	175
2.2.7. Data analyses.....	175
2.3. Results	176
2.3.1. Microbial biomass-C and respiration.....	176
2.3.2. Structure of microbial communities – PLFA profiles.....	177
2.3.3. ¹³ C-CO ₂ release and ¹³ C-incorporation into microbial PLFAs.....	180
2.4. Discussion	181
2.4.1. Climate effect on respiration, microbial biomass-C and community structure.....	181
2.4.2. Climate effect on microbial ¹³ C incorporation and C-cycling.....	182
2.5. Conclusion	184
References	184
3. Impact du changement climatique sur le fonctionnement et les flux C-N-S à l'échelle de l'écosystème tourbière à Sphaignes (article 5)	189
3.1. Introduction	190

3.2. Matériels et méthodes	192
3.3. Résultats.....	193
3.3.1. Enrichissements ¹³ C- ¹⁵ N- ³⁴ S de l'eau	193
3.3.2. Stocks C-N-S et biomasses microbiennes C-N-S	193
3.3.3. Incorporations ¹³ C- ¹⁵ N- ³⁴ S et dynamiques C-N-S dans la tourbière.....	196
3.3.3.1. Respiration ¹³ C-CO ₂	196
3.3.3.2. Sphaignes et végétaux vasculaires	197
3.3.3.3. Enchytréides.....	199
3.3.3.4. Tourbe	199
3.4. Discussion.....	202
3.5. Conclusion et perspectives	204
Références.....	204
CHAPITRE VI Les tourbières tempérées et les changements globaux : synthèse générale et perspectives.....	207
1. Introduction.....	209
2. Synthèse générale : les avancées fondamentales acquises	211
2.1. Les vers de terre constituent un relais à la recolonisation végétale et à la régénération du fonctionnement « puits » des tourbières anciennement exploitées.....	211
2.1.1. Les vers de terre accélèrent la remise à disposition des éléments C-N-S de la tourbe.....	211
2.1.2. Les communautés microbiennes de la tourbe ré-humidifiée après exploitation sont spatialement influencées par les transferts biogéniques N et S des vers de terre	212
2.1.3. Les vers de terre fournissent des nutriments C-N-S essentiels au soutien de la productivité primaire des tourbières en régénération.....	212
2.2. Le changement climatique affecte le fonctionnement biogéochimique C-N-S des tourbières à Sphaignes.....	214
2.2.1. Le changement climatique réduit les flux de C des communautés microbiennes	214
2.2.2. Le changement climatique affecte l'écosystème tourbière à <i>Sphagnum</i> : glissement vers un fonctionnement « source » de C ?	215
3. Perspectives de recherche	217
3.1. A l'échelle de l'individu <i>Lumbricus rubellus</i>	217
3.2. A l'échelle des communautés microbiennes.....	217
3.3. A l'échelle de l'écosystème.....	218
Références.....	219
ANNEXES	223

CHAPITRE I

**Changements globaux et fonctionnement des tourbières :
contexte scientifique, état de l'art et objectifs de la thèse**

1. Les tourbières à Sphaignes et les changements globaux

1.1. Les tourbières à Sphaignes accumulent du carbone

La formation des tourbières résulte d'une interaction entre différents facteurs tels que l'engorgement en eau, l'anoxie, l'acidité et les faibles températures, qui limitent l'activité microbienne (Clymo 1983 ; Laiho 2006) Ce sont des écosystèmes qui accumulent de la matière organique (MO) sous forme de tourbe. Elles fonctionnent donc comme des « puits » pour le carbone (C) et les autres éléments comme l'azote (N), la production nette étant toujours supérieure à la décomposition de la MO. L'accroissement en épaisseur de la tourbe peut être initié à partir d'une pièce d'eau qui va être progressivement comblée (processus d'atterrissement) ou à partir d'un substrat terrestre (processus de paludification) (Francez 2000).

1.1.1. Classification *fen-bog*

Il existe différentes classifications des tourbières selon les thématiques disciplinaires pour lesquelles elles ont été élaborées (botanique, pédologique,...) mais également en fonction des échelles de perception et de travail (Francez 2000). Dans les régions sans permafrost, la distinction principale entre les types de tourbières est effectuée entre fen et bog (Rydin et Jeglum 2006). Ces deux types d'habitats se caractérisent principalement par des différences d'hydrologie, de communautés végétales et de disponibilité en nutriments (Wheeler et Proctor 2000 ; Bridgham *et al.* 2001) (Tableau 1).

Le fen, ou tourbière de « bas-marais », correspond à un système dont l'alimentation en eau provient en partie des précipitations mais est surtout contrôlé par les apports géogènes (nappe phréatique, rivière, infiltration, ruissellement,...). Ce sont des tourbières relativement riches en nutriments N et phosphore (P), et présentant un statut méso- à eutrophe. A l'inverse, le bog, ou tourbière de « haut-marais », correspond à un système qui est uniquement alimenté par les eaux météoriques. Ce sont des tourbières bombées qui présentent un statut oligotrophe, c'est-à-dire pauvres en éléments nutritifs.

Tableau 1. Caractéristiques respectives du fen et du bog (D'après Heathwaite *et al.* 1993 dans Francez 2000)

	Fen	Bog
Alimentation en eau	Géogène (eau courante, stagnante, source, ...)	Ombrogène (eaux météoriques uniquement)
Statut trophique	Riche en nutriments (N et P)	Pauvre en nutriments (ombrotrophie)
Origine botanique de la tourbe	Herbacée (<i>Carex rostrata</i> , ...), arborée (aulne), muscinale (hypnacées), peu de sphaignes (<i>S. fallax</i> , ...)	Sphaignes (<i>S. magellanicum</i> , <i>S. capillifolium</i>), linaigrettes (<i>Eriophorum vaginatum</i> , ...), petits arbrisseaux (<i>Vaccinium oxycoccos</i> , <i>Andromeda polifolia</i> , ...)
Couleur de la tourbe	Noire (très humifiée)	Blonde (peu humifiée)
Topographie	Plate	Convexe (lentille)

1.1.2. Fonction de « puits » de C

La structure verticale d'une tourbière est dite « diplotelmique », c'est-à-dire qu'elle est formée de deux couches : l'acrotelme (couche supérieure) et le catotelme (couche inférieure) (Ingram 1978). Ces deux couches possèdent des fonctionnements hydrologiques et écologiques qui leurs sont propres. L'acrotelme correspond à la zone de battement de nappe où il y a de forts échanges d'eau avec l'atmosphère, un système racinaire dense et une importante population de microorganismes aérobies (décomposition rapide de la MO). Le catotelme se caractérise au contraire par un taux d'humidité invariable dans le temps, une très faible conductivité hydraulique et une faible production de matière vivante (microorganismes anaérobies). La figure 1 propose une représentation schématique du cycle du C en tourbière qui intègre l'acrotelme et le catotelme. Ce modèle descriptif fait apparaître les principaux compartiments et processus biogéochimiques à savoir :

- i) la fixation de C par les plantes qui représente l'entrée principale de C dans l'écosystème ;
- ii) la décomposition lente de la MO végétale qui contrôle le recyclage des éléments nutritifs, la disponibilité de ces derniers et par conséquent la productivité de l'écosystème ;
- iii) les pertes de C par respiration autotrophe (végétaux) et hétérotrophe (microorganismes et invertébrés) ;
- iv) les pertes de C par lessivage, à savoir sous forme de C inorganique dissous (DIC) et C organique dissous (DOC).

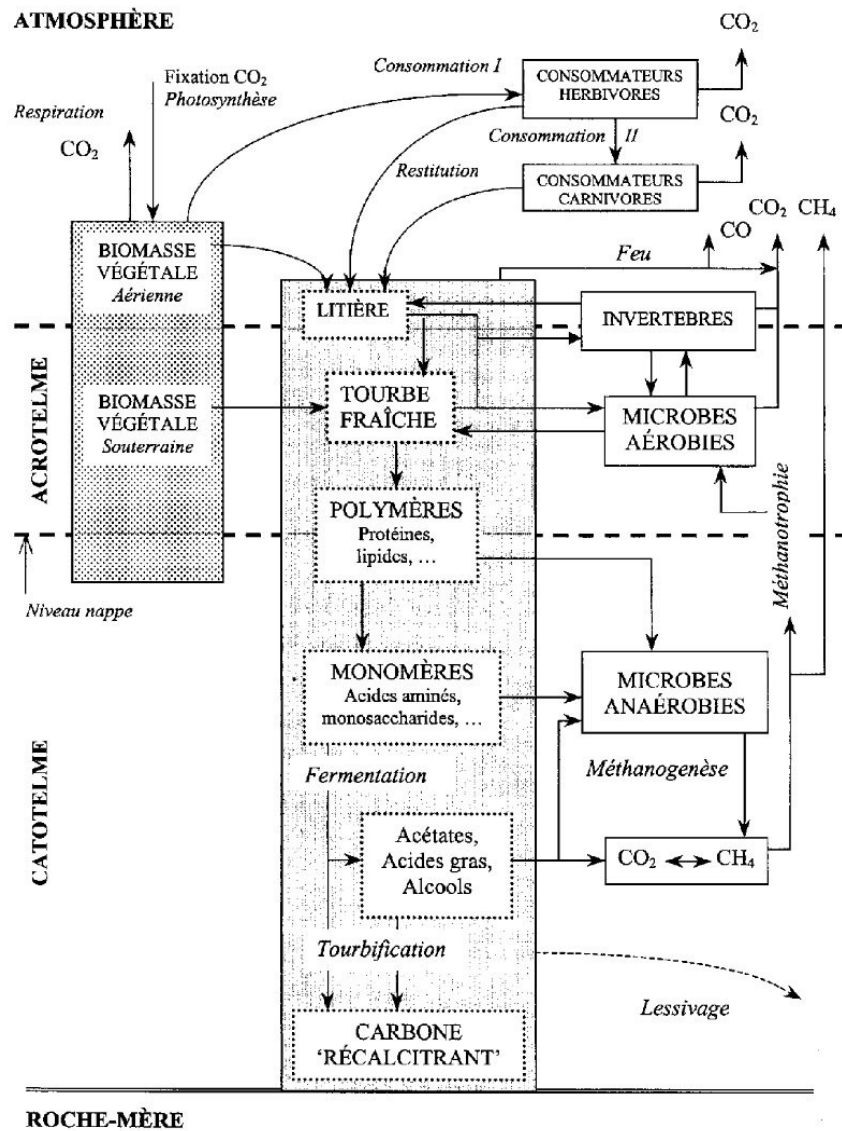


Figure 1. Modèle descriptif du cycle du C dans les tourbières (Synthèse de Francez 2000 d'après Pakarinen 1975, Francez 1991, Nilsson 1992)

Les sphaignes représentent les organismes « ingénieurs » à l'origine de l'édification de ce type de tourbière (tourbification). Ce sont des Bryophytes qui s'épanouissent dans des environnements gorgés d'eau et dont les tissus sont très riches en composés organiques récalcitrants comme les polyphénols, et de ce fait difficilement dégradables par les microorganismes (van Breemen 1995 ; Verhoeven et Toth 1995). Les composés phénoliques produits par les sphaignes ont le potentiel d'inhiber les activités bactériennes et fongiques et/ou les enzymes impliquées dans la décomposition de la MO (Opelt *et al.* 2007 ; Mellegard *et al.* 2009 ; Jassey *et al.* 2011). Dans les parois cellulaires des sphaignes, il existe une fraction soluble qui contient un acide uronique particulier : l'acide D-lyxo-5-hexo-sulopyranuronique ou 5-keto-D-mannuronique (Painter 1991). Cet acide peut

se lier et former de longues chaînes anioniques, les « sphagnanes », qui donneraient la couleur jaune-brun de l'eau des tourbières, et qui possèdent des propriétés tannantes et bactériostatiques qui limitent l'activité de décomposition des bactéries. Les sphaignes fournissent également une litière pauvre en éléments nutritifs limitant l'activité microbienne et la croissance des végétaux vasculaires (Malmer *et al.* 1994 ; Dorrepaal *et al.* 2006).

La production végétale primaire des tourbières à *Sphagnum* varie selon les espèces et les conditions climatiques, de 8 à 1450 g C.m⁻².an⁻¹ avec une moyenne de 259 g C.m⁻².an⁻¹ (Gunnarsson 2005). Ainsi, elle peut varier à l'échelle du globe, (Gunnarsson 2005). En règle générale, la production primaire est plus élevée en fen (~350 g C.m⁻².an⁻¹) qu'en bog (200-250 g C.m⁻².an⁻¹) (Francez 2000 ; Gunnarsson 2005). D'après Gorham (1991), ce sont 29 g C.m⁻².an⁻¹ qui s'accumulent en moyenne dans les tourbières de l'hémisphère boréal, ce qui représente dans les tourbières européennes environ 10 % de la production primaire (Clymo 1983 ; Francez et Vasander 1995).

Les tourbières naturelles fonctionnent comme des « puits » pour le dioxyde de carbone (CO₂) et comme des « sources » pour le méthane (CH₄). Le CH₄ est produit par des Archaea méthanogènes qui sont des microorganismes anaérobies stricts. Les méthanogènes sont principalement localisés dans les 20 cm sous-jacent au toit de la nappe (catotelme), là où le substrat présent est le plus riche (Sundh *et al.* 1994). Les émissions de méthane peuvent varier avec le type d'habitat *bog-fen* (Bubier *et al.* 1993) et le type de végétation (Joabsson *et al.* 1999). Dans les tourbières boréales, les émissions de CH₄ varient de 24 à 39 Tg.an⁻¹ (1 Tg = 10¹² g ; Laine *et al.* 1996) et elles peuvent dépasser les 3 g CH₄.m⁻².jour⁻¹ pour certaines d'entre elles (Martikainen 1996). Ainsi, il est clair que les tourbières à Sphaignes affectent l'atmosphère terrestre depuis l'Holocène (Frolking et Roulet 2007).

1.2. L'utilisation des tourbières dans le monde : la fonction de « puits » remise en cause

A l'heure actuelle, les tourbières de l'hémisphère boréal subissent une combinaison sans précédent de perturbations et de stress (augmentation des dépôts d'N, augmentation de la température, ...) (Galloway *et al.* 2008). Elles couvrent aujourd'hui entre 3 et 4 millions de km², soit environ 3 % des terres émergées (Lappalainen 1996, Francez 2000). Elles figurent parmi les zones humides les plus répandues, couvrant de 50 à 70 % de la surface des zones humides mondiales (Chapman *et al.* 2003). Exceptées les zones arides, elles se rencontrent

dans toutes les régions géographiques où leurs formes et leurs extensions varient considérablement (Manneville *et al.* 1999). Elles se situent, à 90 % d'entre elles, dans les régions boréales de l'hémisphère nord entre les latitudes 50° et 70° (O'Neill 2000) (Figure 2).

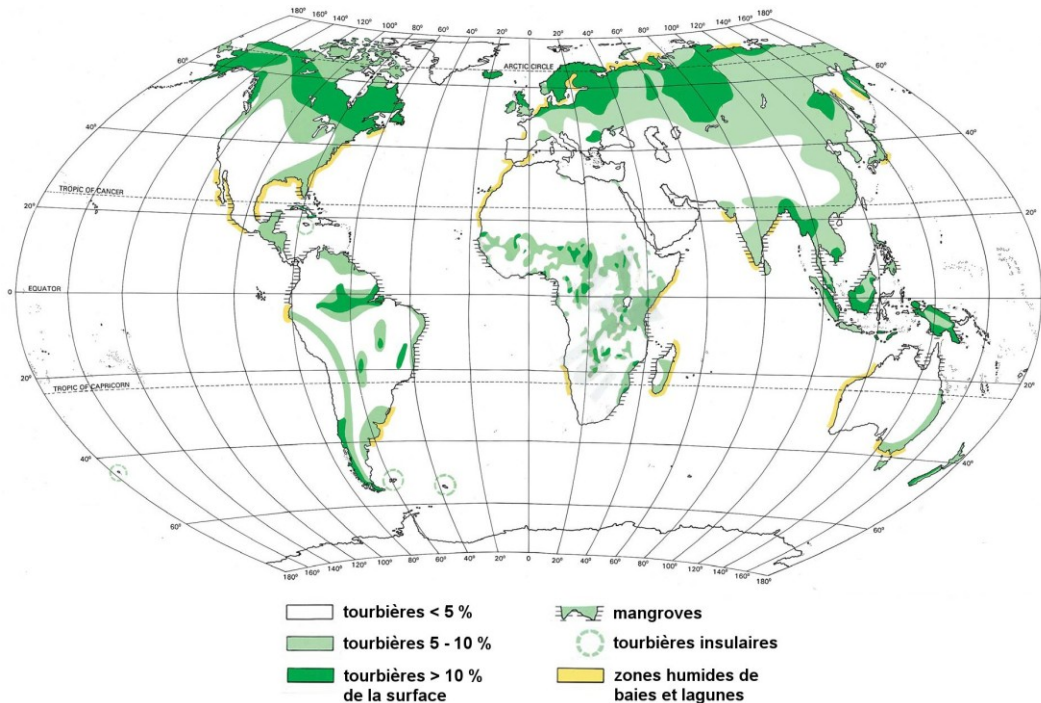


Figure 2. Etendue et répartition mondiale des tourbières (D'après Gore 1983 dans Joosten et Clarke 2002)

Les écosystèmes et agrosystèmes sont fournisseurs de services écosystémiques aux fonctions très larges (Barrios 2007). Pour les tourbières, ils sont de trois grandes catégories : support de biodiversité et régulation du fonctionnement hydrique à l'échelle du bassin-versant (habitats, immobilisation pour les contaminants, ...), réserves de ressources (combustible → tourbe ; alimentaire → canneberge, myrtille, fausse mûre,...) et sociologiques (valeur esthétique et loisirs) (Francez 2000). Les utilisations passées et actuelles des tourbières par l'Homme sont différentes selon les régions du monde. Cependant, leur exploitation intensive modifie profondément leur fonctionnement, glissant d'une fonction « puits » à une fonction « source » de C.

En région boréale, les stocks de tourbe accumulée constituent une ressource exploitée industriellement en Finlande, en Irlande, au Canada et en Russie, que ce soit comme combustible ou pour la préparation de substrat horticole (Francez 2000). Cependant, l'extraction de tourbe reste une activité mineure comparée aux transformations liées à l'agriculture (Tableau 2). Le drainage préalable aux activités agricoles et les aménagements

qui en découlent ont débouché sur une remise en circulation de 4140 à 5600 Tg de C depuis le début du 19^{ème} siècle (Armentano et Menges 1986). En France, c'est environ la moitié de la surface totale des tourbières qui a disparu en quelques décennies : passant de 120 000 ha vers 1945 à 60 000 vers 1998 (Manneville *et al.* 1999).

Tableau 2. Causes anthropiques et pertes de surface des tourbières dans le monde, régions tropicales exceptées (D'après Joosten 1999 dans Joosten et Clarke 2002)

	10 ³ km ²	%
Agriculture	250	50
Sylviculture	150	30
Extraction de tourbe	50	10
Urbanisation	20	5
Submersion	15	3
Pertes indirectes (érosion,...)	5	1
Total	490	100

En régions tropicales, la déforestation par le feu des tourbières boisées à des fins agricoles (plantations pour l'huile de palme, rizières,...), a de grandes conséquences sur la remise en circulation du C provenant de la tourbe (Jaenicke *et al.* 2008). L'exemple le plus marquant est le grand incendie de 1997 qui a détruit environ 10 millions d'ha de tourbières boisées en Indonésie. L'incendie d'origine humaine a été amplifié par El Niño et est devenu incontrôlable. Il a entraîné un relargage de 810 à 2570 Pg (1 Pg = 10¹⁵ g) de C dans l'atmosphère (Page *et al.* 2002 ; Heil *et al.* 2007). Selon ces auteurs, environ 90 % de ce C perdu sous forme de CO₂ ou de monoxyde de carbone (CO) provenait de la tourbe.

La fonction de « puits » de C des tourbières de l'hémisphère boréal et son altération sont notamment dépendantes de la disponibilité en N et en soufre (S) du milieu. Il a été démontré que les accumulations récentes et anciennes en C des tourbières étaient fortement corrélées avec les dépôts atmosphériques azotés (Turunen *et al.* 2004). Limpens *et al.* (2011) suggèrent également que les taux actuels de dépôts azotés en tourbières, dans un contexte de réchauffement climatique, entraîneraient une diminution de la capacité des Sphaignes à séquestrer le C. De même, les dépôts atmosphériques de sulfates (SO₄²⁻) entraînent une diminution, voire une suppression, des émissions de CH₄ vers l'atmosphère des tourbières de l'hémisphère boréal (Watson et Nedwell 1998 ; Dise et Verry 2001).

1.3. Changement climatique et devenir des réservoirs de carbone à l'échelle de la biosphère

Depuis la révolution industrielle, l'utilisation massive des réservoirs géologiques de C (combustibles fossiles) a entraîné le rejet de dizaines de milliards de tonnes de C dans l'atmosphère (IPCC 2007). Ce carbone est principalement rejeté sous forme de CO₂ et CH₄ (gaz à effet de serre ou GES) qui absorbent les radiations (IR) réfléchies par la surface, contribuant ainsi à une hausse de la température atmosphérique (effet de serre). Il a ainsi été constaté une hausse moyenne des températures de 0.6 °C au cours du 20^{ème} siècle et les simulations scientifiques envisagent d'ici la fin du 21^{ème} siècle une hausse moyenne des températures allant de 2 à 8 °C dans l'hémisphère boréal (IPCC 2007) (Figure 3), là où les surfaces de tourbières sont les plus importantes (Figure 2).

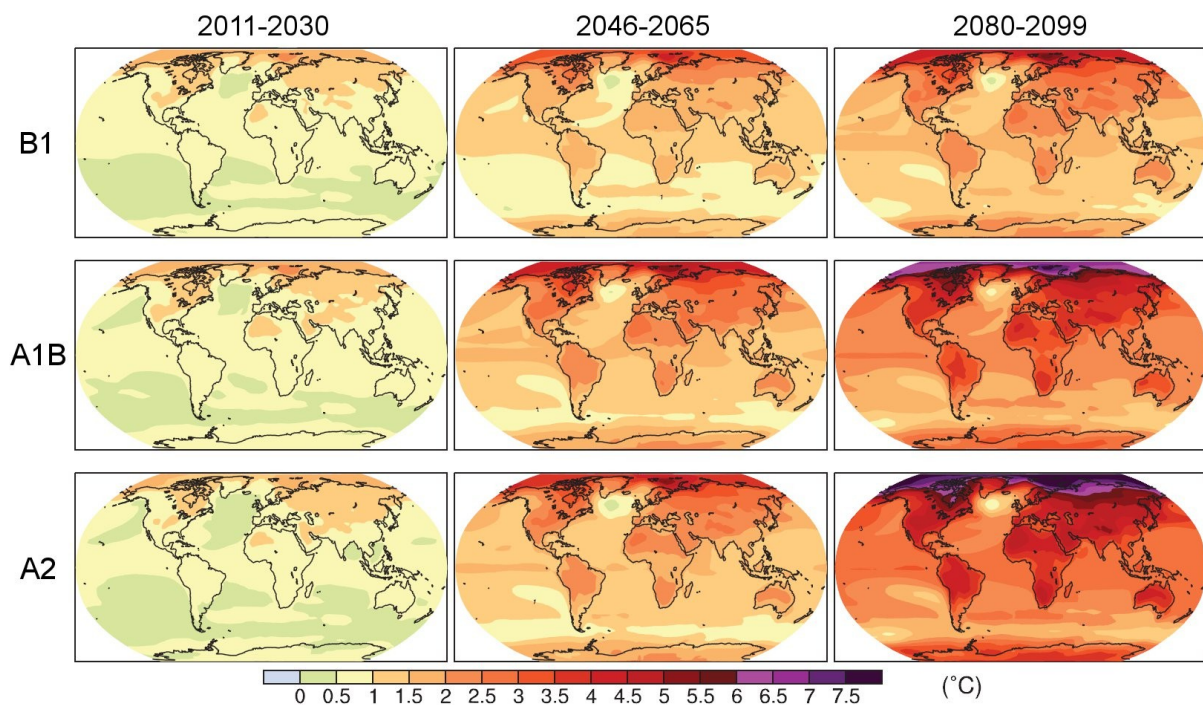


Figure 3. Projections de la hausse moyenne des températures de surface selon différents scénarios d'émissions de GES (B1 scénario « optimiste », A1B « modéré » et A2 « pessimiste ») pour les prochaines décennies (IPCC 2007)

Le réchauffement climatique entraîne par effet direct de nombreuses modifications à la surface de la Terre. C'est par exemple le cas des glaciers de montagnes et des calottes glaciaires dont la fonte pourrait faire élever le niveau de la mer de 5 cm d'ici la fin du 21^{ème} siècle (Raper et Braithwaite 2006). Les précipitations moyennes à la surface de la Terre

pourraient aussi, selon différents modèles, augmenter d'un taux de 1 à 3 % par degré Kelvin (Allen et Ingram 2002 ; Held et Soden 2006). Cependant, de nombreuses incertitudes demeurent en raison de la méconnaissance des effets indirects se manifestant en retour au facteur déclencheur, soit par amplification de la réponse (rétroaction positive), soit par atténuation de la réponse (rétroaction négative) (Lashof *et al.* 1997).

Les stocks de C organique des sols constituent un réservoir énorme de C potentiellement très sensible au réchauffement climatique, une augmentation de température pouvant activer la minéralisation d'une partie de ce stock et ainsi émettre des quantités supplémentaires de CO₂ dans l'atmosphère (Bardgett *et al.* 2008). Selon Batjes (1996) et Baudin *et al.* (2007), les quantités de C organique contenues dans les sols seraient comprises entre 1500 et 2500 Pg, soit environ 2 à 3 fois la quantité de C contenue dans l'atmosphère. Selon Gorham (1991), 455 Pg de C seraient actuellement stockés dans les tourbières, soit environ 20 à 30 % des stocks de C des sols mondiaux. De ce fait, il paraît primordial de connaître la réponse au changement climatique des sols et plus particulièrement des sols « organiques », tels que les tourbières, de par leurs importantes réserves de C susceptibles d'être libérées sous forme de CO₂ ou CH₄, ce dernier ayant un effet 25 fois plus radiatif que le premier. Cette nécessité est d'autant plus vraie que les rétroactions attribuées aux sols organiques ne sont pas, ou très peu, pris en compte dans les modèles de prévision climatique (IPCC 2007).

1.4. La régénération des tourbières abandonnées après exploitation

Dans un contexte global de perturbations anthropiques toujours croissantes des écosystèmes naturels, l'unique conservation de ces écosystèmes ne suffit plus. La restauration écologique peut ainsi se révéler un complément essentiel à la conservation, permettant sous certaines conditions la régénération écologique de l'écosystème (Aronson et Le Floch 1996). Dans le cas des tourbières, l'objectif majeur est plutôt de réinitier une dynamique, celui-ci étant donc dépendant du stade de dégradation de l'écosystème. Cette dynamique ne peut être relancée que si les conditions écologiques nécessaires au développement d'une végétation tourbigène (productrice de tourbe) sont restaurées (Rocheport 2000). Les tourbières de l'hémisphère boréal ne sont pas, contrairement à ce qu'il a été longtemps reconnu, des écosystèmes résistants face aux perturbations environnementales (Lachance et Lavoie 2004). Ce sont des écosystèmes qui présentent peu de résilience, c'est-à-dire qui possèdent peu de capacités à

retrouver un fonctionnement normal après avoir subi une perturbation importante, comme le drainage, l'extraction de tourbe ou la fauche des végétaux (Andersen *et al.* 2006 ; Zacheis et Doran 2009).

Le retour à un fonctionnement « puits » des tourbières abandonnées après exploitation est possible sous réserve de restaurer le fonctionnement hydrologique de l'écosystème. Dans ce cas, certaines plantes pionnières comme les linaigrettes (*Eriophorum spp*) colonisent rapidement les surfaces de tourbe ré-humectée et contribuent à la régénération de la fonction d'accumulation de tourbe (Komulainen *et al.* 1999 ; Waddington *et al.* 2010). Des vers de terre peuvent également coloniser les tourbières anciennement exploitées. C'est par exemple le cas de l'espèce *Lumbricus rubellus*, un ver de terre épi-anécique typique de sols organiques (Makulec 1993 ; Curry & Schmidt 2006), dont les sécrétions d'N et de S labiles peuvent être transformés par les communautés microbiennes de la tourbe (Gicquel *et al.* 2012). Le rôle clé de ces animaux dans le recyclage de la matière organique permettrait de favoriser un retour plus rapide à la fonction de « puits » de C des tourbières anciennement exploitées en accélérant la remise à disposition des nutriments pour la végétation.

Il paraît donc évident que les différentes composantes biotiques ont un rôle majeur à jouer dans la régénération des tourbières de l'hémisphère boréal. Le passage à un fonctionnement « source » de C pouvant être accéléré ou ralenti par l'activité des micro-macroorganismes et plantes qui peuplent la tourbière, et qui représentent des voies privilégiées de décomposition ou d'accumulation de la matière organique.

2. Interactions biotiques et transformations biogéochimiques dans les écosystèmes

Une interaction biotique désigne une relation dynamique entre deux ou plusieurs organismes au sein d'une même biocénose. Les transferts de matières et d'énergie sont perpétuels et peuvent être établis entre des individus d'une même espèce (interactions intraspécifiques) ou d'espèces différentes (interactions interspécifiques) (Ricklefs et Miller 2000). Le cycle biogéochimique représente la circulation permanente d'un élément ou d'une molécule entre les grands réservoirs que sont la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère, et dans lesquels se retrouve la biosphère (Bolin et Cook 1983). Un tel cycle au sein de la biosphère induit pour la majorité des éléments des passages de l'état organique à l'état minéral.

2.1. Les acteurs de transformations biogéochimiques : de l'individu à l'écosystème

2.1.1. Les sphères d'influences dans le sol

Le sol renferme une grande partie de la biodiversité présente sur Terre et joue un rôle majeur dans les processus intervenant dans les cycles de la matière, de l'énergie et des nutriments (Wolters 1997 ; Griffiths *et al.* 2000). La biomasse du sol présente dans les 25 premiers cm de la couche de surface transforme de 10 à 1000 tonnes de MO fraîche par hectare et par an (de Ruyter *et al.* 2002).

Le sol est un milieu très hétérogène en raison de l'interaction de nombreux facteurs biotiques (prédation, compétition, ...) et abiotiques (T°C, pH, disponibilité des nutriments, ...) (Franklin et Mills 2003). D'après Lavelle et Spain (2001), l'hétérogénéité des sols se décline à 3 niveaux : i) une hétérogénéité spatiale qui s'exprime de l'échelle continentale à celle des micro-agrégats, ii) une hétérogénéité temporelle due aux différentes échelles de temps auxquelles se déroulent les processus biogéochimiques supportés par le sol, et iii) une hétérogénéité fonctionnelle liée à la diversité des processus intervenant au sein des écosystèmes. Ces variations génèrent des habitats et des niches écologiques variés, qui donnent lieu à une large palette de biodiversité (Jeffery *et al.* 2010). Les biologistes du sol divisent le *biota* en 3 groupes selon la taille des organismes : la microfaune/flore, la mésofaune et la macro/mégafaune (Figure 4). Cette classification reflète la capacité des organismes à circuler dans les pores du sol selon leur taille.

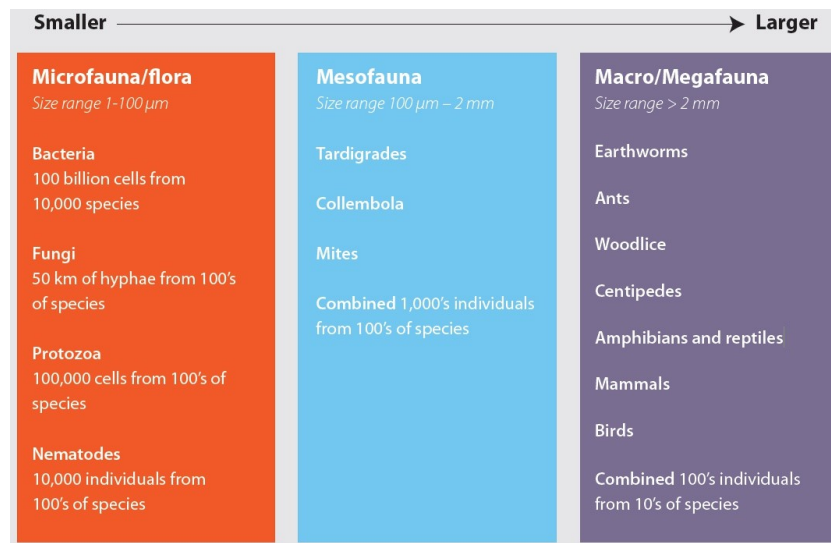


Figure 4. Biodiversité du sol et classes de taille des organismes (Jeffery *et al.* 2010)

La distribution hétérogène des organismes du sol se situe à différentes échelles spatiales dépendant de la taille des individus. Les domaines fonctionnels représentent les zones du sol influencées par un « régulateur majeur », biotique ou abiotique, et opèrent à différentes échelles spatiales et temporelles (Beare *et al.* 1995 ; Lavelle 2002). Chaque structure existant dans le sol appartient à un domaine fonctionnel particulier. Selon Beare *et al.* (1995), il en existe au nombre de 5 que l'on nomme « sphères fonctionnelles » (Figure 5) :

- i) La détritosphère correspond à la litière, aux cadavres d'animaux et à la zone du sol influencée par ces derniers. Elle abrite une forte activité microbiologique (bactéries et champignons) de décomposition de la MO (Poll *et al.* 2006) ainsi qu'une partie de la mésofaune du sol (enchytréides et microarthropodes) ;
- ii) La porosphère correspond à l'agencement des pores remplis d'eau et/ou d'air avec la matière dans le sol. Elle abrite aussi bien des petits organismes vivant dans les films d'eau comme les protozoaires que de plus gros organismes vivant en aérobie (mésofaune) (Beare *et al.* 1995 ; Lavelle et Spain 2001) ;
- iii) L'agrégatosphère correspond à l'ensemble des agrégats du sol. Ce sont des particules de sol regroupées ensemble et de tailles variables. Ils représentent l'habitat principal des microorganismes (de Ruyter *et al.* 2002 ; Six *et al.* 2004) ;
- iv) La rhizosphère correspond à la zone d'influence directe des racines ;
- v) La drilosphère correspond à la zone de sol influencée par l'activité des lombriciens incluant le ver de terre lui-même (son microenvironnement interne et sa surface externe en

contact avec le sol), les turricules (déjections de surface) et les galeries qu'ils forment (Lavelle 1988).

Certaines de ces sphères fonctionnelles constituent des zones où l'activité microbienne peut être fortement stimulée, elles sont alors qualifiées d'« hot spots » (Brown *et al.* 2000 ; Bundt *et al.* 2001).

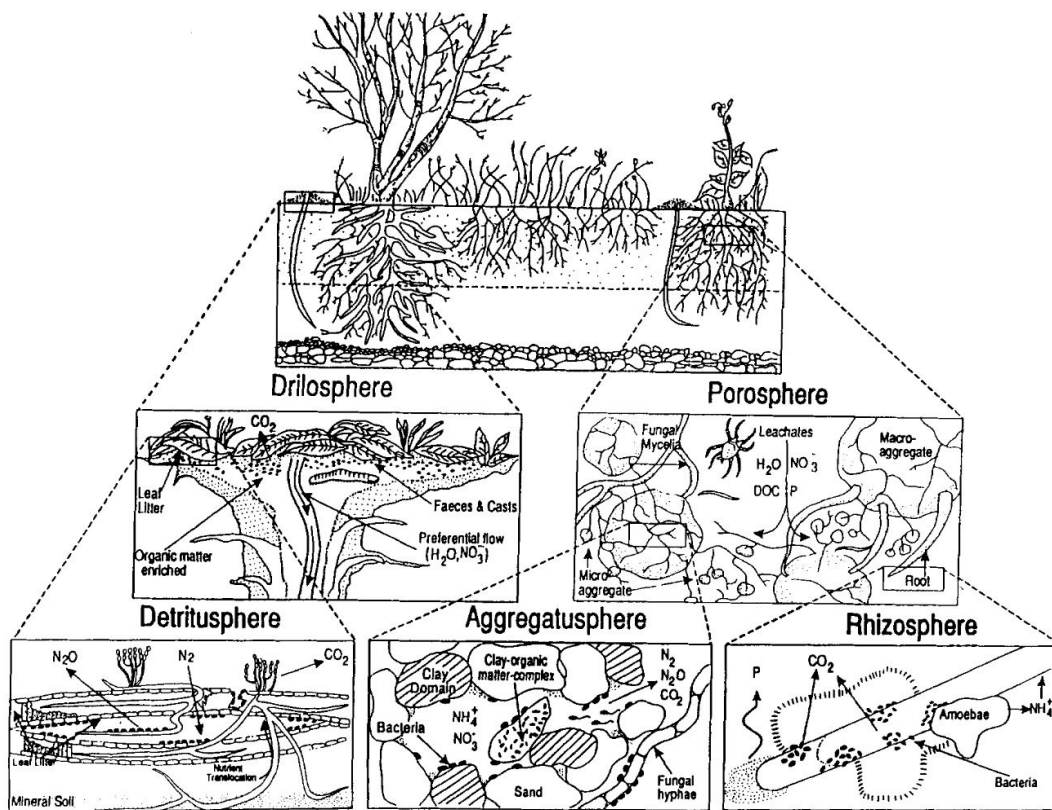


Figure 5. Vue hiérarchique des différentes sphères fonctionnelles des sols (Beare *et al.* 1995)

2.1.2. Les organismes ingénieurs

Certains organismes par leurs impacts sur la structure physique, les propriétés chimiques et la redistribution des nutriments des sols sont appelés « ingénieurs d'écosystèmes » (Jones *et al.* 1994 ; Jones *et al.* 1997). Dans les sols il s'agit principalement des vers de terre, des termites et des fourmis qui ont leurs propres sphères fonctionnelles : respectivement la drilosphère, la termitosphère et la myrmécosphère. Ces organismes constituent la composante principale de la macrofaune des sols (Lavelle et Spain 2001). Ils créent des biostructures (turricules et galeries) qui en modifiant les formes et la disponibilité des nutriments génèrent des « hot-spots » d'activité microbienne (Binet *et al.* 1998 ; Brown *et al.* 2000). Lavelle (2002) propose

une approche plus hiérarchique en intégrant les ingénieurs d'écosystèmes dans les « régulateurs » biotiques, c'est-à-dire l'ensemble des organismes qui créent des biostructures dans le sol comme les racines des plantes.

Les plantes sont des ingénieurs d'écosystèmes efficaces qui créent deux sphères fonctionnelles : la rhizosphère des racines et le système « litière » (détritosphère) formé par l'accumulation de parties aériennes et de feuilles mortes sur le sol (Lavelle 2002). Comme les lombriciens (Le Bayon et Binet 1999 ; Decaëns 2000), elles produisent de grandes quantités de structures organo-minérales biogéniques qui peuvent demeurer longtemps dans le sol après leur mort (Goss 1991). Les vers de terre par leurs réseaux de galeries ou les plantes par leurs pores racinaires, peuvent modifier l'hydrologie des sols et leurs fonctionnements biogéochimiques. En effet, les macropores créés sont des voies préférentielles d'infiltration d'eau et d'échanges de gaz (Edwards et Shipitalo 1998). Ils peuvent favoriser le lessivage de nitrates (NO_3^-) et de DOC (Edwards *et al.* 1989) ou l'adsorption sur leurs parois de molécules comme l'atrazine (pesticide) (Binet *et al.* 2006). Au final, les sphères fonctionnelles créées par ces organismes constituent des milieux favorables à des échanges de nutriments dans les écosystèmes.

2.1.2.1. Les ingénieurs autotrophes

L'autotrophie désigne la capacité de certains organismes à fabriquer de la MO (production primaire) en procédant à la réduction d'une source de carbone inorganique (CO_2) à partir d'une source d'énergie externe comme la lumière (photoautotrophie des végétaux chlorophylliens) ou par oxydations de composés réduits (chimioautotrophie de certaines bactéries). La plante assimile le CO_2 au niveau de ses parties aériennes grâce au processus de photosynthèse. Le C est ensuite intégré dans des composés plus ou moins polymérisés (hexoses, amidon, ...). Dégradés en trioses, ces glucides sont ensuite stockés dans la plante sous forme de réserves ou utilisés pour la croissance et l'entretien des organes.

Ainsi, les plantes jouent un rôle de pourvoyeur de C dans l'activité biologique du sol en alimentant ce dernier en C organique (Figure 6). Le développement et l'activité des organismes du sol, et plus particulièrement des microorganismes, sont souvent limités par la disponibilité en C organique facilement assimilable. On peut distinguer 2 voies d'entrées du C dans le sol depuis la plante :

i) Par la décomposition de la MO des parties aériennes qui tombent sur le sol (détritosphère). Cette voie représente de 60 à 90 % de la quantité de C qui entre dans le sol (Grayston *et al.* 1997) ;

ii) Par libération au niveau de la rhizosphère (rhizodéposition). Cette voie représente de 10 à 40 % de la quantité de C entrant dans le sol (Grayston *et al.* 1997 ; Nguyen 2003).

Le terme de « rhizosphère » a été introduit pour la première fois par Hiltner en 1904. Cet auteur avait constaté une plus grande quantité de microorganismes dans la zone à proximité des racines que dans le reste du sol. La rhizosphère occupe en général entre 1 et 4 % du volume de sol superficiel en fonction du type de végétation (Killham 1994). Pour certains auteurs, la rhizodéposition correspond à l'ensemble des processus permettant une entrée de C dans le sol (Jones *et al.* 2009) : i) pertes de cellules à l'apex des racines, ii) mort et lyse des cellules des racines, iii) flux de C par les symbiontes en associations avec les racines (ex. mycorhizes), iv) pertes sous formes gazeuses (CO_2 , éthylène C_2H_4 et cyanure d'hydrogène HCN), v) transferts de solutés (exsudats racinaires comme les glucides ou les acides aminés) et vi) sécrétion de polymères insolubles (mucilage). D'après Jones *et al.* (2009), le processus de rhizodéposition en prairies apporterait au sol une quantité de C comprise entre 1.2 et 60 g.kg^{-1} de sol.an^{-1} . En tourbières, les études sur les flux de C des plantes vers la tourbe sont beaucoup plus rares. Richert *et al.* (2000) estiment les quantités de C transférées par *Phragmites australis* (roseau commun) en fen eutrophe à 450 $\text{kg.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$, soit environ 2 fois moins que les transferts estimés avec une culture de blé (Swinnen *et al.* 1994).

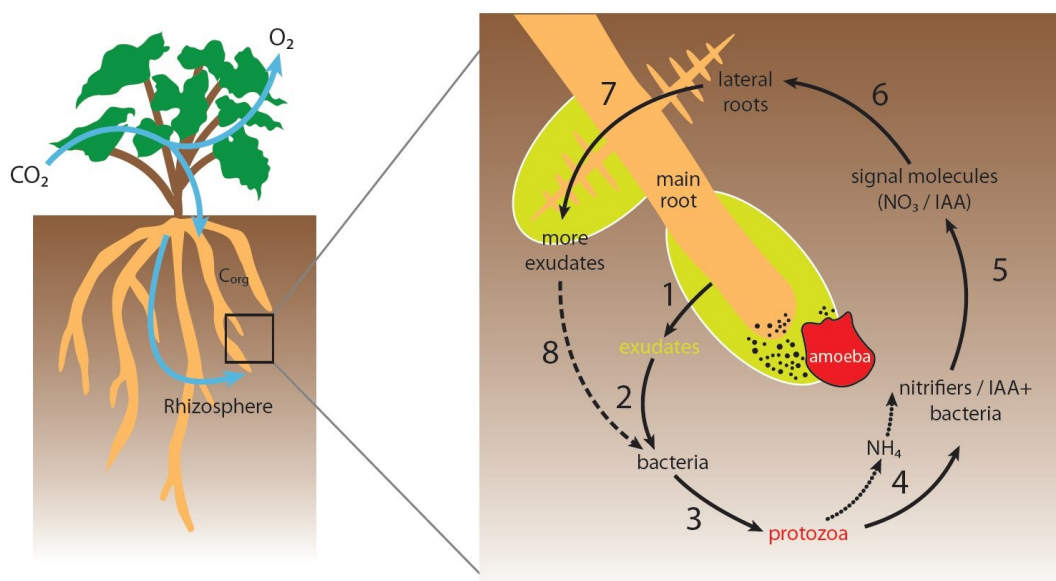


Figure 6. Modèle conceptuel présentant les boucles de rétroactions dans la rhizosphère avec les microorganismes (bactéries et protozoaires) (D'après Bonkowski 2004 dans Jeffery *et al.* 2010)

Les études sont relativement plus rares pour l’N et le S. En sol agricole, les transferts de N par rhizodéposition sont de l’ordre de $15 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ (Merbach *et al.* 1999). Les plantes, par l’intermédiaire de leurs rhizodépôts, peuvent également affecter la communauté bactérienne productrice d’arylsulfatase (enzyme qui hydrolyse les esters de sulfates en sulfates), et par conséquent influencer la dynamique du S du sol (Cregut *et al.* 2009).

Nous avons utilisé comme modèles biologiques autotrophes les sphaignes (*Sphagnum fallax* et *S. magellanicum*) et les végétaux vasculaires *Andromeda polifolia*, *Eriophorum vaginatum* et *Eriophorum angustifolium*. Ces végétaux qui appartiennent à deux groupes fonctionnels distincts (mousses et végétaux vasculaires) ont des métabolismes et des capacités de fixation du CO_2 différentes. Ils peuvent donc avoir des réponses différentes aux changements globaux. Les *Eriophorum* présentent également une spécificité morphologique qui leur fait jouer un rôle majeur dans les flux de C en tourbières. Les aérénchymes des linaigrettes jouent le rôle de « cheminée » en permettant au CH_4 formé en profondeur de ne pas être intercepté par les bactéries méthanotrophes situées plus en surface (Greenup *et al.* 2000 ; Ström *et al.* 2003 ; Ström *et al.* 2005). On parle alors d’un effet physique passif des *Eriophorum spp* sur les flux de C.

2.1.2.2. Les ingénieurs hétérotrophes

Contrairement aux végétaux chlorophylliens, les animaux produisent leur MO uniquement à partir de sources de C organique issu de la biosynthèse végétale ou animale (hétérotrophie). Les invertébrés du sol occupent une position stratégique au sein des structures et des processus qui relient les processus microbiens aux échelles supérieures. On peut rapporter aux hétérotrophes, comme les vers de terre, des rôles majeurs dans les flux de C (Binet et Curmi 1992 ; Tiunov et Scheu 1999 ; Jégou *et al.* 2000) ou d’N (Binet et Tréhen 1992 ; Whalen *et al.* 1999 ; Bohlen *et al.* 2004).

i) Les lombriciens :

Les vers de terre (Annélides Oligochètes) constituent la composante dominante de la faune des sols tempérés (Lavelle *et al.* 1998). Il en existe plus de 5000 espèces et on en trouve dans tous les sols du monde y compris en Antarctique (Jeffery *et al.* 2010). En prairies tempérées

on en dénombre de 600 à 700 individus.m⁻² correspondant à une biomasse de plus de 1000 kg.ha⁻¹ (Binet 1993). En prairie tourbeuse et en tourbière on retrouve l'espèce *Lumbricus rubellus* H. dont l'abondance peut varier de 8 à 600 individus.m⁻² selon le degré d'exploitation de la tourbière (Makulec 1993, Curry & Schmidt 2006).

Les vers de terre ont développé différentes stratégies adaptatives basées sur leurs caractéristiques morphologiques, comportementales et physiologiques. Ainsi, Bouché (1971 ; 1977) les a classés en 3 catégories écologiques différentes (Figure 7) :

- i) Les épigés sont des vers de terre de petite taille (1 à 5 cm en général) qui vivent principalement dans la litière (parfois dans les premiers cm du sol) et qui ne créent pas ou très peu de galeries. Ils sont soumis à la forte stochasticité environnementale qui prévaut dans la couche supérieure du sol (variation de T°C et d'humidité, qualité et quantité ressource alimentaire, prédation, ... ; Bouché 1977) mais ils contrecarrent leur forte mortalité par une croissance rapide (maturité sexuelle à 45 jours) et une fécondité élevée (100 cocons.an⁻¹). Ce sont des stratégies « r » selon Satchell (1980).
- ii) Les anéciques sont des vers de terre de taille moyenne pouvant néanmoins atteindre des tailles gigantesques en milieux tropicaux (10 à 110 cm). Ils vivent de façon permanente dans des galeries verticales ou sub-verticales qui peuvent atteindre de 5 à 6 m de longueur (Jeffery *et al.* 2010). Ces dernières sont connectées à la surface où les vers de terre se nourrissent de litière. Les anéciques se caractérisent par une forte musculature et une grande activité fousseuse. Ils assurent ainsi un mélange intime de la MO et de la fraction minérale des différents horizons du sol. Ils peuvent vivre longtemps mais ont une fécondité faible (12 cocons.an⁻¹) et une maturité sexuelle atteinte au bout de 9 mois (stratégie « K » ; Satchell 1980).
- iii) Les endogés sont des vers de terre de taille variable (1 à 20 cm) qui vivent en profondeur (30 cm) où ils creusent des galeries d'orientations quelconques. Ce sont des géophages qui se nourrissent de MO incorporée dans le sol et qui ne remontent presque jamais à la surface. Comme les anéciques, ce sont des vers de terre qui présentent une stratégie « K » avec une longévité intermédiaire aux épigés et aux anéciques et un temps de génération court.

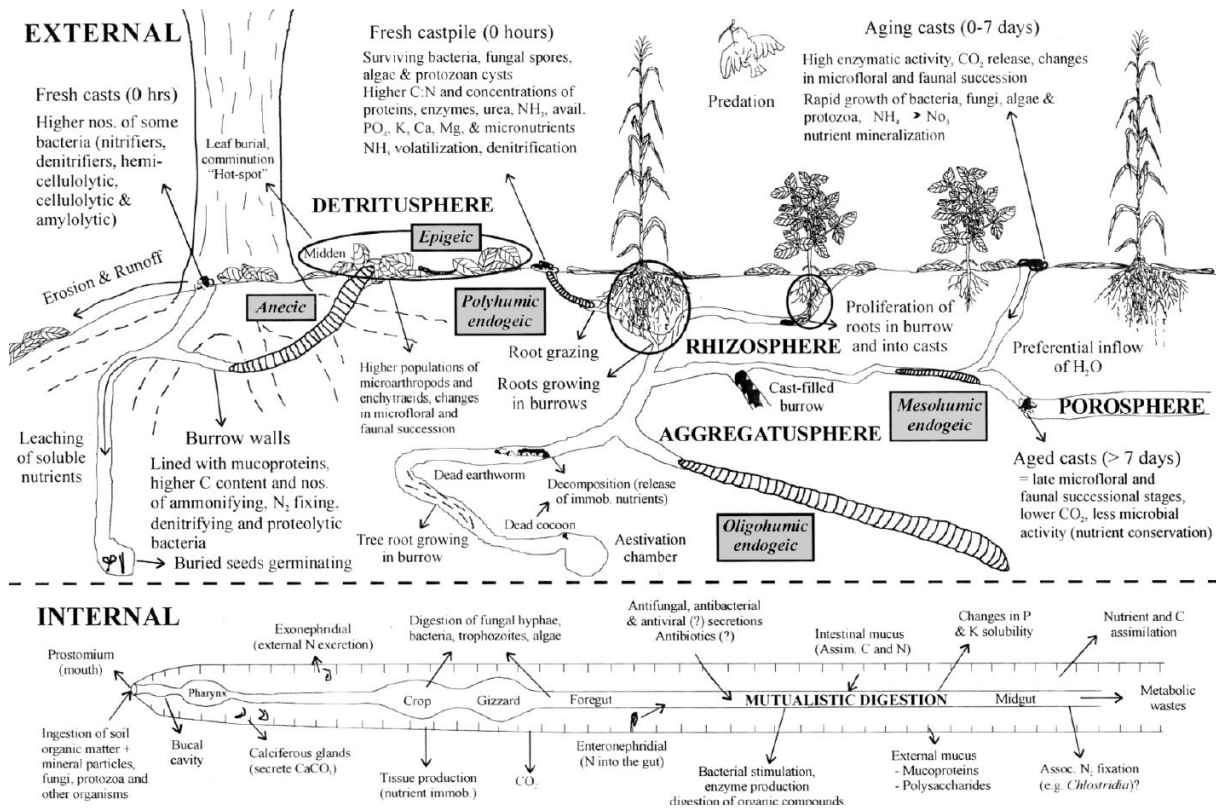


Figure 7. Représentation schématique des composantes interne et externe de la drilosphère et leurs liens avec les autres sphères fonctionnelles du sol (Brown *et al.* 2000)

ii) La bioturbation et les biostructures lombriciennes :

La drilosphère est composée de différents microsites issus de l'activité de bioturbation des vers de terre (turricules, galeries et middens) ainsi que de leur environnement interne (tube digestif) et le mucus tapissant leur corps (Lavelle 1988). Les vers de terre assimilent leurs nutriments et leurs énergies avec des efficacités variables selon les espèces et les matériaux ingérés. Ainsi en moyenne, ils ont besoin d'ingérer de 10 à 30 fois leur propre poids pour survenir à leurs besoins calorifiques journaliers (Jeffery *et al.* 2010). Les vers de terre se nourrissent de MO prélevée dans le sol ou en surface mais ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour digérer les cellules végétales (Brown *et al.* 2000). La digestion est assurée par des microorganismes symbiotiques qui vivent dans leur tube digestif (Figure 7). Les caractéristiques physico-chimiques du tube digestif des vers de terre en font un habitat idéal pour le développement de microorganismes réalisant des métabolismes anaérobies et fermentatifs. Il a ainsi été démontré que les vers de terre pouvaient rejeter jusqu'à 30 % du protoxyde d'azote (N₂O) total émis par le sol (Matthies *et al.* 1999). Ce N₂O est un GES ayant un effet radiatif environ 300 fois plus élevé que le CO₂.

Pour se déplacer dans le sol, les vers de terre forment des galeries en se fauflant par compaction latérale ou en ingérant et en relarguant le sol au fur et à mesure de leur progression (Keudel et Schrader 1999). Les galeries sont tapissées de mucus épidermique, de déjections déposées au cours des passages successifs des vers de terre et peuvent renfermer des morceaux de litière (Binet et Curmi 1992). Les pores créés favorisent également le développement des racines de plantes (Brown *et al.* 2000). Les parois de galerie sont riches en N minéral (NH_4^+ et NO_3^-) et en bactéries transformant l'N (Binet et Tréhen 1992 ; Parkin et Berry 1999 ; Tiunov et Scheu 1999 ; Jégou *et al.* 2001). Elles sont également plus riches en C organique ($\times 1.8-3.5$; Tiunov et Scheu 1999) et C total ($\times 1.1$; Jégou *et al.* 2001), ainsi qu'en P organique et total ($\times 1.1-1.2$; Le Bayon et Binet 2006) que le sol environnant non bioturbé. Le C d'origine biogénique se présente majoritairement sous forme de polysaccharides provenant des cellules chlorogènes des vers de terre (Scheu 1991 ; Zhang et Schrader 1993).

Le sol ingéré par le ver de terre est ensuite relargué sous forme de déjections appelées turricules. Ces derniers sont déposés à la surface du sol ou le long des parois de galeries (Brown *et al.* 2000). La production de turricules en sols tempérés varie de 2 à 250 t.ha⁻¹.an⁻¹, selon les espèces et la physiologie des vers de terre (Lee 1985). Comme les parois de galeries, les turricules sont plus riches en C total ($\times 1.1-1.3$; Daniel et Anderson 1992 ; Jégou *et al.* 2001), en N total ($\times 1.1-1.2$; Parle 1963 ; Jégou *et al.* 2001) et en P organique et total ($\times 1.1-1.2$; Le Bayon et Binet 2006) que le sol environnant. Ces résultats indiquent une ingestion sélective des vers de terre et démontrent la forte implication de ceux-ci dans les cycles des nutriments dans les sols.

Globalement les galeries et turricules sont des milieux riches en nutriments qui font d'eux des habitats privilégiés pour les microorganismes du sol. De nombreuses études ont permis de quantifier les transferts de C et N biogéniques que réalisaient les vers de terre en sols de prairie ou de culture (Bouché 1984 ; Binet et Tréhen 1992 ; Zhang et Hendrix 1995 ; Whalen et Parmelee 2000). Ainsi, Curry *et al.* (1995) ont estimé que le ver de terre *Lumbricus terrestris* en sol agricole, par ses excréments azotés et son mucus, fournissait au sol de 2.9 à 3.6 g de N.m⁻².an⁻¹. En sols tourbeux, les études sont plus rares et quasi inexistantes pour le S qui est pourtant un élément chimique entrant dans la synthèse d'acides aminés indispensable à la vie (cystéine et méthionine). Grethe *et al.* (1996) ont montré que *L. terrestris* et *Aporrectodea caliginosa* via leur activité alimentaire et bioturbatrice pouvaient augmenter le

S total du sol. Cependant, aucune quantification de transferts de S des vers de terre vers le substrat n'a été évaluée à ce jour.

iii) Les enchytréides :

Les enchytréides (Annélides Oligochètes) sont des vers apigmentés de petite taille (2 à 20 mm) qui peuvent également intervenir de façons directes ou indirectes dans les processus de décomposition de la MO et de redistribution des nutriments (Williams et Griffiths 1989). Directement, en consommant une grande quantité de MO (Cole *et al.* 2000) et, indirectement, par les biostructures qu'ils créent et par leur activité trophique qui affectent les activités microbiennes des sols (Cole *et al.* 2000 ; Bardgett 2005). Ils peuvent ainsi augmenter de 18 % les quantités de NH_4^+ et NO_3^- du milieu (Abrahamsen 1990) et augmenter de 8 % la minéralisation du C sol (transferts de DOC vers la solution du sol ; Cole *et al.* 2002a). Ces organismes représentent la majorité de la mésofaune des tourbières à Sphaignes (Coulson et Whittaker 1978), dont l'abondance peut varier de 1 à 30×10^3 individus.m⁻² selon les périodes de l'année en bog (Cole *et al.* 2002b).

Dans ce travail de recherche, nous avons utilisé l'espèce lombricienne *Lumbricus rubellus* comme modèle de la macrofaune afin d'évaluer son impact dans la redistribution des nutriments C, N et S du système tourbe. Ce ver de terre épi-anécique, qui crée des galeries verticales permanentes dans les premiers cm de tourbe, est une espèce clé de tourbières ré-humectées après exploitation. Nous nous sommes également intéressés aux rôles que pouvaient jouer les enchytréides dans de tels processus de redistribution des nutriments ainsi que leurs interactions avec les plantes.

2.1.3. Les microorganismes et la boucle microbienne

Les microorganismes sont les principaux acteurs de la décomposition de la MO fraîche et de la minéralisation des éléments. Ils sont rassemblés dans un réseau trophique original : la boucle microbienne (Figure 8) (Gilbert *et al.* 1998). Les plantes dans un premier temps fournissent aux bactéries hétérotrophes une source de C via la lyse des cellules mortes de la litière ou la libération d'exsudats au niveau de la rhizosphère (MO dissoute). Ces bactéries sont ensuite la proie de protistes hétérotrophes, essentiellement constitués d'amibes à thèques,

de ciliés et de flagellés en tourbières à Sphaignes (Gilbert et Mitchell 2006). En retour, les excréments et les cadavres de ces protistes hétérotrophes viennent enrichir le stock de MO disponible aux bactéries hétérotrophes. Ces interactions permettent une mise à disposition de nutriments assimilables par la plante qui ne le seraient pas sans la boucle microbienne.

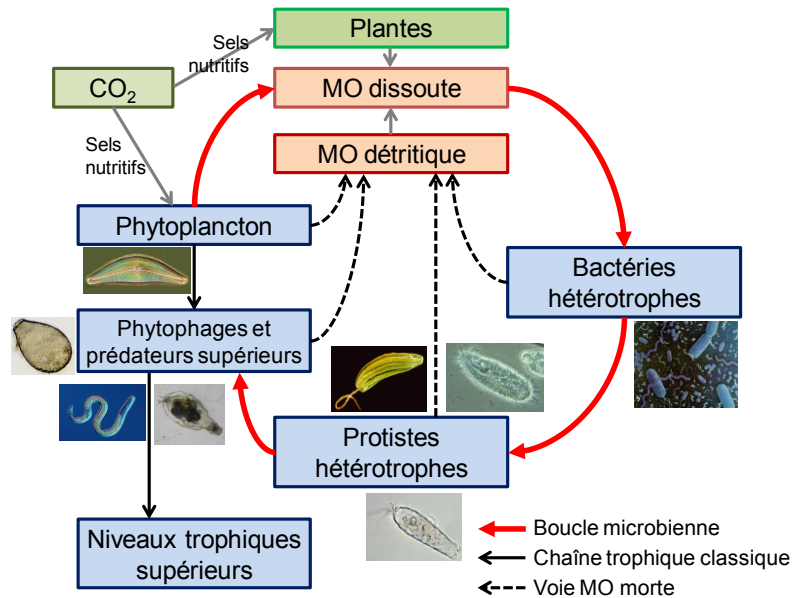


Figure 8. Représentation schématique de la boucle microbienne en tourbière à Sphaignes

Le concept de boucle microbienne a récemment été enrichi par l'adjonction des groupes des virus (boucle virale) et des champignons (Bonkowski 2004). Ces derniers, en tourbières, peuvent être broutés par des microarthropodes mycophages comme les collemboles et les oribates (Gobat *et al.* 2010). La boucle microbienne en tourbière, et plus généralement dans les sols, accélère le cycle du C et des autres éléments, principalement en raison du fait que les produits d'exsudations des plantes et des autres organismes phototrophes, comme les microalgues, sont beaucoup plus disponibles que la MO détritique du milieu (Panikov 2010).

2.1.4. Les traits fonctionnels et différences autotrophes - hétérotrophes

Les propriétés des écosystèmes sont fortement influencées par les traits des espèces qu'ils abritent. Il est donc nécessaire de différencier et évaluer les traits biologiques, fonctionnels et comportementaux des organismes afin de démêler leur rôle dans le fonctionnement de l'écosystème (Hooper *et al.* 2005). Les deux ingénieurs d'écosystèmes que sont la plante et le

ver de terre, se distinguent par l'expression de traits biologiques et fonctionnels différents. Les plantes par leur statut autotrophe sont des organismes qui jouent un rôle majeur dans la dynamique du C du sol à travers la rhizodéposition (Nguyen 2003). Bien que les vers de terre peuvent également agir sur la dynamique du C en enfouissant de la MO en profondeur (Binet et Curmi 1992 ; Jégou *et al.* 2000), leur statut hétérotrophe contribue avant tout à un apport important de N dans le sol via l'excrétion d'urée et d'ammonium (Binet et Tréhen 1992 ; Whalen *et al.* 2000 ; Bohlen *et al.* 2004). Comparativement aux organismes hétérotrophes, de nombreuses études se sont intéressées aux traits biologiques et fonctionnels des plantes (Lavorel et Garnier 2002 ; Garnier *et al.* 2007 ; Kattge *et al.* 2011). Ward *et al.* (2009) ont ainsi montré que les groupes fonctionnels de plantes en tourbières (arbustes, mousses et graminées) influençaient l'absorption et les flux de C à court terme (de l'ordre de l'année). Ces résultats montrent que dans un contexte de changement climatique il est important prendre en compte les modifications de structure des communautés pour établir un modèle du cycle du C et ainsi intégrer les différentes capacités d'absorption des plantes.

2.1.5. Les interactions biotiques et le couplage des cycles C-N-S

Le sol est comparé à une « boîte noire » dont on ne connaît pas les mécanismes internes. Cette boîte noire est inaccessible de façon momentanée ou permanente, et la fonction apparente n'est connue qu'à partir des flux d'entrées et de sorties (Tate 1995). Pour palier à ce manque de connaissance, les traceurs isotopiques constituent des outils puissants d'investigation. Ils sont utilisés dans de nombreux domaines scientifiques comme la chimie, la biochimie, l'hydrochimie et la géologie afin de mieux comprendre certaines réactions chimiques, interactions ou la cinétique environnementale de certains éléments.

2.1.5.1. L'approche par les isotopes stables

Certains éléments du tableau périodique possèdent un ou plusieurs isotopes qui sont des atomes possédant le même nombre de protons mais qui diffèrent en termes de neutrons. On différencie alors les « éléments légers » (ex. ^{12}C) aux « éléments lourds » (ex. ^{13}C ou ^{14}C) qui sont des isotopes possédant plus de neutrons. Il existe deux catégories de traceurs isotopiques : les isotopes radioactifs et les isotopes stables. Les premiers se désintègrent spontanément et se transforment en nouveaux atomes plus légers en émettant un rayonnement

(α , β et γ) que l'on détecte dans des phototubes, compteurs de radioactivité. Les seconds ne se désintègrent pas, ils restent stables et sont détectés en mesurant leurs masses spécifiques à l'aide d'un spectromètre de masse. Les isotopes radioactifs et stables sont présents dans la nature à différentes abondances. Par exemple les isotopes stables ^{12}C et ^{13}C représentent respectivement 98.9 et 1.1 % de l'abondance isotopique du C. L'isotope radioactif ^{14}C est lui retrouvé sous forme de traces dans la nature. Les avancées technologiques de ces dernières décennies, en termes de détection et de quantification, ont permis de démocratiser l'utilisation des isotopes stables. Ils possèdent par rapport aux isotopes radioactifs l'avantage d'être moins toxiques pour la santé et plus facilement manipulables.

L'utilisation des isotopes stables en écologie fonctionnelle repose sur le fait qu'il n'y a pas, ou très peu, de différence dans les processus de transferts des différentes formes d'isotopes composant un élément (Powlson et Barraclough 1993), c'est-à-dire que les flux estimés pour les isotopes « lourds » sont représentatifs des flux globaux de l'ensemble des isotopes de l'élément. Dans ce travail de recherche, nous avons utilisé conjointement les isotopes stables ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S pour pouvoir quantifier les flux d'éléments entre les différents compartiments biotiques de nos systèmes. Pour cela, nous avons enrichi des organismes (plantes et vers de terre) ou apporté directement les traceurs dans l'eau du milieu. Le marquage des organismes a été réalisé par la technique de « pulse-chase labelling ». Cette méthode s'oppose à celle du « long-term labelling » qui a longtemps été utilisée pour le marquage des vers de terre avec des durées d'enrichissements allant de 30 à 730 jours via l'apport de litière marquée (Bouché 1984 ; Scheu 1991 ; Binet et Tréhen 1992 ; Whalen *et al.* 1999). La méthode de pulse-chase labelling (quelques jours de marquage), d'abord mise au point pour l'étude des processus biogéochimiques au niveau de la rhizosphère (Meharg 1994), permet aussi bien de marquer des pools à turnover rapide que des pools à turnovers plus longs si on répète l'opération d'ajouts de traceurs dans le temps (Dyckmans *et al.* 2005).

Avec le développement des nouvelles technologies, les échelles d'investigations pour tracer les flux d'éléments dans des milieux complexes comme le sol se sont multipliées (Tiunov 2007). A travers ce travail de recherche, nous avons ainsi effectué des analyses isotopiques (^{13}C - ^{15}N - ^{34}S) à l'échelle du mm^3 en procédant à des analyses par EA-IRMS, analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique, d'échantillons de tourbe de la rhizosphère ou de la drilosphère. La sonde ionique NanoSIMS a permis d'établir des cartographies isotopiques (^{15}N et ^{34}S) d'échantillons de quelques μm^2 avec une résolution de l'ordre de la centaine de nm (échelle de la bactérie ; Hermann *et al.* 2007). Le SIP, ou

« stable isotope probing », est une technique permettant à partir d'un substrat enrichi en isotope stable (^{13}C , ^{15}N , ...) de discriminer et d'identifier les groupes fonctionnels microbiens actifs en évaluant les incorporations en isotope stable de leurs acides désoxyribonucléiques (SIP-ADN), acides ribonucléiques (SIP-ARN) ou acides gras phospholipidiques (SIP-PLFA) (Radajewski *et al.* 2000 ; Treonis *et al.* 2004). Ainsi, nous avons utilisé le SIP-PLFA couplé à l'isotope ^{13}C pour déterminer les communautés microbiennes actives de la tourbe et évaluer leur rôle dans les flux de C.

2.1.5.2. L'approche par la stœchiométrie écologique

La stœchiométrie écologique permet d'aborder de manière originale le couplage entre la dynamique des communautés, la physiologie des organismes et les cycles biogéochimiques (Sternner et Elser 2002). Elle s'intéresse à la conservation des éléments chimiques dans les interactions entre les êtres vivants, ainsi qu'aux flux d'énergie et de matière au sein des écosystèmes. Cette théorie a vu le jour avec Redfield (1963) qui avait observé que le rapport C:N:P dans les tissus des algues marines était d'environ 106:16:1 (taux de Redfield), c'est-à-dire en proportions égales aux moles de C, N et P entrant dans le processus de photosynthèse et ce, quelles que soient les concentrations en nitrates et phosphates des eaux. En milieux terrestres, les organismes autotrophes présentent des rapports C:N:P beaucoup plus variables, avec notamment des rapports C:N et C:P plus élevés en raison de la plus forte pauvreté en nutriments disponibles (Elser *et al.* 2000).

Une des notions essentielles pour évaluer le bon fonctionnement d'un écosystème est celle du « facteur limitant », connue depuis Liebig au XIX^{ème} siècle sous le nom de « loi du minimum ». Elle explique que l'élément le moins disponible du milieu limite le développement biologique des organismes, et qu'une surdisponibilité des autres éléments ne peut équilibrer ce manque. Elle est couramment illustrée par un tonneau où chaque planche correspond à un élément indispensable au développement biologique (Figure 9). Si un des éléments devient limitant, la planche correspondante, trop courte, ne peut retenir le contenu du tonneau et le système ne fonctionne plus correctement.



Figure 9. Représentation schématique du « tonneau » de l'énoncé de la « loi du minimum » où ici, le potassium (K) est le facteur limitant du système (http://www.land.ch/Landwirtschaft/fra/wachstumsfaktoren_38138.shtml)

Le P est le principal facteur limitant des milieux aquatiques (Rhee 1972). En tourbière, l'N et le S en bog et le P en fen sont les facteurs limitant primordiaux de la production primaire (Aerts *et al.* 1992 ; Vitt *et al.* 2003 ; Bartlett *et al.* 2009) et des activités microbiennes de minéralisation et de décomposition (Gilbert *et al.* 1998 ; Francez 2000). Le ratio C:N:S moyen des sols en régions tempérées est de 100:8:1, avec des valeurs pouvant varier de 90:8:1 à 200:12:1 (Abrol et Ahmad 2003). Les études portant sur le couplage des 3 éléments C, N et S sont inexistantes en tourbières. Les rapports C:N et C:P du sol sont cependant utilisés pour déterminer le statut trophique de la tourbe. Ainsi, le fen se caractérise en général du bog par des rapports C:N plus élevés (C:N \approx 40 vs. 30), témoignant d'une plus faible minéralisation de la tourbe (Francez 2000). Le rapport C:N de la biomasse microbienne est aussi un indicateur permettant de déterminer si celle-ci est plus dominée par des communautés bactériennes (C:N \approx 3-6) ou des communautés fongiques (C:N \approx 5-20) (Wallander *et al.* 2003).

2.2. Les interactions biotiques en tourbières à Sphaignes face aux changements globaux

2.2.1. Modification de la production primaire

De nombreuses études ont tenté de quantifier l'impact d'une hausse de la température sur les communautés végétales de tourbières. Les résultats concordent sur le fait qu'une hausse de la température de 1 à 3 °C à court terme (quelques années) a un impact positif sur la biomasse (\times 1.2 à 2.5) et la taille des individus de sphaignes (\times 1.3 à 4) (Sonesson *et al.* 2002 ; Dorrepaal

et al. 2004 ; Breeuwer *et al.* 2008). Cependant, Dorrepaal *et al.* (2004) attirent l'attention sur le fait que l'impact du réchauffement climatique à long terme pourrait avoir un impact négatif sur la productivité des sphaignes. Ces auteurs, ainsi que Breeuwer *et al.* (2008), ont montré que ces augmentations de biomasses étaient accompagnées d'une diminution de la densité des capitula et des parties inférieures des sphaignes ($\times -1.2$ à -1.8), et liées à une augmentation du phénomène de dessiccation en surface des sphaignes. Or, ce phénomène de dessiccation a des conséquences drastiques sur la photosynthèse de ces Bryophytes, très sensibles à la baisse de l'humidité (Titus *et al.* 1983 ; Silvola et Aaltonen 1984). D'après Gunnarsson (2005), la température moyenne annuelle et les précipitations en tourbières expliqueraient environ 40 % de la variation de productivité des sphaignes à l'échelle mondiale.

Il a été mesuré qu'un réchauffement climatique de surface de 1 °C en moyenne en bog entraînait une hausse de la température de la tourbe (5 cm de profondeur) pouvant varier de 0.4 à 2.2 °C selon les saisons (Dorrepaal *et al.* 2004). Pour Roulet *et al.* (1992), l'effet d'un réchauffement climatique de 3°C combiné à une hausse des précipitations de 1 mm.jour⁻¹ entrainerait une diminution du niveau de la nappe de 14 à 22 cm, provoquant ainsi un épaissement de l'acrotelme où s'effectue l'essentiel de la décomposition de MO. La production primaire des Bryophytes en tourbière boréale est fortement influencée par le niveau de nappe : une baisse de 21 cm réduit jusqu'à 60 % la production primaire de *Sphagnum* spp et *Polytrichum strictum* (Weltzin *et al.* 2001).

Dans les tourbières de l'hémisphère boréal, le développement des plantes vasculaires est contrôlé par la présence des sphaignes qui réduisent considérablement la disponibilité des nutriments en accumulant efficacement les dépôts atmosphériques et en réduisant les taux de minéralisation et de décomposition de la MO (Malmer *et al.* 1994 ; Dorrepaal *et al.* 2006). Dans un contexte de réchauffement climatique, la diminution de la productivité des sphaignes pourrait alors favoriser le développement des végétaux vasculaires et ainsi modifier le fonctionnement des tourbières à Sphaignes comme il a été suggéré par (Dorrepaal *et al.* 2006). En effet, un impact positif de la hausse des températures a été observé sur la production primaire des végétaux vasculaires (Weltzin *et al.* 2000 ; Dorrepaal *et al.* 2006) et leur abondance (Weltzin *et al.* 2003). Cette augmentation de productivité se fait notamment au détriment des Bryophytes qui voient leur couvert végétal en toundra diminuer de près de 18 % après 5 ans de réchauffement climatique (+ 1-2 °C) (Jónsdóttir *et al.* 2005). Francez et Vasander (1995) ont également observé que la fertilisation en N entraînait une forte diminution du couvert des sphaignes favorable au développement des végétaux vasculaires.

Il paraît donc indispensable de connaître l'impact réel des changements globaux (hausse de la température et modification de l'humidité) sur les flux de C, N et S témoignant de la production de ces végétaux. La balance de productivité entre les sphaignes et les végétaux vasculaires est une des clés majeures pour la compréhension du fonctionnement « puits » ou « source » des tourbières de l'hémisphère nord pour les prochaines décennies.

2.2.2. Modification des activités liées à la mésofaune et à la macrofaune

Peu d'études de terrain se sont intéressées à l'impact des changements globaux sur les processus biogéochimiques pilotés par la mésofaune et la macrofaune des tourbières. Cole *et al.* (2002b) suggèrent cependant qu'un réchauffement climatique de 2.5 °C en tourbière pourrait, à terme, augmenter de 43 % l'abondance des enchytréides et de 11 % les pertes de DOC. Les enchytréides sont des organismes très vulnérables aux variations d'humidité (Abrahamsen 1972 ; Lundkvist 1982 ; Maraldo *et al.* 2008), et la déshydratation des sphaignes et de la tourbe engendrée par le réchauffement climatique, pourrait avoir des conséquences drastiques sur leur physiologie et leurs rôles dans les processus de décomposition de la MO et de redistribution des nutriments. Il a également été démontré que la diminution d'humidité du sol entraîne une augmentation du rapport C:N microbien, suggérant un passage vers une communauté microbienne dominée par les champignons (Jensen *et al.* 2003). Ce qui pourrait favoriser le développement d'espèces fongivores et tolérante à la dessiccation, au détriment d'espèces plus sensibles parmi la communauté d'enchytréides de tourbière (Maraldo 2009).

Les vers de terre sont également des organismes très sensibles aux variations de température et d'humidité du sol (Edwards et Bohlen 1996 ; Whalen *et al.* 1998 ; Baker et Withby 2003 ; Ivask *et al.* 2007). Zaller *et al.* (2009) ont ainsi montré que l'espèce épigée *Dendrobaena octaedra* voyait son abondance et sa biomasse diminuées de 36 % après 2 ans de réchauffement climatique (+ 1.2 °C) dans un fen en Argentine. Il s'agit, à notre connaissance, de la seule étude de terrain démontrant un effet du réchauffement climatique sur une population de vers de terre. Cependant, il a été démontré en microcosmes que le taux d'excrétion en N de l'espèce *A. caliginosa* augmentait de 50 % avec une hausse de la température de 10 °C (Q₁₀) (Christensen 1987). De même, les turnovers journaliers en N des

tissus des espèces *L. terrestris* et *Nicodrilus longus* augmentent de 65 % avec une hausse de la température de 10 °C (Hameed *et al.* 1994).

La majorité des travaux portant sur le rôle des vers de terre dans la remise à disposition des nutriments carbonés ou azotés vers le substrat ont été effectués en sols minéraux. Il paraît indispensable pour des études en sols riches en MO, de considérer le rôle de tels organismes ingénieurs car ils pourraient permettre des transferts de C, d’N et de S nécessaires au soutien des cycles biogéochimiques microbiens et à la productivité dans des écosystèmes pauvres en nutriments comme les tourbières.

2.2.3. Modification des activités microbiennes

La plupart des études sur le cycle du C en tourbières se sont intéressées aux émissions atmosphériques de CO₂ et de CH₄ et aux pertes par lessivage (DIC et DOC). Ces mesures permettent d’étudier indirectement le rôle des microorganismes, qui sont en grande partie responsables de ces flux (respiration et minéralisation). L’activité de décomposition de la MO qui se déroule essentiellement dans l’acrotelme est fortement influencée par les variations de températures de surface. Or, les processus bactériens opérant en tourbière sont positivement influencés par l’augmentation des températures, avec des optimums de travail compris entre 15 et 25 °C selon les communautés ciblées (méthanogènes et méthanotrophes ; Dunfield *et al.* 1993 ; Dedysh *et al.* 2000). Une augmentation de 2 à 8 °C des températures de surface comme il est attendu pour les prochaines décennies dans l’hémisphère boréal (IPCC 2007), aurait donc un impact significatif sur les processus de minéralisation en tourbière.

L’augmentation de l’épaisseur de l’acrotelme provoquée par la diminution de la nappe d’eau pourrait également entraîner une diminution de l’activité des Archaea méthanogènes. Ainsi, une tourbière drainée peut voir sa fonction « source » de CH₄ diminuer car les faibles quantités produites par les méthanogènes sont utilisées par les méthanotrophes présents dans la couche aérobie (Martikainen *et al.* 1995). Les dépôts atmosphériques en N ont également un effet sur les flux de C en bog. Ils augmentent les activités enzymatiques (β -glucosidase et phosphatase) et entraînent une augmentation des pertes de DOC et de CO₂ (Bragazza *et al.* 2006).

Les processus microbiens impliqués dans les cycles de l’N et du S en tourbières peuvent également être influencés par les changements climatiques. La réduction

dissimilatrice des SO_4^{2-} en sulfure d'hydrogène (H_2S) par les bactéries contrôle la majeure partie du cycle du S dans les tourbières anoxiques (Brown 1985 ; Bottrell et Novak 1997), et est positivement influencée par une hausse de la température (Howarth et Teal 1979). Les pertes de N sous formes N_2O sont négligeables en tourbières en raison des faibles concentrations en NO_3^- présente (Francez *et al.* 2000). Cependant, des apports en NO_3^- peuvent déclencher le processus de dénitrification en l'absence de couvert de sphaignes (Francez *et al.* 2011). En général, les pertes en N_2O n'excèdent pas les $0.1\text{-}0.2 \text{ g.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ (Urban *et al.* 1988 ; Morris 1991), mais le processus de dénitrification est positivement influencé par la température avec un optimum de travail compris entre 25 et 30 °C (Saad et Conrad 1993).

Face à la grande diversité fonctionnelle microbienne présente dans la couche supérieure de la tourbe, l'enjeu est maintenant de comprendre la réponse des différentes communautés microbiennes aux changements globaux, c'est-à-dire l'impact engendré aussi bien en termes de variations de stocks C-N-S (biomasses microbiennes) que de flux (SIP ^{13}C -PLFAs).

2.2.4. Modification des flux à l'échelle de l'écosystème

Dorrepaal *et al.* (2009) ont montré qu'un réchauffement climatique simulé de 1 °C en tourbière boréale pendant 8 ans augmentait la respiration totale de l'écosystème de 60 % au printemps et de 52 % en été. Ces auteurs estiment ainsi qu'un réchauffement climatique de 1 °C au cours des prochaines décennies pourrait induire une augmentation globale de la respiration hétérotrophe de 38 à 100 Tg C.an⁻¹. La hausse de ce CO_2 respiré par les microorganismes peut être favorable à l'augmentation de la productivité des sphaignes et des végétaux (Jauhainen *et al.* 1994 ; Heijmans *et al.* 2001), et donc entraîner une augmentation du C labile libéré par les plantes qui à terme peut devenir un substrat favorable à la méthanogénèse (Joabsson *et al.* 1999). En retour, le CH_4 peut être méthanotrophisé en CO_2 par les méthanotrophes, et être ensuite utilisé par les plantes pour la photosynthèse. Les différentes interactions biotiques et leurs impacts sur les flux de C sont schématisées dans la figure 10.

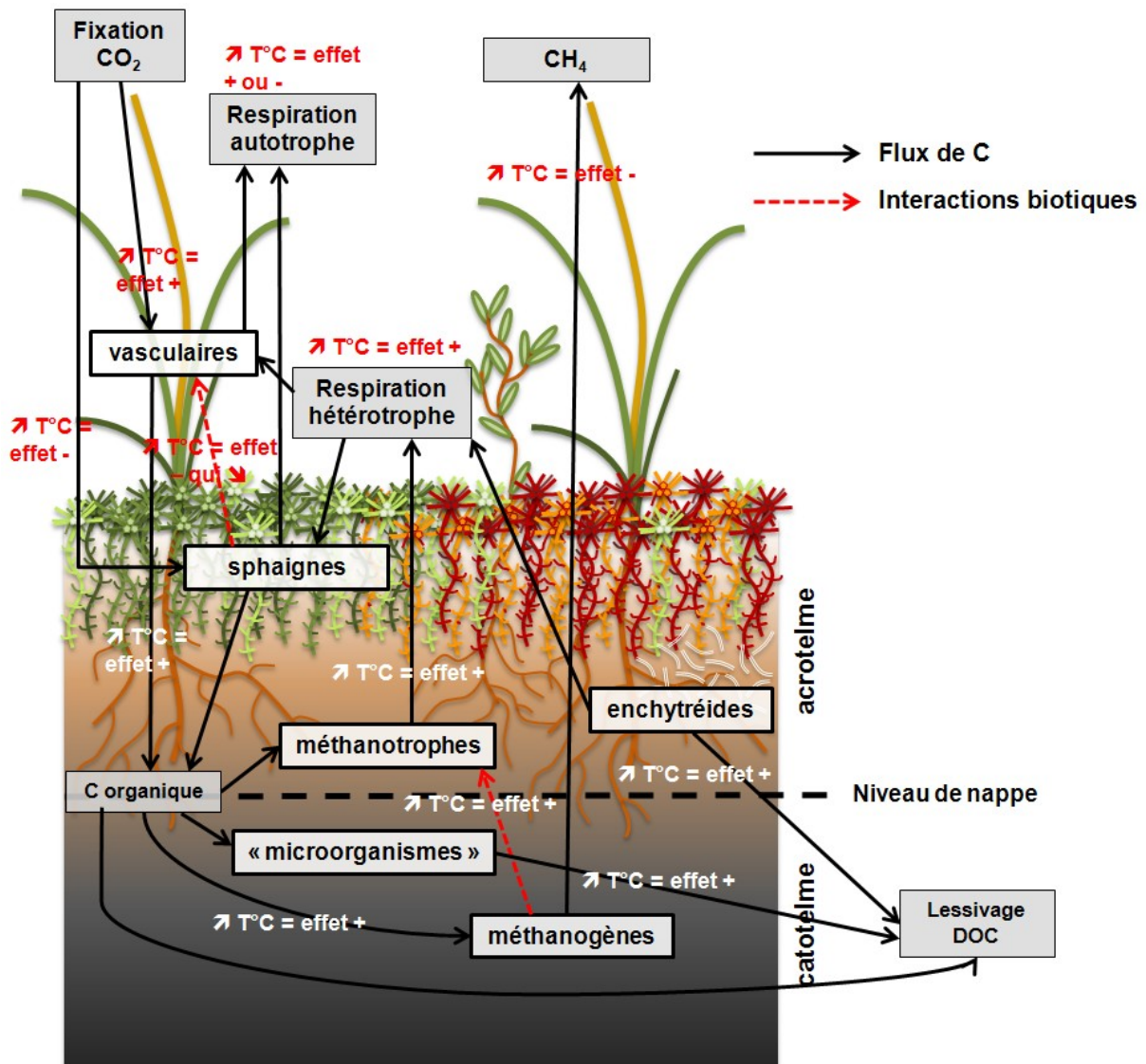


Figure 10. Représentation schématique de l'effet du réchauffement climatique sur les flux de C et les interactions biotiques en tourbières à sphaignes

2.2.5. Conséquences : Impact sur le fonctionnement « puits »

Le défi scientifique actuel consiste à évaluer la balance entre le C fixé et le C libéré dans un contexte où la complexité des tourbières (habitats *fen-bog*) et la multiplicité des facteurs liés au réchauffement climatique (températures, humidité, niveau d'eau,...) interagissent. En effet, en raison des différences de paramètres biotiques et abiotiques qui caractérisent le bog et le fen, ces deux habitats sont susceptibles d'avoir des réponses différentes vis-à-vis des changements globaux (Weltzin *et al.* 2000 ; Weltzin *et al.* 2003). Dans un premier cas, la tourbière continue de fonctionner comme un système « puits » pour le C car l'augmentation

de la production primaire, liée au réchauffement climatique, compense les pertes due à la minéralisation de la MO [1] :

$$\text{Production primaire (CO}_2 \text{ séquestré)} > [\text{respiration CO}_2 + \text{émission CH}_4 + \text{lessivage DOC}] [1]$$

Dans un second cas, la tourbière passe à un fonctionnement « source » de C car l'augmentation des pertes de C liées à la minéralisation de la MO ne sont pas compensées par la production primaire [2] :

$$\text{Production primaire (CO}_2 \text{ séquestré)} < [\text{respiration CO}_2 + \text{émission CH}_4 + \text{lessivage DOC}] [2]$$

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que les estimations de flux de C dans les tourbières boréales pour les prochaines décennies, voir les prochains siècles, sont emprises à de nombreuses incertitudes de calculs (Joosten et Clarke 2002). Cela se traduit au final par des incertitudes concernant les rétroactions attribuées aux tourbières en retour au réchauffement climatique, c'est-à-dire leur capacité à augmenter ou non l'effet de serre. Les différents GES émis en tourbière ont des temps de vie différents dans l'atmosphère. Par exemple, la durée de vie du CH₄ est de 12 ans alors que celle du N₂O est de 120 ans (Joosten et Clarke 2002). La combinaison des durées de vie et des effets radiatifs propres à chaque GES démontrent que la compréhension du rôle des tourbières dans le réchauffement climatique dépend seulement de l'échelle de temps à laquelle on travaille (Crill *et al.* 2000 ; Roulet 2000 ; Joosten et Clarke 2002). Joosten et Clarke (2002) estiment ainsi que sur une courte échelle de temps (20 à 100 ans), le fen et le bog fonctionnent comme des sources de GES par rapport à leurs émissions de CO₂, CH₄ et N₂O respectifs (Tableau 3). En revanche sur une période de 500 ans, le bog a un potentiel négatif de réchauffement global alors que celui du fen est légèrement positif.

Tableau 3. Potentiel de réchauffement global du fen et du bog à différentes échelles de temps (Joosten et Clarke 2002)

		Fen	Bog
CO ₂ séquestration (kg C.ha ⁻¹ .an ⁻¹)		-250	-310
CH ₄ émission (kg C.ha ⁻¹ .an ⁻¹)		297	53
N ₂ O émission (kg N.ha ⁻¹ .an ⁻¹)		0.1	0.04
Potentiel de réchauffement global (kg équivalent C-CO ₂ .ha ⁻¹ .an ⁻¹)	20 ans	5524	723
Potentiel de réchauffement global (kg équivalent C-CO ₂ .ha ⁻¹ .an ⁻¹)	100 ans	1724	45
Potentiel de réchauffement global (kg équivalent C-CO ₂ .ha ⁻¹ .an ⁻¹)	500 ans	173	-233

3. Projets PEATWARM et ECCO-PNBC

3.1. Le projet PEATWARM

Ces dernières années, de nouveaux dispositifs se sont développés pour évaluer de façon *in situ* la réponse des écosystèmes face à un réchauffement climatique modéré (+ 1-2 °C). Tout d'abord développés en toundra (Henry et Molau 1997 ; Molau 1997), les dispositifs open-top chambers (OTCs) ont été utilisés plus récemment en tourbières boréales (Dorrepaal *et al.* 2004, 2006 et 2009 ; Sullivan *et al.* 2008). Ces dispositifs expérimentaux ouvrent de nouvelles perspectives en termes de compréhension du devenir de la fonction « puits » de C des tourbières car ils permettent d'étudier conjointement l'effet d'une hausse de la température et les effets indirects provoqués par celui-ci, comme les variations d'humidité.

C'est dans ce contexte que se situe le programme PEATWARM : « Effects of experimental warming on carbon sink function of a temperate *Sphagnum*-peatland ». Ce programme de recherche est soutenu par l'agence nationale de la recherche française (ANR) dans le cadre du programme "Vulnerability: Environment – Climate" (ANR-07-VUL-010). Il associe 6 laboratoires français : UMR CNRS 6113 ISTO d'Orléans, UMR INRA 6249 Chrono-Environnement de Besançon, UMR INRA 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières de Nancy, UMR CNRS 6553 ECOBIO de Rennes, UMR CNRS 6514 Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles de Poitiers et UMR CNRS 6115 Laboratoire de Physique et Chimie de l'Environnement et de l'Espace d'Orléans. Le programme se proposait d'évaluer les effets du réchauffement climatique sur les compartiments clés d'une tourbière tempérée naturelle, la tourbière de Frasne dans le Doubs (25) abritant typiquement les habitats de fen et de bog (Figure 11). *In fine*, l'objectif de PEATWARM est d'élaborer un modèle biogéochimique du devenir du C, couplé aux cycles de l'N et du S, et d'extrapoler l'évolution du système sur les deux prochaines décennies.

Mon implication dans le projet PEATWARM a consisté à mesurer l'impact du réchauffement climatique sur i) la structure et les flux de C des communautés microbiennes de la tourbière et ii) les flux C-N-S des grands compartiments biotiques (micro-mésosofaune-plantes) de la tourbe (Figure 11).

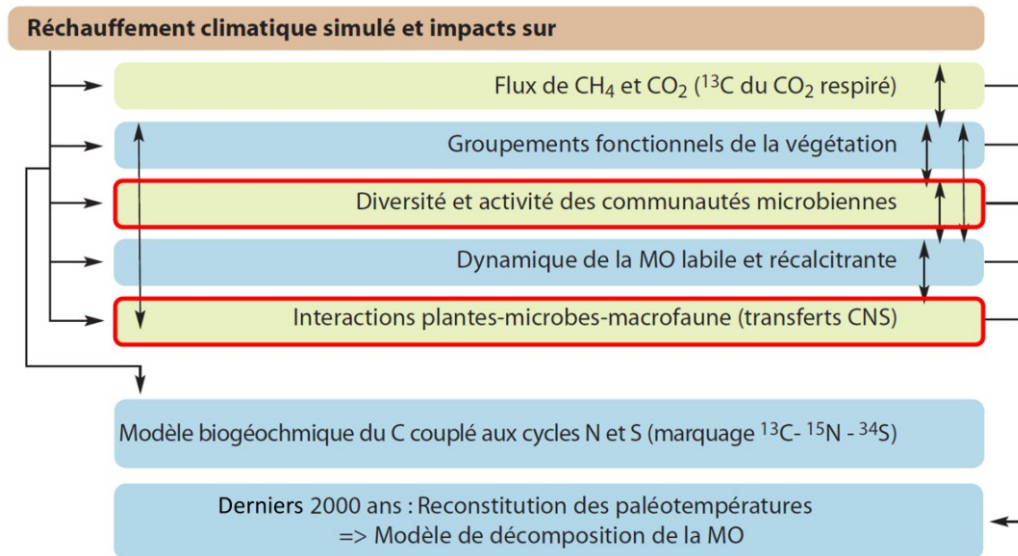


Figure 11. Objectifs du projet PEATWARM. Les objectifs rentrant dans le projet de thèse sont encadrés en rouge (d'après Cholet et Magnon 2010)

3.1. Le projet ECCO-PNBC

La seconde partie du travail de recherche a été effectuée au sein du programme ECCO-PNBC intitulé « Interactions biotiques et couplage C-N-S dans des tourbières en phase de régénération après exploitation ». Il associe 4 laboratoires français : UMR CNRS 6553 ECOBIO de Rennes, UMR INRA 950 EVA de Caen, UMR CNRS 6514 Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles de Poitiers et UMR CNRS 6117 LMGEM de Marseille. L'objectif de ce programme était d'évaluer par une approche couplée des cycles C, N et S les potentialités de recouvrement du processus d'accumulation de systèmes « plante colonisatrice – tourbe » en s'appuyant sur l'étude de différents types d'interactions biotiques et de flux associés, de l'échelle de l'individu (interactions intra- et interspécifiques) à l'échelle de l'écosystème (bilan « puits-source » et potentialités et vitesses de régénération).

Mon implication dans le programme ECCO-PNBC a consisté à évaluer le rôle des organismes ingénieurs *Lumbricus rubellus* et *Eriophorum angustifolium* dans le recyclage des éléments C, N et S de la tourbe et, *in fine* à évaluer l'impact de ces organismes dans le processus de retour à un fonctionnement « puits » d'une tourbière anciennement exploitée, la tourbière de Baupte dans la Manche (50).

4. Objectifs du travail de recherche

Considérant les différents éléments énoncés ci-dessus, les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de mettre en évidence, de caractériser et de quantifier l'impact des changements globaux sur le fonctionnement des tourbières tempérées à travers le couplage entre les éléments C, N et S et les interactions biotiques majeures pilotant les processus de transformations biogéochimiques. Afin de répondre à ces objectifs, la démarche de ma thèse a été hiérarchisée à différents niveaux d'organisation en écologie : de l'individu à l'écosystème. Il a été choisi de développer simultanément des approches *in situ* et *ex situ* afin d'appréhender finement les réponses des différentes composantes biotiques aux changements globaux : tourbière abandonnée après exploitation et drainage, et réchauffement climatique d'une tourbière naturelle à Sphaignes. Ces approches ont été rendues possibles par triple traçage isotopique ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S .

Le développement méthodologique à différentes échelles mis au point pour répondre à ces objectifs est présenté dans le chapitre II : sites d'études et contextes expérimentaux.

Le chapitre suivant (III) présente les résultats des travaux réalisés à l'échelle d'un organisme ingénieur, le ver de terre épi-anécique *Lumbricus rubellus*. Dans un premier temps, il sera proposé de montrer comment les traits écophysiologiques exprimés à l'échelle de l'individu se traduisent dans l'efficacité du recyclage des nutriments C, N et S de la tourbe (article 1). Afin de répondre à ces objectifs, des modèles ont été mis au point pour déterminer les cinétiques d'incorporation et de remise à disposition des éléments au niveau des tissus et du mucus (turnovers) et, *in fine*, d'évaluer les transferts de C, N et S de *L. rubellus* vers la tourbe. Afin d'apporter des compléments d'interprétation, une seconde étude a été réalisée pour évaluer le devenir des transferts d'N et de S du ver de terre dans la tourbe (article 2). Pour cela des échantillons de galerie ont été indurés dans de la résine puis analysés à l'échelle du μm par NanoSIMS, afin de déterminer la sphère d'influence du ver de terre et d'observer les incorporations en N et S réalisées par les bactéries.

Le chapitre IV présente une analyse située à l'échelle systémique d'un écosystème anciennement perturbé : la tourbière en régénération après exploitation. Il vise à déterminer le rôle des interactions biotiques majeures sur les flux C-N-S dans des systèmes macroorganismes-tourbe (article 3). Le rôle respectif de deux organismes ingénieurs, que sont la plante *E. angustifolium* et le ver de terre *L. rubellus*, est ainsi évalué en terme de transferts et d'efficacité du recyclage des nutriments C-N-S vers la tourbe. Ces derniers permettront de

déterminer si ces organismes sont capables de soutenir les cycles biogéochimiques microbiens et la productivité de l'écosystème et donc, de rétablir un processus de retour à un fonctionnement « puits » des tourbières anciennement exploitées.

Le chapitre V présente une approche située à l'échelle des communautés d'une tourbière naturelle. Il explique les réponses des communautés microbiennes et des interactions biotiques micro-mésosofaune-plantes aux changements climatiques engendrés par une hausse simulée de la température (OTCs) : i) par une approche de traçage SIP ^{13}C -PLFAs afin de déterminer la structure des communautés microbiennes de la tourbe impliquées dans les flux de C (article 4) ; ii) en se focalisant sur les flux de C, d'N et de S au sein des grands compartiments biotiques que sont la mésosofaune (enchytréides), les plantes (sphaignes et végétaux vasculaires) et la biomasse microbienne (article 5).

Dans une dernière partie (chapitre VI) les conclusions générales de l'ensemble de ces travaux seront exposées ainsi que les perspectives se profilant à l'issue des résultats obtenus.

Références

- Abrahamsen G (1972) Ecological study of Enchytraeidae (Oligochaeta) in Norwegian coniferous forest soils. *Pedobiologia* 12:26-82
- Abrahamsen G (1990) Influence of *Cognettia sphagnetorum* (Oligochaeta: Enchytraeidae) on nitrogen mineralization in homogenized mor humus. *Biol Fert Soils* 9:159-162
- Abrol YP, Ahmad A (2003) Sulphur in plants. Kluwer Academic Publishers, pp 420
- Aerts R, Wallén B, Malmer N (1992) Growth-limiting nutrients in *Sphagnum*-dominated bogs subject to low and high atmospheric nitrogen supply. *J Ecol* 80:131-140
- Allen MR, Ingram WJ (2002) Constraints on future changes in climate and the hydrologic cycle. *Nature* 419:224-232
- Andersen R, Francez AJ, Rochefort L (2006) The physiochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. *Soil Biol Biochem* 38:1375-1387
- Armentano TV, Menges ES (1986) Patterns of change in the carbon balance of organic soil-wetlands of the temperate zone. *J Ecol* 74:755-774
- Aronson J, Le Floch E (1996) Vital landscape attributes: missing tools for restoration ecology. *Restor Ecol* 4:377-387
- Baker GH, Withby WA (2003) Soil pH preferences and the influences of soil type and temperature on the survival and growth of *Aporrectodea longa* (Lumbricidae). *Pedobiologia* 47:745-753
- Bardgett RD (2005) *The Biology of Soil: A community and ecosystem approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 256
- Bardgett RD, Freeman C, Ostle NJ (2008) Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME J* 2:805-814
- Barrios E (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol Econ* 64:269-285
- Bartlett R, Bottrell SH, Coulson JP, Lee J, Forbes L (2009) ^{34}S tracer study of pollutant sulfate behavior in a lowland peatland. *Biogeochemistry* 95:261-275
- Batjes NH (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *Eur J Soil Sci* 47:151-163
- Baudin F, Tribouvillard N, Trichet J (2007) *Géologie de la matière organique*. Ed. Vuibert, Collection Interactions, Paris, pp 263
- Beare MH, Coleman DC, Crossley DA, Hendrix PF, Odum EP (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant Soil* 170:5-22
- Binet F, Tréhen P (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biol Biochem* 24:1501-1506
- Binet F, Curmi P (1992) Structural effects of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on the soil-organic matter system: Micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol Biochem* 24:1519-1523
- Binet F (1993) *Dynamique des peuplements et fonctions des lombriciens en sols cultivés tempérés*. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, pp 299
- Binet F, Fayolle L, Pussard M (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biol Fert Soils* 27:79-84

- Binet F, Kersanté A, Munier-Lamy C, Le Bayon RC, Belgy MJ, Shipitalo MJ (2006) Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol Biochem* 38:1255-1263
- Bohlen PJ, Parmelee RW, Blair JM (2004) Integrating the effects of earthworms on nutrient cycling across spatial and temporal scales. In: Edwards CA (ed) *Earthworm Ecology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 161-180
- Bolin B, Cook RB (1983) *The major biogeochemical cycles and their interactions*, John Wiley and Sons, USA, New York
- Bonkowski M (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol* 162:617-631
- Bottrell SH, Novak M (1997) Sulphur isotopic study of two pristine *Sphagnum* bogs in the western British Isles. *J Ecol* 85:125-132
- Bouché MB (1971) Relations entre les structures spatiales et fonctionnelles des écosystèmes illustrées par le rôle pédobiologique des vers de terre. In: Pesson P (ed), *La vie dans les sols*. Gauthier-Villars, Paris, France, pp 187-209
- Bouché MB (1977) Stratégies lombriciennes. In: Lohm U, Persson T (eds), *Soil Organisms as Components of Ecosystems*. *Ecol. Bull.* 25, Stockholm, Sweden, pp 122-133
- Bouché MB (1984) Une méthode de mesure du débit d'éléments dans un sol non perturbé : azote et carbone des lombriciens (Lumbricidæ, Annelida). *Pedobiologia* 27:197-206
- Bragazza L, Freeman C, Jones T, Rydin H, Limpens J, Fenner N, Ellis T, Gerdol R, Hájek M, Hájek T, Lacumin P, Kutnar L, Tahvanainen T, Toberman H (2006) Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs. *P Natl Acad Sci USA* 103:19386-19389
- Breeuwer A, Heijmans MMPD, Robroek BJM, Berendse F (2008) The effect of temperature on growth and competition between *Sphagnum* species. *Oecologia* 156:155-167
- Bridgman SD, Updegraff K, Pastor J (2001) A comparison of nutrient availability indices along an ombrotrophic-minerotrophic gradient in Minnesota wetlands. *Soil Sci Soc Am J* 65:259-269
- Brown KA (1985) Sulphur distribution and metabolism in waterlogged peat. *Soil Biol Biochem* 17:39-45
- Brown GG, Barois I, Lavelle P (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol* 36:177-198
- Bubier JL, Moore TR, Roulet NT (1993) Methane emissions from wetlands in the midboreal region of northern Ontario, Canada. *Ecology* 74:2240-2254
- Bundt M, Widmer F, Pesaro M, Zeyer J, Blaser P (2001) Preferential flow paths: biological 'hot spots' in soils. *Soil Biol Biochem* 33:729-738
- Chapman S, Buttler A, Francez AJ, Laggoun-Défarage F, Vasander H, Schloter M, Combe J, Grosvernier P, Harms H, Epron D, Gilbert D, Mitchell E (2003) Exploitation of northern peatlands and biodiversity maintenance: a conflict between economy and ecology. *Front Ecol Environ* 1:525-532
- Cholet J, Magnon G (2010) Tourbières des montagnes françaises – Nouveaux éléments de connaissance, de réflexion & de gestion. *Pôle-relais Tourbières / Fédération des Conservatoires d'Espaces Naturels*, pp 188
- Christensen O (1987) The effect of earthworms on nitrogen cycling in arable soil. In: *Proceedings of the 9th International Colloquium on Soil Zoology*, Nauka, Moscow, pp 106-118

- Clymo RS (1983) Peat. In: Gore AJP (ed), Mires: swamp, bog, fen and moor. Ecosystems of the world, 4A, Elsevier Scientific Publishing, USA, New York, pp 159-224
- Cole L, Bardgett RD, Ineson P (2000) Enchytraeid worms (Oligochaeta) enhance mineralization of carbon in organic upland soils. *Eur J soil Sci* 51:185-192
- Cole L, Bardgett RD, Ineson P, Hobbs PJ (2002a) Enchytraeid worm (Oligochaeta) influences on microbial community structure, nutrient dynamics and plant growth in blanket peat subjected to warming. *Soil Biol Biochem* 34:83-92
- Cole L, Bardgett RD, Ineson P, Adamson JK (2002b) Relationships between enchytraeid worms (Oligochaeta), climate change, and the release of dissolved organic carbon from blanket peat in northern England. *Soil Biol Biochem* 34:599-607
- Coulson JC, Whittaker JB (1978) Ecology of moorland animals. In: Heal OW, Perkins DF (eds) Production Ecology of British Moors and Montane Grasslands, Ecological Studies 27. Springer Verlag, Berlin, pp 52-93
- Cregut M, Piutti S, Vong PC, 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 Biol Biochem* 41:704-710
- Crill P, Hargreaves K, Korhola A (2000) The Role of Peat in Finnish Greenhouse Gas Balances. Ministry of Trade and Industry Finland, Studies and Reports 10/2000, pp 71
- Curry JP, Byrne D, Boyle KE (1995) The earthworm population of a winter cereal field and its effects on soil and nitrogen turnover. *Biol Fert Soils* 19:166-172
- Curry JP, Schmidt O (2006) Long-term establishment of earthworm populations in grassland on reclaimed industrial cutaway peatland in Ireland. *Suo* 57:65-70
- de Ruiter PC, Griffiths B, Moore JC (2002) Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In: Loreau SNM, Inchausti P (eds), Biodiversity and ecosystem functioning, synthesis and perspectives, Oxford University Press, New-York, pp 102-113
- Daniel O, Anderson JM (1992) Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* hoffmeister. *Soil Biol Biochem* 24:465-470
- Decaëns T (2000) Degradation dynamics of surface earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Columbia. *Biol Fert Soils* 32:149-156
- Dedysh SN, Liesack W, Khmelenina VN, Suzina NE, Trotsenko YA, Semrau JD, Bares AM, Panikov NS, Tiedje JM (2000) *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int J Syst Evol Micr* 50:955-969
- Dise NB, Verry ES (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry* 53:143-160
- Dorrepaal E, Aerts R, Cornelissen JHC, Callaghan TV, van Longtestijn RSP (2004) Summer warming and increased winter snow cover affect *Sphagnum fuscum* growth, structure and production in a sub-arctic bog. *Glob Change Biol* 10:93-104
- Dorrepaal E, Aerts R, Cornelissen JHC, van Longtestijn RSP, Callaghan TV (2006) *Sphagnum* modifies climate-change impacts on subarctic vascular bog plants. *Funct Ecol* 20:31-41

- Dorrepaal E, Toet S, van Longtestijn RSP, Swart E, van de Weg MJ, Callaghan TV, Aerts R (2009) Carbon respiration from subsurface peat accelerated by climate warming in the subarctic. *Nature* 460:616-619
- Dunfield P, Knowles R, Dumont R, Moore TR (1993) Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: Response to temperature and pH. *Soil Biol Biochem* 25:321-326
- Dyckmans J, Scrimgeour CM, Schmidt O (2005) A simple and rapid method for labelling earthworms with ^{15}N and ^{13}C . *Soil Biol Biochem* 37:989-993
- Edwards WM, Shipitalo MJ, Dick WA, Owens LB (1989) Water and nitrate movement in earthworm burrows within long-term no-tillage cornfields. *J Soil Water Conserv* 44:240-243
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) *Biology and ecology of earthworms*. 3rd edn. Chapman and Hall, London
- Edwards WM, Shipitalo MJ (1998) Consequences of earthworms in agricultural soils: Aggregation and porosity. In: Edwards CA (ed), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA, pp 147-161
- Elser JJ, Fagan WF, Denno RF, Dobberfuhl DR, Folarin A, Huberty A, Interlandi S, Kilham SS, McCauley E, Schulz KL, Siemann EH, Sterner RX (2000) Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 408:578-580
- Francez AJ (1991) Production primaire et accumulation de matière organique dans les tourbières à Sphaignes des Monts du Forez (Puy-de-Dôme, France). Influence des activités humaines sur leur fonctionnement et leur évolution. Thèse de doctorat, Université de Paris 6 (P. et M. Curie), pp 320
- Francez AJ, Vasander H (1995) Peat accumulation and peat decomposition after human disturbance in French and Finnish mires. *Acta Oecol* 16:599-608
- Francez AJ (2000) La dynamique du carbone dans les tourbières à *Sphagnum*, de la sphaigne à l'effet de serre. *Année Biol* 39:205-270
- Francez AJ, Gogo S, Josselin N (2000) Distribution of potential CO_2 and CH_4 productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany (France). *Eur J Soil Biol* 36:161-168
- Francez AJ, Pinay G, Josselin N, Williams BL (2011) Denitrification triggered by nitrogen addition in *Sphagnum magellanicum* peat. *Biogeochemistry* 106:435-441
- Franklin RB, Mills AL (2003) Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiol Ecol* 44:335-346
- Frolking S, Roulet NT (2007) Holocene radiative forcing impact of northern peatland carbon accumulation and methane emissions. *Glob Change Biol* 13:1079-1088
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889-892
- Garnier E, et al. (2007) Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: a standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Ann Bot-London* 99:967-985
- Gicquel A, Francez AJ, Delhaye T, Gruau G, Hallaire V, Binet F (2012) Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Biogeochemistry* doi:10.1007/s10533-012-9714-3

- Gilbert D, Amblard C, Bourdier G, Francez AJ (1998) The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function, and impact of nutrient input. *Microb Ecol* 35:83-93
- Gilbert D, Mitchell EAD (2006) Microbial diversity in Sphagnum peatlands. In: Martini IP, Martínez Cortizas A, Chesworth W (eds) *Peatlands: Evolution and Records of Environmental and Climate Changes*, Developments in Earth Surface Processes, Elsevier, Amsterdam, pp 289-318
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W (2010) *Le sol vivant : Bases de pédologie – Biologie des sols*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, pp 817
- Gore AJP (1983) Mires: swamp, bog, fen and moor. *Ecosystems of the world*, 4A, Elsevier Scientific Publishing, USA, New York, pp 159-224
- Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol Appl* 1:182-195
- Goss MJ (1997) Consequences of the activity of roots on soil. In: Atkinson D (ed), *Plant root Growth. An Ecological Perspective*, Blackwell, London pp 171-186
- Grayston SJ, Vaughan D, Jones D (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol* 5:29-56
- Greenup AL, Bradford MA, McNamara NP, Ineson P, Lee JA (2000) The role of *Eriophorum vaginatum* in CH₄ flux from an ombrotrophic peatland. *Plant Soil* 227:265-272
- Grethe S, Schrader S, Giesemann A, Larink O, Weigel HJ (1996) Influence of earthworms on the sulfur turnover in the soil. *Isot Environ Health S* 32:211-217
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sorensen SJ, Baath E, Bloem J, de Ruiter PC, Dolfing J, Nicolardot B (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90:279-294
- Gunnarsson U (2005) Global patterns of *Sphagnum* productivity. *J Bryol* 27:269-279
- Hameed B, Bouché MB, Cortez J (1994) Etudes *in situ* des transferts d'azote d'origine lombricienne (*Lumbricus terrestris* L.) vers les plantes. *Soil Biol Biochem* 26:495-501
- Heathwaite AL, Göttlich KH, Burmeister EG, Kaule G, Grospietch T (1993) Mires: definitions and form. In: Heathwaite AL, Göttlich KH (eds), *Mires: Process, Exploitation and Conservation*, Wiley, pp 1-75
- Heijmans MMPD, Berendse F, Arp WJ, Masselink AK, Klees H, De Visser W, Van Breemen N (2001) Effects of elevated carbon dioxide and increased nitrogen deposition on bog vegetation in the Netherlands. *J Ecol* 89:268-279
- Heil A, Langmann B, Aldrian E (2007) Indonesian peat and vegetation fire emissions: Study on factors influencing large-scale smoke haze pollution using a regional atmospheric chemistry model. *Mitig Adapt Strat Glob Change* doi:10.1007/s11027-006-9045-6
- Held IM, Soden BJ (2006) Robust responses of the hydrological cycle to global warming. *J Climate* 19:5686-5699
- Henry GHR, Molau U (1997) Tundra plants and climate change: the International Tundra Experiment (ITEX). *Glob Change Biol* 3:1-9

- Herrmann AM, Ritz K, Nunan N, Clode PL, Pett-Ridge J, Kilburn MR, Murphy DV, O'Donnell AG, Stockdale EA (2007) Nano-scale secondary ion mass spectrometry – A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biol Biochem* 39:1835-1850
- Hiltner L (1904) Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft* 98:59-78
- Hooper DU, Chapin FS III, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75:3-35
- Howarth RW, Teal JM (1979) Sulfate reduction in a New England salt marsh. *Limnol Oceanogr* 24:999-1013
- Ingram HAP (1978) Soil layers in mires: function and terminology. *J Soil Sci* 29:224-227
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp.996
- Ivask M, Kuu A, Sizov E (2007) Abundance of earthworm species in Estonian arable soils. *Eur J Soil Biol* 43:S39-S42
- Jaenicke J, Rieley JO, Mott C, Kimman P, Siegert F (2008) Determination of the amount of carbon stored in Indonesian peatlands. *Geoderma* 147:151-158
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Buttler A, Toussaint ML, Binet P (2011) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. *Glob Change Biol* 17:2945-2957
- Jauhiainen J, Vasander H, Silvola J (1994) Response of *Sphagnum fuscum* to N deposition and increased CO₂. *J Bryol* 18:83-95
- Jeffery S, Gardi C, Jones A, Montanarella L, Marmo L, Miko L, Ritz K, Peres G, Römbke J, van der Putten WH (2010) *European Atlas of Soil Biodiversity*, European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg, pp 128
- Jégou D, Cluzeau D, Hallaire V, Balesdent J, Tréhen P (2000) Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *Eur J Soil Biol* 36:27-34
- Jégou D, Schrader S, Diestel H, Cluzeau D (2001) Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. *Appl Soil Ecol* 17:165-174
- Jensen KD, Beier C, Michelsen A, Emmett BA (2003) Effects of experimental drought on microbial processes in two temperate heathlands at contrasting water conditions. *Appl Soil Ecol* 24:165-176
- Joabsson A, Christensen TR, Wallen B (1999) Vascular plant controls on methane emissions from northern peatforming wetlands. *Trends Ecol Evol* 14:385-388
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69:373-386
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1997) Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78:1946-1957
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* 321:5-33
- Jónsdóttir IS, Magnússon B, Gudmundsson J, Elmarsdóttir A, Hjartarson H (2005) Variable sensitivity of plant communities in Iceland to experimental warming. *Glob Change Biol* 11:553-563

- Joosten H (1999) Peat the final frontier: Mires and peatlands outside the tropics. In: Maltby E, Maclean L (Eds), Peatlands under pressure. Arctic to tropical peatlands, Royal Holloway Institute for Environmental Research, Royal Holloway, pp 9-17
- Joosten H, Clarke D (2002) Wise use of mires and peatlands. Background and principles including a framework for decision-making. International Mire Conservation Group, International Peat Society, Saarijärvi, Finland, pp 304
- Kattge J, *et al.* (2011) TRY – a global database of plant traits. *Glob Change Biol* 17:2905-2935
- Keudel M, Schrader S (1999) Axial and radial pressure exerted by earthworms of different ecological groups. *Biol Fert Soils* 29:262–269
- Killham K (1994) Soil Ecology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 243
- Komulainen VM, Tuittila ES, Vasander H, Laine J (1999) Restoration of drained peatlands in southern Finland: initial effects on vegetation change and CO₂ balance. *J Appl Ecol* 36:634–648
- Le Bayon RC, Binet F (1999) Rainfall effects on erosion of earthworm casts and phosphorus transfers by water runoff. *Biol Fert Soils* 30:7-13
- Le Bayon RC, Binet F (2006) Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biol Biochem* 38:235–246
- Lachance D, Lavoie C (2004) Vegetation of *Sphagnum* bogs in highly disturbed landscapes: relative influence of abiotic and anthropogenic factors. *Appl Veg Sci* 7:183-192
- Laine J, Silvola J, Tolonen K, Alm J, Nykänen H, Vasander H, Sallantausta T, Savolainen I, Sinisalo J, Martikainen PJ (1996) Effect of water-level drawdown on global climatic warming: Northern Peatlands. *Ambio* 25:179-184
- Lappalainen E (1996) General review on world peatland and peat resources. In : Lappalainen E (Ed), Global peat resources, UNESCO, International Peat Society, Geological Survey of Finland, pp 53-56
- Lashof DA, DeAngelo BH, Saleska SR, Harte J E (1997) Terrestrial ecosystem feedbacks to global climate change. *Annu Rev Energ Env* 22:75-118
- Lavelle P (1988) Earthworm activities and the soil system. *Biol Fert Soils* 6:237-251
- Lavelle P, Pashanasi B, Charpentier F, Gilot C, Rossi JP, Derouard L, Andre J, Ponge JF, Bernier N (1998) Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics. In: Edwards CA (ed), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA. pp 103-122
- Lavelle P, Spain AV (2001) Soil Ecology. Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 654
- Lavelle P (2002) Functional domains in soils. *Ecol Res* 17:441-450
- Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct Ecol* 16:545–556
- Lee KE (1985) Earthworms: their ecology and relationship with soils and land use. Academic Press, Sydney, pp 411
- Limpens J, *et al.* (2011) Climatic modifiers of the response to nitrogen deposition in peat-forming *Sphagnum* mosses: a meta-analysis. *New Phytol* 191:496-507
- Lundkvist H (1982) Population dynamics of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in a Scots pine forest soil in central Sweden. *Pedobiologia* 23:21-41

- Makulec G (1993) Abundance and biomass of earthworms (Lumbricidae) in hydrogenous soils under various degree of mucking. *Z Probl Postępów Nauk Rol* 406:119-127
- Malmer N, Svensson BM, Wallen B (1994) Interactions between *Sphagnum* mosses and field layer vascular plants in the development of peat-forming systems. *Folia Gebot Phytotx* 29:483-496
- Manneville O, Vergne V, Villepoux O et le Groupe d'Etude des Tourbières (1999) Le monde des tourbières et des marais, France, Suisse, Belgique et Luxembourg. Delachaux et Niestlé, Lausanne, pp 320
- Maraldo K, Schmidt IK, Beier C, Holmstrup M (2008) Can field populations of the enchytraeid, *Cognettia sphagnetorum*, adapt to increased drought stress? *Soil Biol Biochem* 40:1765-1771
- Maraldo K (2009) Enchytraeidae (Oligochaeta) in a changing climate: Ecology and ecophysiology of enchytraeids exposed to climate changes. Thèse de doctorat, Universités de Copenhague et d'Aarhus, pp 128
- Martikainen PJ, Nykänen H, Alm J, Silvola J (1995) Change in fluxes of carbon dioxide, methane and nitrous oxide due to forest drainage of mire sites of different trophy. *Plant Soil* 168-169:571-577
- Martikainen PJ (1996) The fluxes of greenhouse gases CO₂, CH₄ and N₂O in northern peatlands. In: Lappalainen E (ed), *Global Peat Resources*, UNESCO, International Peat Society, Geological Survey of Finland, pp 29-36
- Matthies C, Griebhammer A, Schmittroth M, Drake HL (1999) Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms obtained from garden and forest soils. *Appl Environ Microb* 65:3599-3604
- Meharg (1994) A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon-flow. *Plant Soil* 166:55-62
- Mellegard H, Stalheim T, Hormazabal V, Granum PE, Hardy SP (2009) Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Lett Appl Microbiol* 49:85-90
- 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. *J Plant Nutr Soil Sc* 162:373-383
- Molau U (1997) Responses to natural climatic variation and experimental warming in two tundra plant species with contrasting life forms: *Cassiope tetragona* and *Ranunculus nivalis*. *Glob Change Biol* 3:97-107
- Morris JT (1991) Effects of nitrogen loading on wetlands ecosystems with particular reference to atmospheric deposition. *Annu Rev Ecol Syst* 22:257-279
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375-396
- Nilsson M (1992) Methane production from peat, regulated by organic chemical composition, elemental and anion concentrations, pH and depth. In: Swedish National Committee of IPS (ed), *Peat in Nature and Industry – A Matter of Balance*, Proc. 9th Int. Peat Cong., Uppsala, Sweden, 22-26 June, 3, pp 125-133
- O'Neill KP (2000) Role of bryophyte-dominated ecosystems in the global carbon budget. In : Shaw AJ, Goffinet B (eds), *Bryophyte Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 344-368
- Opelt K, Chobot V, Hadacek F, Schonmann S, Eberl L, Berg G (2007) Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. *Environ Microbiol* 9:2795-2809

- Page SE, Siegert F, Rieley JO, Boehm HDV, Jaya A, Limin S (2002) The amount of carbon released from peat and forest fires in Indonesia during 1997. *Nature* 420:61-65
- Painter TJ (1991) Lindow Man, Tollund Man and other peat bodies: the preservative and antimicrobial action of sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties. *Carbohydr Polym* 15:123-142
- Pakarinen P (1975) Bogs as peat-producing ecosystems. *Bull Int Peat Soc* 7:51-54
- Parkin TB, Berry EC (1999) Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biol Biochem* 31:1765-1771
- Parle JN (1963) A microbiological study of earthworm casts. *J Gen Microbiol* 31:13-22
- Panikov NS (2010) Microbial Ecology. In: Wang LK, Ivanov V, Tay JH, Hung YT (eds), *Environmental Biotechnology, Handbook of Environmental Engineering™, Volume 10*, Springer, New York, pp 121-192
- Poll C, Ingwersen J, Stemmer M, Gerzabek MH, Kandeler E (2006) Mechanisms of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganisms in the detritusphere. *Eur J Soil Sci* 57:583-595
- Powlson DS, Barraclough D (1993) Mineralization and assimilation in soil-plant systems. In: Knowles R, Blackburn TH (eds), *Nitrogen isotope techniques*. Academic Press Inc., San Diego, Calif, pp 209-242
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649
- Raper SCB, Braithwaite RJ (2006) Low sea level rise projections from mountain glaciers and icecaps under global warming. *Nature* 439:311-313
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN (ed), *The sea, Vol 2. The composition of sea-water comparative and descriptive oceanography*, Interscience Publishers, New York, pp 26-77
- Rhee GY (1972) Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. *Limnol Oceanogr* 17:505-514
- Richert M, Saarnio S, Juutinen S, Silvola J, Augustin J, Merbach W (2000) Distribution of assimilated carbon in the system *Phragmites australis*-waterlogged peat soil after carbon-14 pulse labelling. *Biol Fert Soils* 32:1-7
- Ricklefs RE, Miller GL (2000) *Ecology*, 4th ed., WH Freeman, USA, New York, pp 822
- Rocheffort L (2000) *Sphagnum* – A keystone genus in habitat restoration. *Bryologist* 103:503-508
- Roulet NT, Moore T, Bubier T, Lafleur P (1992) Northern fens: methane flux and climatic change. *Tellus* 44B:100-105
- Roulet NT (2000) Peatlands, carbon storage, greenhouse gases, and the Kyoto protocol: Prospects and significance for Canada. *Wetlands* 20:605-615
- Rydin H, Jeglum JK (2006) *The Biology of Peatlands*. Oxford University Press, Oxford, pp 360
- Saad OALO, Conrad R (1993) Temperature dependence of nitrification, denitrification, and turnover of nitric oxide in different soils. *Biol Fert Soils* 15:21-27
- Satchell JE (1980) 'r' worms and 'K' worms: a basis for classifying lumbricid earthworm strategies. In: Dindal DL (ed) *Soil biology as related to land use practices*, Proc. 7th Intl Colloq. Soil Zool. Syracuse, Environmental Protection Agency, Washington DC, pp 848-854

- Scheu S (1991) Mucus excretion and carbon turnover of endogeic earthworms. *Biol Fertil Soils* 12:217-220
- Silvola J, Aaltonen H (1984) Water content and photosynthesis in the peat mosses *Sphagnum fuscum* and *S. angustifolium*. *Ann Bot Fenn* 21:1-6
- Six J, Bossuyt H, Degryze S, Deneff K (2004) A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till Res* 79:7-31
- Sonesson M, Carlsson BA, Callaghan TV, Halling S, Björn LO, Bertgren M, Johanson U (2002) Growth of two peat-forming mosses in subarctic mires: species interactions and effects of simulated change. *Oikos* 99:151-160
- Sterner RW, Elser JJ (2002) *Ecological Stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA
- Ström L, Ekberg A, Mastepanov M, Christensen TR (2003) The effect of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from a tundra wetland. *Glob Change Biol* 9:1185-1192
- Ström L, Mastepanov M, Christensen TR (2005) Species-specific effects of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from wetlands. *Biogeochemistry* 75:65-82
- Sullivan PF, Arens SJT, Chimner RA, Welker JM (2008) Temperature and microtopography interact to control carbon cycling in a high arctic fen. *Ecosystems* 11:61-76
- Sundh I, Nilsson M, Granberg G, Svensson BH (1994) Depth distribution of microbial production and oxidation of methane in northern boreal peatlands. *Microbial Ecol* 27:253-265
- Swinnen J, Van Veen JA, Merckx R (1994) Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: Model calculations based on ¹⁴C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biol Biochem* 26:171-182
- Tate III RL (1995) *Soil Microbiology*, Wiley, USA, New York
- Titus JE, Wagner DJ, Stephens MD (1983) Contrasting water relations of photosynthesis for two *Sphagnum* mosses. *Ecology* 64:1109-1115
- Tiunov AV, Scheu S (1999) Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol Biochem* 31:2039-2048
- Tiunov AV (2007) Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies. *Biol Bull* 34:395-407
- Treonis AM, Ostle NJ, Stott AW, Primrose R, Grayston SJ, Ineson P (2004) Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biol Biochem* 36:533-537
- Turunen J, Roulet NT, Moore TR (2004) Nitrogen deposition and increased carbon accumulation in ombrotrophic peatlands in eastern Canada. *Global Biogeochem Cy* 18:GB3002
- Urban NR, Eisenreich SJ, Bayley SE (1988) The relative importance of denitrification and nitrate assimilation in bogs. *Limnol Oceanogr* 33:611-617
- van Breemen N (1995) How *Sphagnum* bogs down other plants. *Trends Ecol Evol* 10:270-275
- Verhoeven JTA, Toth E (1995) Decomposition of *Carex* and *Sphagnum* litter in fens – effect of litter quality and inhibition by living tissue-homogenates. *Soil Biol Biochem* 27:271-275
- Vitt DH, Wieder K, Halsey LA, Turetsky M (2003) Response of *Sphagnum fuscum* to nitrogen deposition: A case study of ombrogenous peatlands in Alberta, Canada. *Bryologist* 106:235-245

- Waddington JM, Strack M, Greenwood MJ (2010) Toward restoring the net carbon sink function of degraded peatlands: Short-term response in CO₂ exchange to ecosystem-scale restoration. *J Geophys Res* 115, G01008, doi:10.1029/2009JG001090
- Wallander H, Nilsson LO, Hagerberg D, Rosengren U (2003) Direct estimates of C:N ratios of ectomycorrhizal mycelia collected from Norway spruce forest soils. *Soil Biol Biochem* 35:997-999
- Ward SE, Bardgett RD, McNamara NP, Ostle NJ (2009) Plant functional group identity influences short-term peatland ecosystem carbon flux: evidence from a plant removal experiment. *Funct Ecol* 23:454-462
- Watson A, Nedwell DB (1998) Methane production and emission from peat: the influence of anions (sulphate, nitrate) from acid rain. *Atmos Environ* 32:3239-3245
- Weltzin JF, Pastor J, Harth C, Bridgham SD, Updegraff K, Chapin CT (2000) Response of bog and fen plant communities to warming and water-table manipulations. *Ecology* 81:3464-3478
- Weltzin JF, Harth C, Bridgham SD, Pastor J, Vonderharr M (2001) Production and microtopography of bog bryophytes: response to warming and water-table manipulations. *Oecologia* 128:557-565
- Weltzin JF, Bridgham SD, Pastor J, Chen JQ, Harth C (2003) Potential effects of warming and drying on peatland community composition. *Glob Change Biol* 9:141-151
- Whalen JK, Parmelee RW, Edwards CA (1998) Population dynamics of earthworm communities in corn agroecosystems receiving organic or inorganic fertilizer amendments. *Biol Fert Soils* 27:400-407
- Whalen JK, Parmelee RW, McCartney DA, Vanarsdale JL (1999) Movement of N from decomposing earthworm tissue to soil, microbial and plant N pools. *Soil Biol Biochem* 31:487-492
- Whalen JK, Parmelee RW (2000) Earthworm secondary production and N flux in agroecosystems: a comparison of two approaches. *Oecologia* 124:561-573
- Whalen JK, Parmelee RW, Subler S (2000) Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. *Biol Fert Soils* 32:347-352
- Wheeler BD, Proctor MCF (2000) Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J Ecol* 88:187-203
- Williams BL, Griffiths BS (1989) Enhanced nutrient mineralization and leaching from decomposing sitka pruce litter by enchytraeid worms. *Soil Biol Biochem* 21:183-188
- Wolters V (1997) Functional implications of biodiversity in soil. Office for Official publications of the European Community, pp 133
- Zacheis A, Doran K (2009) Resistance and resilience of floating mat fens in interior Alaska following Airboat disturbance. *Wetlands* 29:236-247
- Zaller JG, Caldwell MM, Flint SD, Ballaré CL, Scopel AL, Sala OE (2009) Solar UVB and warming affect decomposition and earthworms in a fen ecosystem in Tierra del Fuego, Argentina. *Glob Change Biol* 15:2493-2502
- Zhang H, Schrader S (1993) Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biol Fert Soils* 15:229-234
- Zhang QL, Hendrix PF (1995) Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) effects on carbon flux in soil. *Soil Sci Soc Am J* 59:816-823

CHAPITRE II

Sites d'études, protocoles et stratégies d'investigation à différents niveaux d'organisation

1. Choix des sites contraints aux changements globaux

1.1. Tourbière naturelle et impact du réchauffement climatique : Tourbière de Frasne (25)

La tourbière naturelle étudiée est celle de Frasne (ou tourbière du Forbonnet ; 46° 49' 35" N ; 6° 10' 20" E). D'une surface totale de 98 ha, elle est située à une altitude d'environ 840 m au dessus de la mer sur la commune de Frasne (Doubs) (Figure 1). Elle se localise dans le bassin du Drugeon, vallée orientée sud-ouest nord-est située dans les départements du Jura (39) et du Doubs (25) dans la région de Franche-Comté. Le bassin du Drugeon est l'un des sites naturels les plus remarquables de Franche-Comté. Au total, 37 sites tourbeux ont été recensés dans le bassin du Drugeon pour une superficie totale de 1057 ha. Il est protégé par de nombreux dispositifs réglementaires (Magnon et Terraz 2002) : réserve naturelle régionale de Franche-Comté, site Natura 2000, site RAMSAR et arrêté préfectoral de protection de biotope. Les milieux naturels présents sont de renommée nationale voire internationale comme l'atteste la présence de nombreux habitats et espèces protégées à l'échelle nationale et européenne (*Hottonia palustris*, *Pinguicula vulgaris*, *Drosera* spp., *Scheuchzeria palustris*, *Andromeda polifolia*,...). Les habitats sont très peu dégradés même si ils subissent une fermeture progressive par le pin à crochet et l'épicéa (Magnon et Terraz 2002).

La tourbière de Frasne s'est formée dans une dépression périglaciaire imperméabilisée au début de la période Atlantique il y a 7 500 ans B.P. (Campy et Richard 1987). L'accumulation de tourbe dans les dépressions du bassin du Drugeon peut atteindre actuellement plusieurs mètres d'épaisseur (Duraffourg et Palacio 1981). La région de Frasne est soumise à un climat montagnard continental (Manneville *et al.* 1999). Des hivers froids (moyenne de -1.4°C) et des étés doux (moyenne de 14.6°C) caractérisent le site. La température moyenne annuelle mesurée entre 2008 et 2010 était de 6.5 °C avec des précipitations annuelles de 1 200 mm. C'est en raison de ce contexte que la tourbière de Frasne a été choisie pour l'installation d'une station d'étude expérimentale sur l'effet du réchauffement climatique.

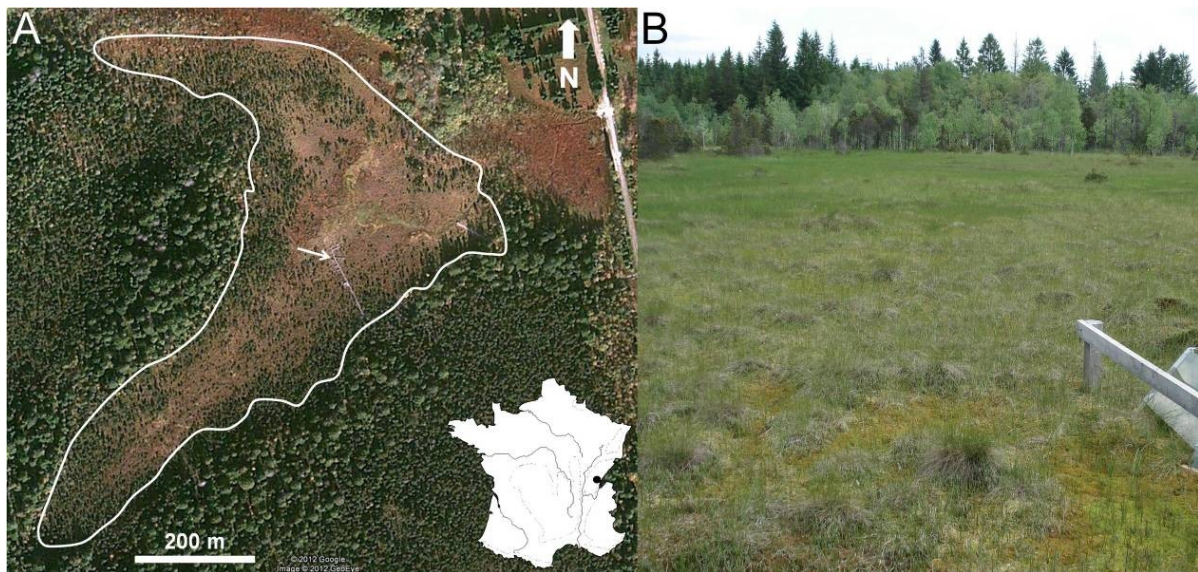


Figure 1. **A** Localisation de la station expérimentale à la tourbière de Frasne (image satellite Google Earth du 15/10/2010). **B** Photographie de la tourbière de Frasne prise le 22 juin 2010

La station expérimentale du projet PEATWARM a été installée en mai 2008 (Figure 1). D'une surface avoisinant les 100 m², la station d'étude est caractérisée par un gradient hydrologique avec une zone de haut-marais ombrogène (bog alimenté par les eaux météoriques) et une zone de bas-marais géogène (fen alimenté par les eaux météoriques et le ruissèlement). Le bog est caractérisée par des buttes (hummocks) dominées par *Sphagnum magellanicum*, *Eriophorum vaginatum*, *Vaccinium oxycoccos* et *Calluna vulgaris*, et des creux (hollows) avec des tapis de *Sphagnum fallax*, *Andromeda polifolia* et *Carex rostrata*. Le fen est caractérisée par une couverture de mousse dominée par *S. fallax* et des plantes vasculaires en faibles abondances comme *C. rostrata*, *E. vaginatum*, *V. oxycoccos* et *A. polifolia*. Six placettes contrôles et six placettes équipées de dispositifs de réchauffement ont été mises en place dans les deux habitats bog (placettes 1 à 6) et fen (placettes 7 à 12) (Figure 2). L'augmentation modérée de la température de l'air a été passivement accomplie en plaçant des open-top chambers (OTCs) au dessus de la végétation (Figure 2). Les OTCs ont été confectionnés conformément au système standardisé ITEX (International Tundra EXperiment) qui permet d'obtenir une transmittance des longueurs d'onde du visible proche de l'état naturel et de minimiser la transmittance des longueurs d'onde infra-rouge réémise (Marion 1996). Afin de réduire les effets de bord, tel que la réduction des précipitations dans l'OTC, le schéma de conception décrit par Aerts *et al.* (2004) a été retenu.

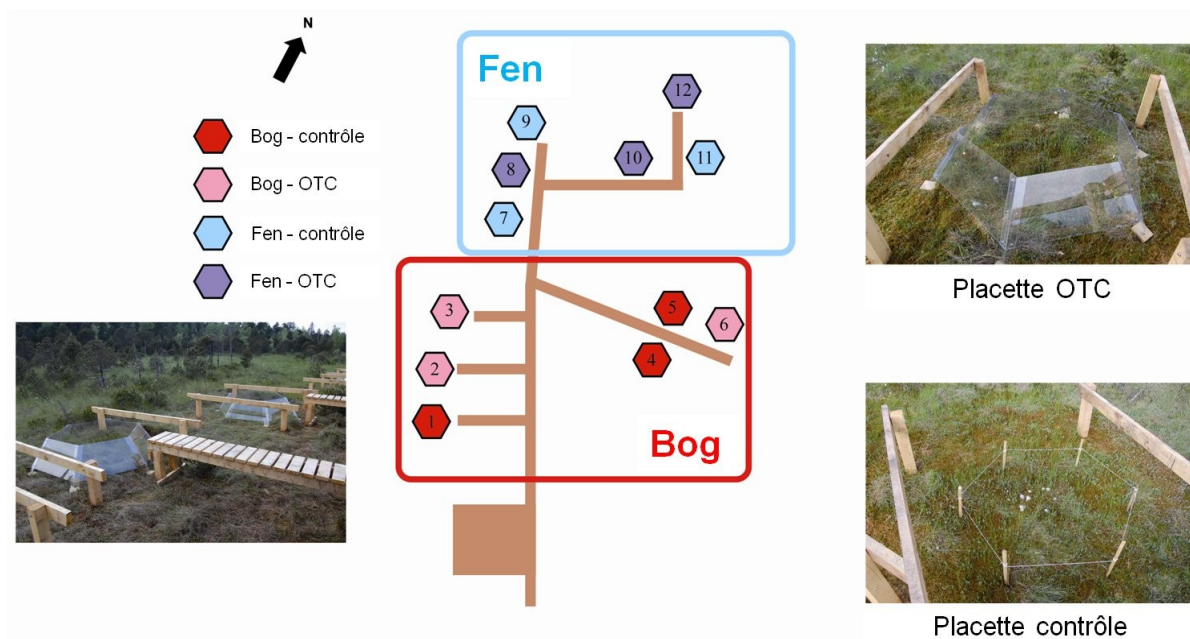


Figure 2. Dispositif expérimental « réchauffement climatique » et vues des placettes OTC et contrôle (modifié d'après Delarue 2011)

Différents paramètres biotiques (suivi de végétation, suivi des communautés d'amibes à thèques des sphaignes,...) et abiotiques (température de l'air, température du sol, niveaux d'eau, pluviométrie,...) ont été mesurés de façons continues (station météorologique alimentée par un panneau solaire) ou discontinues, pendant toute la période du projet PEATWARM (2008 à 2011). Ainsi, les mesures de températures de l'air effectuées à 10 cm au-dessus des capitula de sphaignes indiquent que les OTCs, en bog et en fen, ont induit une augmentation moyenne de la température de 1°C (Delarue *et al.* 2011 ; Jassey *et al.* 2011 ; Jassey *et al.* 2012). Nous parlerons ensuite d'un effet « changement climatique » car les OTCs ont provoqué une augmentation du phénomène d'évapotranspiration entraînant une diminution de la teneur en humidité de la partie supérieure de la tourbe (Delarue *et al.* 2011 ; Jassey *et al.* 2011). Les principales caractéristiques physico-chimiques de la tourbe au moment des prélèvements en août 2010 sont les suivantes : pH = 4.0 ± 0.1 ; conductivité = 49 ± 4 mV ; taux d'humidité = 94 % ; % C = 44.0 ± 0.4 ; % N = 1.0 ± 0.1 ; % S = 0.1 ± 0.0 (données non publiées).

1.2. Tourbière en phase de régénération : Tourbière de Baupte (50)

La tourbière de Baupte (49° 16' 51" N; 1° 23' 31" O) se situe dans le parc naturel régional des Marais du Cotentin et du Bessin, dans la commune de Gorges dans le département de la Manche (Figure 3). Proche des côtes normandes et à une altitude proche du niveau de la mer (< 1 m d'altitude), la tourbière est sous influence océanique et couvre une surface d'environ 660 ha. Les précipitations moyennes annuelles sont d'environ 1 200 mm et de faibles amplitudes annuelles des températures caractérisent la douceur du climat (entre 19 et 24 °C en été et entre 1 et 5 °C en hiver).

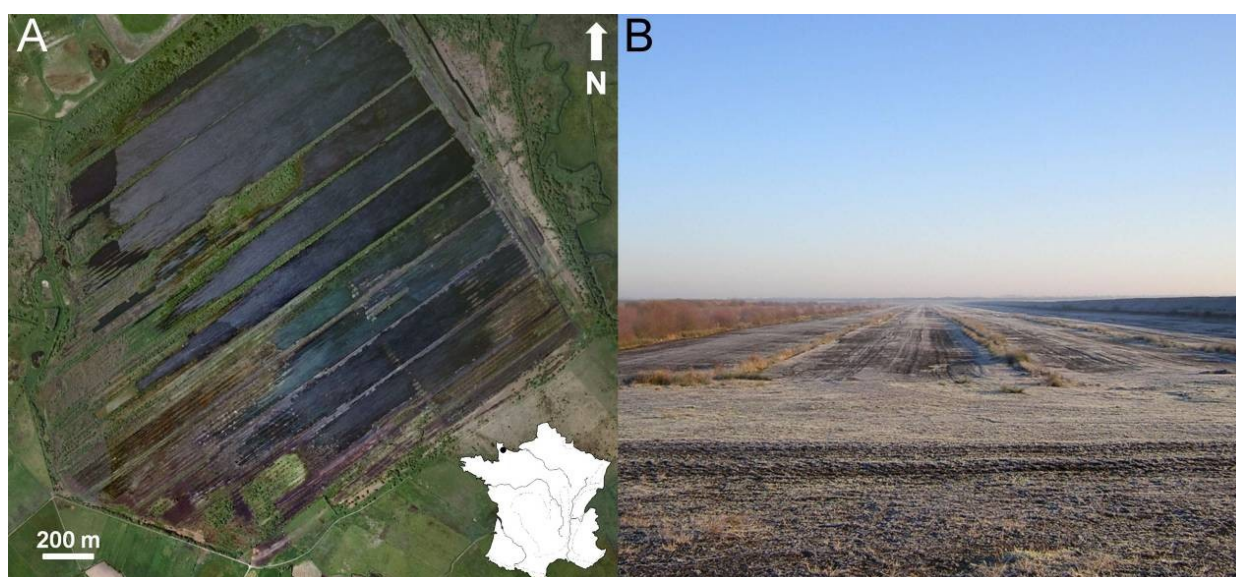


Figure 3. **A** Localisation de la tourbière de Baupte (image satellite Google Earth du 01/01/2007). **B** Photographie de la partie sud-ouest de la tourbière prise en 2007 (A-J Francez)

La tourbière de Baupte est située au centre d'une cuvette topographique : le marais de Gorges. Ce bassin d'effondrement se caractérise i) par un socle dominé par des faluns qui sont des dépôts de sédiments (coquilles) d'origine marine du Cénozoïque (-65 à -2.5 Ma) et ii) une fine couche d'argiles bleues saumâtres à diatomées certainement responsable des conditions hydromorphes qui ont favorisé la genèse de la tourbière (Clément et Danais 2001 ; Clément et Francez 2001). Le début du processus de tourbification dans ce bassin remonte à environ 9000 ans B.P. Toutefois, depuis cette période, plusieurs phases de tourbification se sont succédées : passage d'un mode minérotrophique (6 000 à 5 000 ans B.P.) à un mode ombrotrophique de haut-marais par des processus de paludification (Clément et Danais 2001). La tourbière est principalement alimentée par les précipitations mais aussi probablement par des flux

souterrains venant de l'aquifère des faluns sous-jacent (Lucassou 2011). Avant le début de l'exploitation de la tourbière dans les années 40, l'épaisseur de tourbe était comprise entre 2 et 12 m (moyenne 7 à 8 m) (Clément et Francez 2001).

La tourbière a été exploitée très localement et de façon artisanale, par les paysans à partir de 1941 pour la production de briquettes de tourbe. L'extraction industrielle sous sa forme la plus intensive a débuté en 1949, par décapage superficiel de la tourbe de manière entièrement mécanisée sur près de 450 ha (Clément et Danais, 2001). La tourbière de Baupte était le plus grand site d'extraction industrielle de tourbe en France, tant par sa superficie (près de 450 ha exploités sur 582 autorisés) que par le volume extrait (70 000 tonnes jusqu'en 1994 et 30 000 tonnes depuis) (Mégrien 1999). La réhabilitation du milieu a commencé en 1995 par la remise en eau de la partie Nord de la tourbière. En 1998, la partie ré-humidifiée s'étendait alors sur près de 220 ha.

La remise en eau des zones anciennement exploitées a favorisé une recolonisation végétale partielle (Figure 4). Les principales espèces pionnières sont des herbacées, des Joncs (*Eleocharis palustris*, *Triglochin palustre*), des Poacées (*Agrostis stolonifera*, *Phragmites australis*), et en moindre quantité des Cypéracées (*Eriophorum angustifolium*) (Clément et Danais 2001).



Figure 4. Partie nord-ouest de la tourbière recolonisée par *Phragmites australis* (A. Gicquel en mai 2008)

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la tourbe de Baupte sont les suivantes : pH = 5,4 ; $[\text{SO}_4^{2-}] = 53.2 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{PO}_4^{3-}] < 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{Ca}^{2+}] = 41.6 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{K}^+] = 3.0 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{Na}^+] = 16.8 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{Fe}]_{\text{total}} = 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$; % C = 45.9 ± 0.2 ; % N = 2.0

± 0.0 ; % S = 0.8 ± 0.0 (données 2005 et 2006 non publiées ; Gicquel *et al.* sous presse). La tourbe de Baupte est relativement riche en S comme l'atteste les fortes concentrations en sulfates et en S élémentaire mesurées. Le S est certainement issu de l'érosion de la roche mère et serait transféré par des flux souterrains venant de l'aquifère des faluns sous-jacents. En effet, la perméabilité de la couche d'argile séparant la tourbe des sables est trop élevée pour constituer une barrière hydraulique efficace entre la tourbière et l'aquifère des sables (Auterives 2007).

2. Stratégies expérimentales à différents niveaux d'organisation

La démarche de ce travail de thèse a été hiérarchisée à différents niveaux d'organisation (individu, communauté et écosystème) pour caractériser et quantifier l'impact des changements globaux sur les interactions biotiques majeures pilotant les processus de transformations biogéochimiques en tourbière. L'approche par microcosme a permis de travailler à l'échelle d'un individu, le ver de terre épi-anécique *L. rubellus*. L'approche par mésocosme a permis de travailler aussi bien à l'échelle des communautés microbiennes de la tourbe (à l'interface entre le niveau de nappe et les sphaignes vivantes), que celle des écosystèmes tourbière à *Sphagnum* et tourbière en régénération avec *L. rubellus* et *E. angustifolium*. Ce sont des modèles expérimentaux dont on a contrôlé les paramètres abiotiques (température, humidité et lumière) pendant toutes les durées d'expérimentation (enceinte climatique).

2.1. Prélèvements tourbe

2.1.1 Mésocosmes de tourbe : niveau des communautés et de l'écosystème

Deux types de mésocosmes ont été utilisés en fonction de la tourbe utilisée. Pour les mésocosmes de Frasne, la tourbe a été directement prélevée dans les 12 parcelles des habitats bog et fen (Figure 2) à partir de tubes de polychlorure de vinyl (PVC) crépinés sur toute la hauteur, de 25 cm de hauteur et 10 cm de diamètre (Figure 5A). Les mésocosmes ont ensuite été placés dans des bacs (12 cm de diamètre × 25 cm de hauteur) remplis avec de l'eau de source faiblement minéralisée (Auvergne, France ; pH = 7.3; $[\text{HCO}_3^-] = 25.8 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{SO}_4^{2-}] = 1.1 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_3^-] = 0.8 \text{ mg.L}^{-1}$) dont le niveau a été maintenu constant à 10 cm en dessous des capitula de sphaignes (zone d'interface) (Figure 5B et 5C).

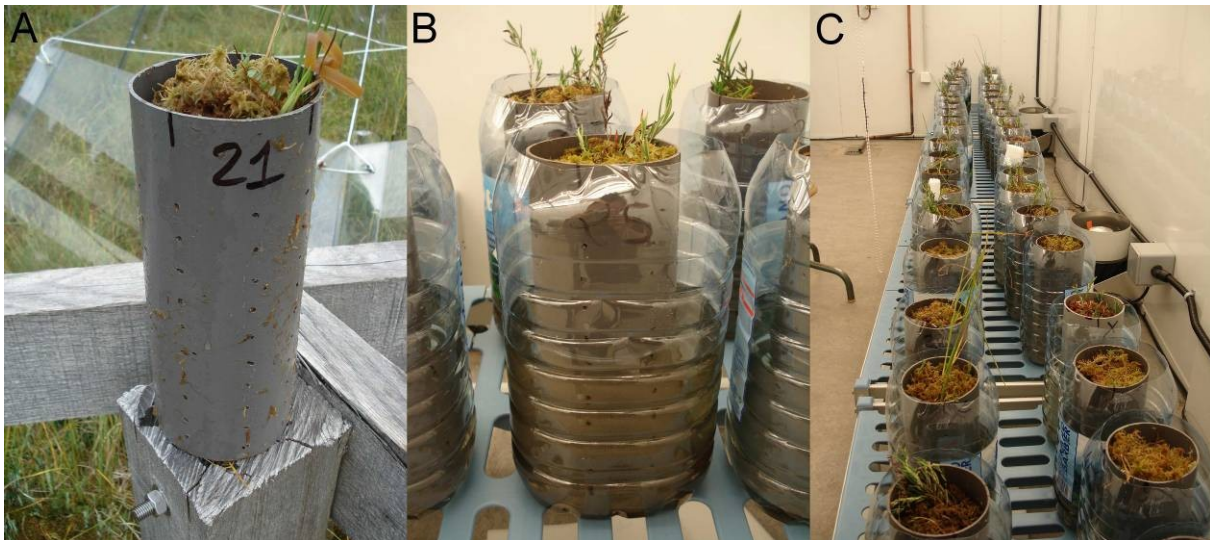


Figure 5. **A** Mésocosme de tourbe prélevé à la tourbière de Frasne. **B** Mésocosme de tourbe dans un bac remplie d'eau de source. **C** Vue d'ensemble des mésocosmes dans l'enceinte climatique

Pour la tourbe de Baupte, il s'agit de mésocosmes de tourbe reconstituée (12 cm de diamètre \times 18 cm de hauteur). La tourbe a été prélevée en surface dans une zone décapée de la tourbière. Elle a été préalablement tamisée à 4 mm avant d'être compactée à la densité « naturelle » ($0.83 \text{ g de tourbe sèche.cm}^{-3}$) dans des tubes en PVC crépinés à la base sur une hauteur de 6 cm pour permettre une meilleure circulation de l'eau. Les mésocosmes ont ensuite été placés dans des pots contenant une solution nutritive d'eau minérale naturelle (Luchon, France; $\text{pH} = 8$; $[\text{HCO}_3^-] = 78.1 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{SO}_4^{2-}] = 8.2 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_3^-] = 1.8 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figure 6). Les mésocosmes ont été maintenus à un niveau d'eau de $3 \pm 1 \text{ cm}$ à la base par un apport régulier d'eau minérale. Un tissu maillé de 1 mm de porosité a été fixé à l'extrémité afin d'éviter une dispersion de la tourbe dans le pot.

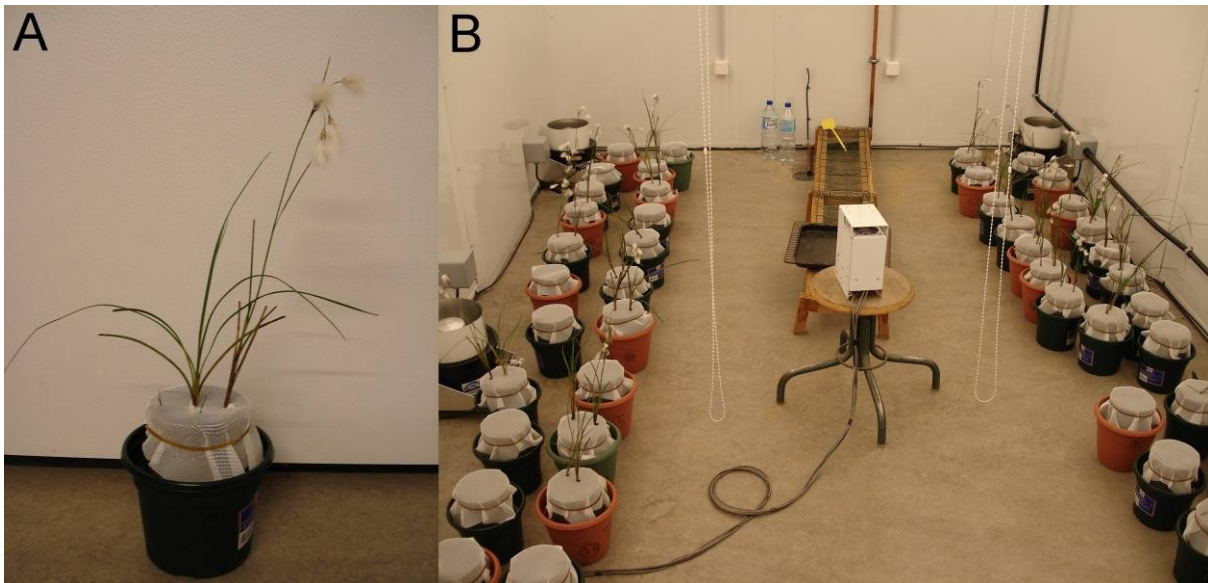


Figure 6. **A** Mésocosme de tourbe reconstituée de Baupte. **B** Vue d'ensemble des mésocosmes dans l'enceinte climatique

2.1.2 Microcosmes de tourbe : niveau de l'individu

Des microcosmes de tourbe ont été réalisés pour mettre en évidence le rôle de *L. rubellus* dans le recyclage des éléments C, N et S. Pour chaque microcosme, 80 g de tourbe tamisée à 4 mm ont été légèrement tassés dans des boîtes en polycarbonate de 200 mL de volume et 8 cm de diamètre (Figure 7). Vingt mL d'eau distillée et 80 mg de litière d'*A. stolonifera* (en masse sèche) comme ressource alimentaire additionnelle ont été ajoutés dans chaque microcosme.



Figure 7. Microcosmes de tourbe de Baupte dans lesquels sont placés les vers de terre *L. rubellus*

2.2. Stratégies de marquage ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S

Différentes stratégies de marquage ont été utilisées selon les éléments C, N et S et les organismes utilisés (plantes, vers de terre et microorganismes). Au cours des différentes expérimentations présentées dans ce travail de thèse, il a exclusivement été utilisé les isotopes lourds ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S .

Le traçage du C a été réalisé avec :

- Du ^{13}C -glucose (D-glucose, U- $^{13}\text{C}_6$ à 99 Atom % de ^{13}C ; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France) pour le marquage des vers de terre et des mésocosmes de Frasne. Le ^{13}C -glucose a été préféré à d'autres substrats enrichis en ^{13}C car il est facilement assimilable par tous les microorganismes,
- Et du $^{13}\text{CO}_2$ ($^{13}\text{CO}_2$ à 99 Atom % de ^{13}C ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, U.S.A) pour le marquage des plantes.

Le traçage de l'N a été réalisé avec :

- Du chlorure d'ammonium ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ à 99 Atom % de ^{15}N ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, U.S.A.) pour le marquage des vers de terre et des mésocosmes de Frasne. L'ammonium enrichi en ^{15}N est la source la plus adaptée car il y a peu de dénitrification en tourbière et donc pas de nitrates ou très peu,
- Et du nitrate d'ammonium marqué sur les 2 atomes d'N ($^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ à 99 Atom % de ^{15}N ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, U.S.A.) pour le marquage des plantes.

Le traçage du S a été réalisé avec :

- Du S élémentaire (^{34}S élémentaire à 99 % d'Atom % de ^{34}S ; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France) pour le marquage des vers de terre. On suppose ici que le ^{34}S est utilisé par les bactéries (oxydation en $^{34}\text{SO}_4^{2-}$),
- Et du sulfate marqué ($^{34}\text{SO}_4^{2-}$) pour le marquage des plantes et des mésocosmes de Frasne.

Le sulfate marqué a été préparé à partir de ^{34}S élémentaire selon un protocole modifié de Zhao *et al.* (2001). Brièvement, 30 mL de HNO_3 (65 % v/v) et 6 mL de KNO_3 (2 M) ont été ajoutés à 200 mg de ^{34}S élémentaire puis chauffés jusqu'à 160 °C dans un ballon muni d'un réfrigérant pendant environ 3 heures. Après refroidissement du ballon, 30 mL d' H_2O_2 (30 % v/v) a été ajouté pour neutraliser l'excès de NO_3^- . La température du ballon a ensuite été

maintenue à 120 °C jusqu'à obtention d'un résidu sec de K₂SO₄. L'analyse du K₂SO₄ par EA-IRMS a démontré un Atom % en ³⁴S supérieur à 90 %.

Tous les enrichissements isotopiques ont été réalisés en respectant la stœchiométrie C:N:S de la tourbe. De plus, les apports isotopiques ont été réalisés en faibles doses, ce qui doit en théorie uniquement leur faire jouer un rôle de traceur et non de fertilisant.

2.2.1. Marquage mésocosmes Frasne

Pour l'expérimentation avec la tourbe de Frasne, les traceurs ont été ajoutés et mélangés directement à l'eau des bacs, à savoir pour chaque mésocosme : 261.6 mg de ¹³C-glucose, 8.9 mg de ¹⁵NH₄Cl et 1.3 mg de K₂³⁴SO₄. Les mésocosmes étant intacts, l'alimentation par la nappe d'eau permet d'étudier l'utilisation des traceurs par les microorganismes et les plantes. Les mésocosmes ont ensuite été placés en conditions contrôlées de lumière, de température et d'humidité en enceinte climatique (Convicon GR96 ; cycle jour/nuit : 16/8 heures ; radiation de 10 à 150 μmol; 10 °C la nuit et 15 °C le jour ; humidité = 70 ± 5%) pendant toute la durée de l'expérimentation (6 jours).

2.2.2. Marquage lombriciens

Une seule espèce de lombriciens a été utilisée au cours de ce travail de recherche, l'espèce *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843) (Figure 8A). Il s'agit d'un ver de terre épi-anécique typique de sols organiques qui colonise la tourbière anciennement exploitée de Baupte. Les vers de terre ont été collectés par la méthode au formaldéhyde (Bouché et Aliaga 1986) sur des carrés de 1 m² de végétation (*E. angustifolium* et *A. stolonifera*). L'abondance en *L. rubellus* était de 10.5 ± 4.7 individus.m⁻² correspondant à une biomasse de 4.9 ± 3.1 g de matière fraîche.m⁻² (moyennes ± S.E.). Les vers de terre ont ensuite été stockés à 15 °C à l'abri de la lumière dans la tourbe, des mottes d'*A. stolonifera* avec leurs racines assurant leur nutrition. Un jour avant le marquage, les vers de terre sont triés en différentes classes selon leur biomasse (Annexe I).

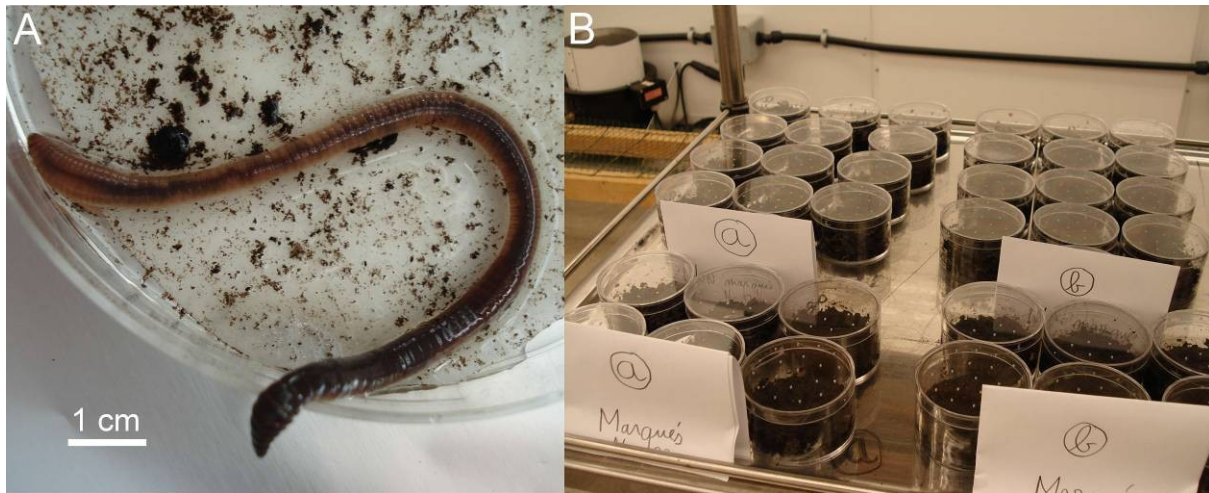


Figure 8. **A** Individu adulte de *Lumbricus rubellus*. **B** Marquage des vers de terre dans la tourbe enrichie en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S

Le marquage des vers de terre est basé sur un enrichissement préliminaire de la tourbe et des microorganismes présents dans celle-ci (période d'incubation). Les lombriciens s'enrichissent ensuite au contact et en ingérant de la tourbe enrichie en isotopes lourds (période de marquage) (Figure 8B). Pour l'expérimentation portant sur l'expression des traits écophysologiques de *L. rubellus* (chapitre III-2), les vers de terre marqués ont été transférés individuellement dans les microcosmes de tourbe non marquée correspondant à ce que nous avons nommé période de démarquage. Pour l'expérimentation portant sur le rôle des interactions biotiques sur les transferts C-N-S (chapitre IV), 3 vers de terre marqués ont été transférés dans les mésocosmes de tourbe reconstituée non marquée. La figure 9 détaille chaque étape de l'expérimentation en microcosmes (phases de marquage et de démarquage) et en mésocosmes (marquage = 16 jours). Durant toutes les périodes de marquage et de démarquage, les microcosmes et mésocosmes de tourbe ont été placés sous conditions contrôlées en enceinte climatique (Conviron GR96 ; cycle jour/nuit : 16/8 heures ; radiation de 10 à 150 μmol ; 10 °C la nuit et 15 °C le jour ; humidité = $70 \pm 5\%$). Pour les deux expérimentations, un lot de vers de terre « contrôle » a été cultivé dans de la tourbe non marquée avec les mêmes volumes de tourbe et conditions climatiques.

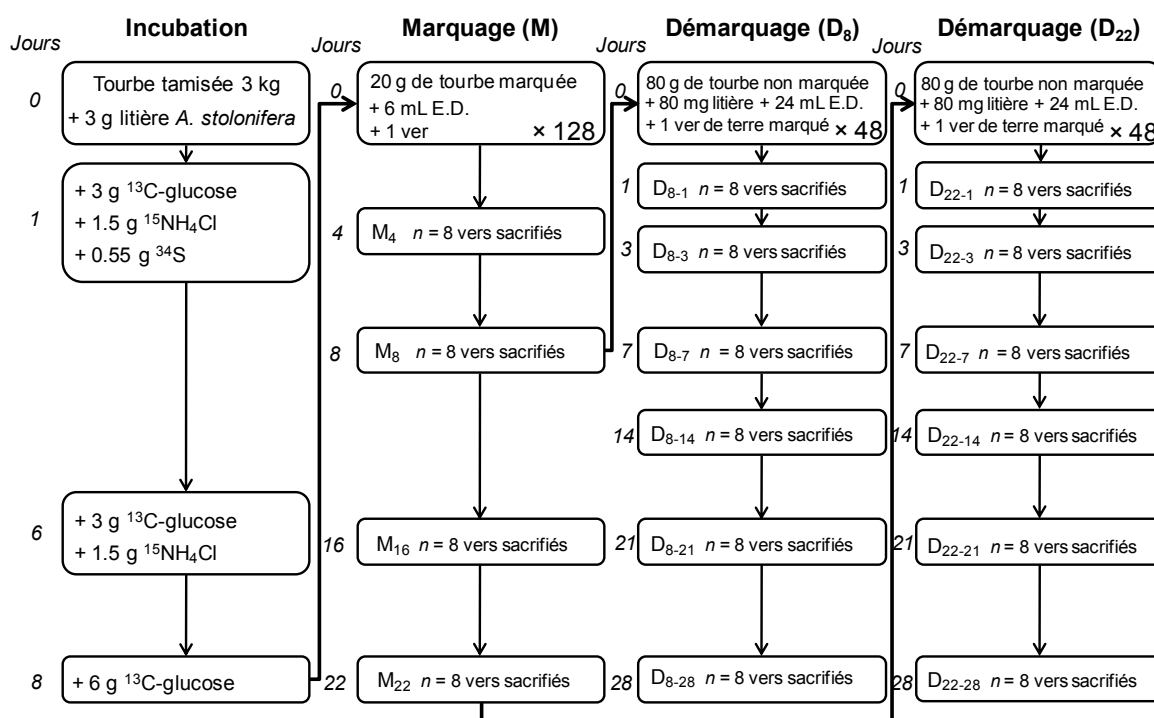


Figure 9. Diagramme schématique de la stratégie de marquage et démarquage des vers de terre

2.2.3. Marquage plantes

L'espèce utilisée pour le marquage est *Eriophorum angustifolium* (Honck, 1782), ou linaigrette à feuilles étroites. Il s'agit d'une plante qui colonise rapidement les surfaces de tourbe ré-humectée (Figure 10A). Après le prélèvement *in situ* à Bauppte, les échantillons de plantes débarrassées de la tourbe ont été cultivées pendant 3 semaines dans un bac de perlite avec une solution nutritive enrichie en ^{15}N et en ^{34}S ($[^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3] = 1.5 \text{ mM}$ à 10 % de ^{15}N ; $[^{34}\text{SO}_4^{2-}] = 0.5 \text{ mM}$ à 1 % de ^{34}S) (Figure 10B). Au début de la 3^{ème} semaine, les plantes ont été transférées dans une chambre de marquage climatisée (cycle jour/nuit : 16/8 heures ; radiation de 300 μE ; 17 °C la nuit à 21 °C le jour ; humidité de 90 % la nuit à 65 % le jour) où l'atmosphère a été enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ ($[\text{CO}_2] = 430 \pm 60 \mu\text{L.L}^{-1}$ à 5.30 ± 0.70 % de ^{13}C). Après marquage, 2 plantes ont été repiquées en vis-à-vis dans les mésocosmes de tourbe reconstituée (Figure 6A). Un lot de plantes non marquées a été cultivé dans des conditions équivalentes d'éclairage et de nutrition.



Figure 10. A *E. angustifolium* à Bauppte. **B** *E. angustifolium* après marquage ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S

3. Analyses et couplage d'outils

3.1. Mesure de la respiration C-CO₂ et ¹³C-CO₂

Les mesures de respiration C-CO₂ et ¹³C-CO₂ permettent d'évaluer l'activité globale d'un système et de déterminer la signature isotopique du C respiré. Elles ont été réalisées par la méthode d'incubation en chambres statiques : chaque système est fermé pendant 1 h à l'aide d'une cloche en PVC ou d'un couvercle en polycarbonate (microcosmes) munis d'un septum pour y effectuer des prélèvements de gaz à l'aide d'une seringue (Figure 11). Les mesures de respirations ont été effectuées dans le « noir » pour les systèmes avec plantes, c'est-à-dire sans activités photosynthétiques. Les volumes des cloches ont été adaptés à chaque système, à savoir 2.0 dm³ pour les mésocosmes de tourbe reconstituée, 1.4 dm³ pour les mésocosmes de Frasne et 0.08 dm³ pour les microcosmes. Les quantités de C-CO₂ respiré ont été quantifiées par chromatographie en phase gazeuse (MicroGC 3000 équipé d'une colonne Poraplot-U de 6m, SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). Les δ¹³C et Atom % du ¹³C-CO₂ respiré ont été mesurés par GC-IRMS. Les mesures de ¹³C-CO₂ pour les mésocosmes de Frasne ont été réalisées par le laboratoire Iso-Analytical Limited en Angleterre à l'aide d'un Hydra 20-20 IRMS (Europa Scientific). Les mesures de ¹³C-CO₂ pour les mésocosmes et microcosmes de Baupte ont été réalisées par le laboratoire IBFA de l'Université de Caen à l'aide d'un analyseur Microgas (GV Instruments) muni d'un passeur Gilson.

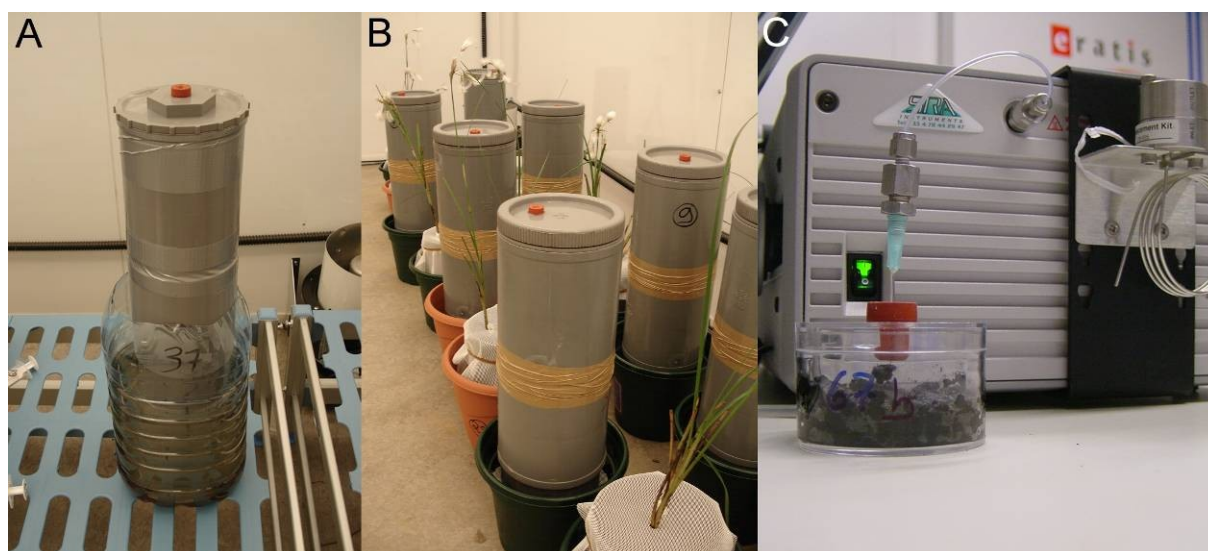


Figure 11. **A** Cloche d'incubation pour les mésocosmes de Frasne. **B** Cloches d'incubation pour les mésocosmes de tourbe reconstituée de Baupte. **C** Mesure par GC de la respiration des vers de terre en microcosmes

3.2. Mesure des biomasses microbiennes C-N-S

L'estimation de la biomasse microbienne C, N et S a été réalisée par la méthode de fumigation-extraction selon un protocole modifié pour la tourbe (Williams et Sparling 1984 ; Williams et Silcock 1997). Le principe est d'exposer les microorganismes de la tourbe à une atmosphère uniquement composée de chloroforme gazeux ce qui provoque leur mort par lyse cellulaire. Il y a alors libération dans le milieu de molécules organiques carbonées, azotées et soufrées dont la concentration est proportionnelle à la biomasse microbienne de départ. Le dosage des teneurs en C, N et S organique soluble des échantillons fumigés et non fumigés permet d'estimer par différence la biomasse microbienne, à un coefficient k près. Les biomasses C, N et S sont corrigées respectivement selon un facteur k_C de 0.45 (Sparling *et al.* 1990), un facteur k_N de 0.54 (Brookes *et al.* 1985) et un facteur k_S de 0.35 (Wu *et al.* 1994) utilisés pour les sols tourbeux (Williams et Sparling 1984 ; Williams et Silcock 1997). Une attention particulière a été portée à l'élimination des racines contenues dans la tourbe afin de ne pas fausser les mesures de biomasses microbiennes.

Vingt grammes de tourbe ont été pesés dans une coupelle en aluminium puis placés dans une enceinte hermétique dans laquelle du chloroforme a été vaporisé pendant 18 h. Les éléments solubles ont ensuite été extraits par agitation pendant 1 h dans une solution de K_2SO_4 à 0.5 M pour les mesures de biomasses C et N, et dans une solution de $CaCl_2$ à 0.01 M pour les mesures de biomasses S. Les concentrations en C total soluble sont mesurées par un analyseur de C dissous (1010 OI Analytical, Bioritech), les concentrations en N total soluble par flux continu (Autoanalyseur AA3, Bran + Luebb), et les concentrations en S total soluble par ICP-AES (Jobin-Yvon 238, Horiba) par le laboratoire d'analyses des sols d'Arras en France.

Une partie des extraits K_2SO_4 et $CaCl_2$ a été lyophilisée afin de procéder à l'estimation des $\delta^{13}C$, ^{15}N et ^{34}S de la biomasse microbienne par EA-IRMS.

3.3. Analyses isotopiques par EA-IRMS

Les analyses isotopiques ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S ont été réalisées sur chaque compartiment animal (ver de terre à Baupte et enchytréides à Frasne), végétale et tourbe. Il s'agit de techniques destructives où chaque compartiment est récupéré dans une coupelle en aluminium puis pesé au fur et à mesure selon un protocole précis.

Les mésocosmes de tourbe de Frasne ont été extraits de leur tube de PVC puis coupés en différents tronçons de 5 cm d'épaisseur afin de pouvoir récupérer les différents compartiments (Figure 12A). Les sphaignes vivantes (*S. fallax* et *S. magellanicum*) et les végétaux vasculaires (*E. vaginatum* et *A. polifolia*) ont tout d'abord été récupérés dans la couche supérieure. La tourbe, correspondant aux végétaux morts et en décomposition, a ensuite été prélevée à deux profondeurs différentes : au niveau de l'interface avec le niveau de nappe (7.5-12.5 cm) et dans la couche sous-jacente (12.5-17.5 cm). Le protocole d'échantillonnage des enchytréides avait été préalablement mis au point sur des mésocosmes de tourbe de volumes similaires. Ainsi, il a été choisi de prélever individuellement les enchytréides à l'aide d'un pinceau humide sur le plan de travail où étaient posés les mésocosmes de tourbe et où les vibrations et la lumière agissaient comme 'répulsifs' (Figure 12B). Des échantillonnages supplémentaires à l'aide de la méthode du « berlèse ennoyé » (Bachelier 1973) ont permis de vérifier que la majorité des individus était récupérée par cette méthode.



Figure 12. **A** Prélèvements des différents compartiments dans un mésocosme 'déboyaaté'. **B** Enchytréides. **C** Différents compartiments pour analyses en EA-IRMS

Pour les mésocosmes de tourbe reconstituée de Baupte, les parties aériennes des plantes (Figure 13A) et les turricules (Figure 13B) ont été récupérés dans un premier temps. Puis le mésocosme a été extrait du tube en PVC afin de récupérer les compartiments intra-tourbe : c'est-à-dire les galeries de vers de terre en grattant soigneusement les parois sur une épaisseur inférieure à 2 mm (Figure 13E) ; la rhizosphère en récupérant la tourbe accrochée aux racines (Figure 13D) ; les racines et les vers de terre (Figure 13C). Ensuite le « bulk », qui correspond à la tourbe non influencée par les sphères fonctionnelles des deux organismes, rhizosphère pour les plantes et drilosphère pour les vers de terre, a été récupéré à plusieurs endroits en prenant bien soin de ne pas utiliser la tourbe à la base de la colonne. Les vers de terre ont ensuite été mis à déféquer pendant 12 h dans des boîtes de Petri avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée, puis congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant analyses.



Figure 13. A Découpe des parties aériennes d'*E. angustifolium*. B Turricule de *L. rubellus*. C *L. rubellus* dans sa galerie. D Racines d'*E. angustifolium* avec sa tourbe environnante (rhizodépôts). E Mucus tapissant la paroi de galerie de *L. rubellus*. F Différents compartiments pour analyses en EA-IRMS

Pour les microcosmes de tourbe, les vers de terre ont été rincés à l'eau distillée puis transférés pendant 6 minutes dans des boîtes de Petri avec $2 \times 50 \mu\text{L}$ de HCl à 0.05 M pour en récolter le mucus (Dyckmans *et al.* 2005). La quantité moyenne de mucus prélevée était de $70 \pm 3 \text{ mg.individu}^{-1}$ (moyennes \pm S.E. en matière fraîche, $n = 152$). Les vers de terre ont ensuite été de nouveau rincés à l'eau distillée, puis congelés pour les euthanasier avant de leur enlever le tube digestif. La tourbe de la drilosphère a été prélevée en grattant soigneusement les parois de galeries sur une épaisseur inférieure à 2 mm.

Les échantillons ont ensuite été séchés pendant 48 h dans une étuve à 50-60 °C. Puis ils ont été réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à billes avant transferts dans des capsules en étain. Les analyses élémentaires et isotopiques C, N et S des différents échantillons ont été effectuées par le laboratoire Iso-Analytical Limited (UK), par EA-IRMS : analyseur élémentaire (Europa Scientific Roboprep elemental analyser, Crewe, Angleterre) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (Europa Scientific 20-20 IRMS, Crewe, Angleterre).

Des analyses isotopiques C, N et S ont également été effectuées sur des échantillons d'eau des bacs et des pots des mésocosmes de Frasne et de Baupte. Le carbone inorganique dissous (DIC) a été analysé par GC-IRMS après avoir filtré l'eau à $0.2 \mu\text{m}$ et transformé le DIC en CO_2 par un ajout d'acide phosphorique. Le N dissous a été analysé par EA-IRMS après avoir séché le filtrat ($0.2 \mu\text{m}$) jusqu'à obtention d'un résidu sec. Les sulfates ont été analysés par EA-IRMS après séchage du précipité de sulfate de baryum obtenu par ajout de chlorure de baryum dans l'eau filtré à $0.2 \mu\text{m}$.

Les compositions isotopiques sont déterminées à l'aide de standards de rapports isotopiques ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S connus selon l'équation (Smith et Epstein 1971 ; Mariotti 1991) :

$$\delta (\text{‰}) = ((R_{\text{échantillon}} / R_{\text{standard}}) - 1) \times 1000 \quad [1]$$

où R représente le ratio isotope lourd / isotope léger. Les standards de référence utilisés sont le Pee Dee Belemnite (PDB) pour le ^{13}C ($R_{\text{PDB}} = 0.0112$), le N_2 atmosphérique pour le ^{15}N ($R_{\text{N}_2} = 0.0037$) et la Troïlite de la météorite du Canyon Diablo pour le ^{34}S ($R_{\text{CDT}} = 0.0450$). Cette notation a l'avantage de définir une relation explicite entre l'abondance d'un isotope donné dans un échantillon et son abondance dans la référence : si $\delta > 0$, il y a plus d'isotopes lourds dans l'échantillon que dans la référence ; si $\delta < 0$, il y a moins d'isotopes lourds dans l'échantillon que dans la référence. La précision instrumentale de mesure donnée par le laboratoire est de $\pm 0.2 \text{ ‰}$ quelque soit l'élément considéré.

L'enrichissement isotopique est exprimé en Atom % excess (APE) qui est calculé selon l'équation :

$$\text{APE (\%)} = \text{Atom \%}_{\text{échantillon}} - \text{Atom \%}_{\text{abondance naturelle}} [2]$$

où l'Atom % représente l'abondance isotopique calculée selon l'équation (Mariotti 1991) :

$$\text{Atom \%} = \left(\frac{\text{isotope lourd}}{\text{isotope lourd} + \text{isotope léger}} \right) \times 100 [3]$$

3.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes : SIP ¹³C-PLFAs

La caractérisation de la structure des communautés microbiennes de la tourbe a été réalisée par des profils d'acides gras phospholipidiques (PLFAs). Les PLFAs sont les principaux constituants des membranes cellulaires et représentent des biomarqueurs intéressants de par leur grande diversité structurale liée à leur spécificité biologique. Les PLFAs ont été extraits de la tourbe lyophilisée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) modifiée (Andersen *et al.* 2010). Brièvement, les échantillons de tourbe lyophilisée (250 mg) sont secoués pendant 1 h dans une solution tampon phosphate (0.1 M ; pH 7):CHCl₃:MeOH (0.9:1:2 v/v/v). Ensuite des volumes similaires de tampon phosphate et CHCl₃ sont ajoutés et les phases sont séparées pendant 24 h à l'abri de la lumière. Les lipides de la phase CHCl₃ sont ensuite séparés en lipides simples, glyco- et phospholipides dans une colonne d'acide silicique par élution successive avec du CHCl₃, de l'acétone et du MeOH (Figure 14A). Les phospholipides sont ensuite transestérifiés en esters de méthyle d'acides gras (FAMES) après incubation pendant 20 minutes à 40°C dans un mélange MeOH:toluène:KOH (4:1:1 v/v/v). Le protocole d'extraction complet est détaillé en Annexe II.

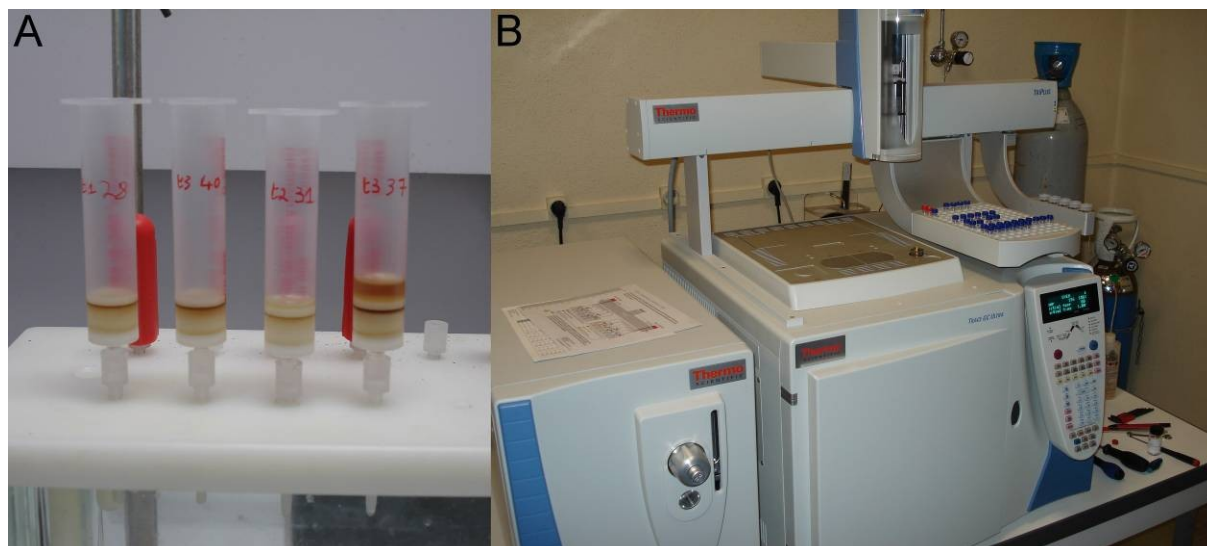


Figure 14. **A** Séparation des différents acides gras au moyen des colonnes d'acide silicique. **B** Quantification des PLFAs par GC-MS

Les FAMES ont ensuite été quantifiés par GC-MS avec un chromatographe en phase gazeuse (Trace GC, Thermo Finnigan ; colonne Supelco Equity 5 fused silica : 30 m, 0.25 mm de diamètre int., 0.25 μm d'épaisseur de couche) muni d'un passeur d'échantillon Triplus et couplé à un spectromètre de masse (Quadripole DSQ II, Thermo Finnigan) (Figure 14B). Le methyl nonadecanoate ($\text{C}_{19}\text{O}_2\text{Me}$) a été utilisé comme standard interne quantitatif. La localisation précise des doubles liaisons a été réalisée par une dérivatisation des FAMES en esters picolinyl sur des échantillons représentatifs (Wretensjö *et al.* 1990). Les concentrations en PLFAs sont exprimées en μg de $\text{C}\cdot\text{g}^{-1}$ de tourbe sèche.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de chaque FAMES ont été déterminées par GC-C-IRMS avec un chromatographe en phase gazeuse (HP5860, Hewlett Packard; colonne BPX 5 : 60 m, 0.32 mm de diamètre int., 0.25 μm d'épaisseur de couche) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (Micromass Optima, Fisons/VG/Micromass) via une interface de combustion Isochron III. Du dioxyde de carbone de qualité ultra pure et de $\delta^{13}\text{C}$ connu a été injecté trois fois au début et à la fin de chaque analyse. Toutes les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont rapportées à la norme relative PDB en ‰.

Les PLFAs i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 et a17:0 sont utilisés comme marqueurs des bactéries à Gram positif (G+) (Frostegård et Bååth 1996), les 16:1 ω 7c et cy17:0 comme marqueur des bactéries à Gram négatif (G-) (Wilkinson 1988 ; Zelles 1999), le 18:2 ω 6,9 comme marqueur des champignons (Frostegård et Bååth 1996 ; Zelles 1999), le 18:1 ω 8c comme marqueur des méthanotrophes (Ringelberg *et al.* 1989) et le 20:4 ω 6,9,12,15 comme

marqueur des protozoaires (Ringelberg *et al.* 1997) (Figure 15). Les autres PLFAs détectés dans la tourbe n'ont pas été utilisés car jugés non spécifiques à un groupe fonctionnel microbien particulier. Nous avons également calculé les rapports champignons:bactéries ($18:2\omega6,9 : i15:0 + a15:0 + i16:0 + i17:0 + a17:0 + 16:1\omega7c + cy17:0$; Bardgett *et al.* 1996), bactéries G+:bactéries G- ($i15:0 + a15:0 + i16:0 + i17:0 + a17:0 : 16:1\omega7c + cy17:0$) et bactéries anaérobies:bactéries aérobies ($cy17:0 : 16:1\omega7c$; Kieft *et al.* 1997). Ces rapports indiquent des traits importants de la structure des communautés microbiennes du sol comme par exemple la réponse à un stress hydrique (Bossio et Scow 1998).

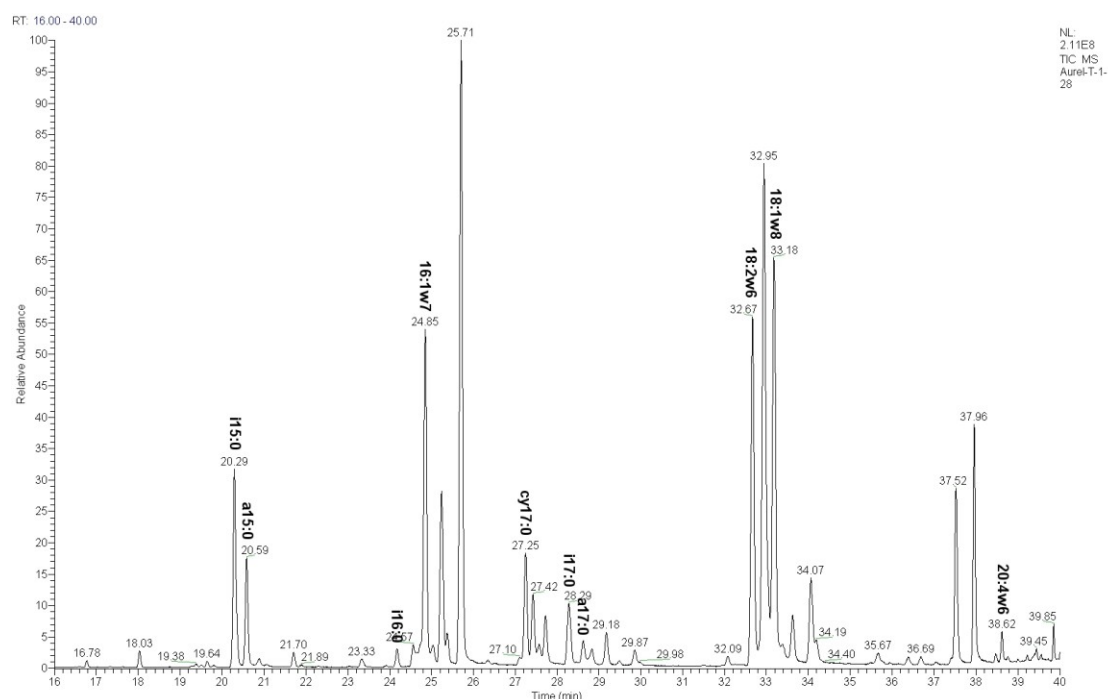


Figure 15. Chromatogramme des différents PLFAs analysés par GC-MS et GC-C-IRMS

3.5. NanoSIMS

Les sondes ioniques NanoSIMS permettent d'établir une cartographie isotopique de surface d'échantillons préalablement indurés dans une résine. Ce sont des instruments d'introduction récente dont il n'existe actuellement qu'une vingtaine d'exemplaires dans le monde. Ces sondes associent i) une colonne produisant un faisceau d'ions primaires qui, une fois accéléré et focalisé, est dirigé vers la surface d'un échantillon qu'il bombarde et ii) un spectromètre de masse séparant et analysant les ions contenus dans le faisceau secondaire produit par l'interaction du faisceau primaire avec la surface de l'échantillon. La NanoSIMS permet d'imager simultanément de 5 à 7 éléments du tableau périodique tout en maintenant une

excellente transmission du signal (de l'ordre du ppm) et une haute résolution spatiale (150 à 200 nm) (Herrmann *et al.* 2007a).

Des blocs de tourbe ($9 \times 6 \times 5$ cm) ont été prélevés dans les 10 cm supérieurs des mésocosmes de tourbe reconstituée de Baupte et immédiatement fixés avec du glutaraldéhyde à 2 % dans un tampon PBS 0.1×. Ils ont été progressivement déshydratés avec un échange complet eau-acétone avant d'être imprégnés dans une résine polyester (Crystic SR 17449) (Figures 16A et 16C). Les échantillons ont ensuite été sciés en petites « galettes » de 2 mm d'épaisseur et 8 mm de diamètre, polis avec du papier diamant, ré-imprégnés dans des bagues de 10 mm de diamètre et couverts d'une couche de 20 nm d'or (Herrmann *et al.* 2007b). Avant de procéder aux analyses NanoSIMS, les zones d'intérêts (galeries et tissus de vers de terre) ont été présélectionnées par microscopie électronique à balayage (JEOL JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japon) au CMEBA de Rennes (Figures 16B et 16D).

Les analyses ont été réalisées à la plateforme NanoSIMS de Rennes à l'aide d'un NanoSIMS-50 (CAMECA, Gennevilliers, France) équipé d'une source césium (Cs^+). Les éléments qui ont été imagés sont l'N en suivant le cluster CN^- composé des ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, le S en suivant les ions $^{32}\text{S}^-$ et $^{34}\text{S}^-$, et l'oxygène (O) en suivant l'ion $^{16}\text{O}^-$. La sonde Cs^+ de 120 nm de diamètre a permis de scanner point-par-point des surfaces de $15 \times 15 \mu\text{m}$, $30 \times 30 \mu\text{m}$ et $40 \times 40 \mu\text{m}$ avec une définition de 128×128 pixels (temps de comptage = 50-80 ms par pixel). La haute résolution en masse (5000 MRP) a été utilisée pour résoudre les interférences entre les masses 26 ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$) et 27 ($^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$).

Les analyses NanoSIMS ^{13}C des échantillons n'ont pas pu être réalisées compte tenu des caractéristiques de la résine. En effet, cette dernière est majoritairement composée de C et les ratios $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mesurés ne sont pas représentatifs des ratios réels des enrichissements dans les échantillons (Herrmann *et al.* 2007a).

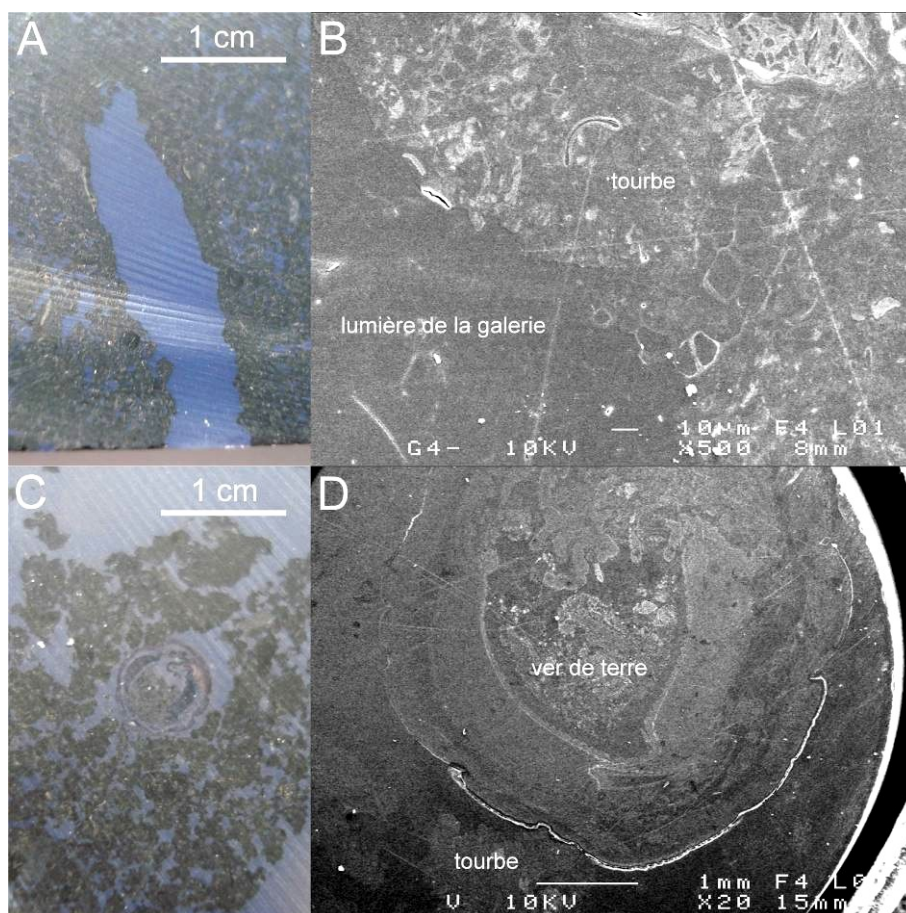


Figure 16. **A** Galerie de ver de terre indurée. **B** Galerie de ver de terre au MEB. **C** Section de ver de terre indurée. **D** Section de ver de terre au MEB

4. Traitements des données et analyses statistiques

4.1. Modèles « marquage-démarquage »

Afin de pouvoir caractériser et comparer les dynamiques d'enrichissement et de pertes en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des tissus et du mucus de ver de terre, différents modèles ont été utilisés. Les points-échantillons ont été ajustés à des fonctions exponentielles :

$$y = a(1 - e^{-bx}) + c \quad (\text{Eq. [4] pour le marquage})$$

$$y = a e^{-bx} + c \quad (\text{Eq. [5] pour le démarquage})$$

où a , b et c sont des constantes ajustées. Les ajustements ont été réalisés à l'aide du logiciel *R* version 2.12.0 (*R Development Core Team*) disponible sur <http://www.r-project.org/>.

A partir de ces modèles, différents paramètres ont été calculés :

- Les vitesses d'enrichissement et de perte exprimées en $\text{Atom \%} \cdot \text{j}^{-1}$, à partir de la dérivée de la fonction ($y = a e^{-bx} \times b$) pendant les phases les plus rapides,
- La valeur d'enrichissement maximal correspondant au début de la phase de *plateau* de l'équation [4] et la valeur de perte maximale correspondant à la *baseline* de l'équation [5],
- La *demi-vie* ($t_{1/2}$), durée au cours de laquelle les enrichissements sont divisés par deux, celle-ci a été utilisée comme proxy du temps de renouvellement des éléments dans les deux compartiments du ver de terre.

Le pouvoir explicatif des modèles a été estimé au moyen du coefficient de détermination des modèles non-linéaires. Pour cela, le R^2 ajusté a été calculé selon l'équation :

$$R^2 \text{ ajusté} = 1 - \text{RSS} / \text{AdjSS [6]}$$

où RSS est la somme des carrés des résidus et AdjRSS est la somme des carrés des écarts des réponses observées à partir de leur moyenne (Raoul *et al.* 2010).

4.2. Calculs de recouvrements et estimation de flux

La méthodologie de traçage ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S permet d'étudier finement le cycle des éléments dans les écosystèmes naturels, notamment en ce qui concerne l'origine des éléments dans les

flux et les stocks. Supposant qu'il n'y a pas de différence dans les processus de transferts des différentes formes d'isotopes composant un élément (Powlson et Barraclough 1993), les flux estimés des isotopes ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S sont représentatifs des flux globaux des éléments C, N et S. Nous avons estimé les stocks d'éléments marqués et les recouvrements des apports marqués dans les différents compartiments analysés ainsi que les pertes de C par respiration. Nous avons également estimé qu'il n'y avait pas de pertes sous formes gazeuses issues de la dénitrification (N_2O et N_2), de la volatilisation de l'ammoniac (peu probable en raison du pH acide) ou de la réduction dissimilatrice des sulfates (H_2S). Le recouvrement dans chacun des compartiments est exprimé relativement à la quantité de traceur apporté dans chaque système selon l'équation (Powlson et Barraclough 1993, Francez et Loiseau 1999), appliquée à chacun des éléments :

$$\text{Recouvrement \%} = (\text{APE}_{\text{compartiment}} / \text{APE}_{\text{apport}}) \times (\text{stock}_{\text{compartiment}} / \text{stock}_{\text{apport}}) \times 100 \quad [7]$$

Pour l'expérimentation en microcosmes, les quantités de ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S fournies à la tourbe proviennent des vers de terre marqués introduits dans les systèmes dont l'Atom % global (tissus + mucus) est calculé selon l'équation, pour chacun des éléments :

$$\text{Atom \% ver de terre} = [(\text{Atom \%}_{\text{tissus}} \times \text{stock}_{\text{tissus}}) + (\text{Atom \%}_{\text{mucus}} \times \text{stock}_{\text{mucus}})] / (\text{stock}_{\text{tissus}} + \text{stock}_{\text{mucus}}) \quad [8]$$

De la même manière pour l'expérimentation avec les mésocosmes de tourbe reconstituée de Baupte, les quantités de ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S transférées proviennent des vers de terre marqués et des plantes marquées introduites dans les systèmes. L'Atom % global de ces dernières (parties aériennes + racines) est calculé selon l'équation, pour chacun des éléments :

$$\text{Atom \% plantes} = [(\text{Atom \%}_{\text{aérien}} \times \text{stock}_{\text{aérien}}) + (\text{Atom \%}_{\text{racines}} \times \text{stock}_{\text{racines}})] / (\text{stock}_{\text{aérien}} + \text{stock}_{\text{racines}}) \quad [9]$$

Les flux nets, qui correspondent à des transferts ou des incorporations en éléments au niveau d'un compartiment entre 2 dates rapprochées, sont ensuite calculés selon l'équation :

$$\text{Flux.jour}^{-1} = [(\text{Recouvrement} \times \text{stock}_{\text{apport}}) / 100] / n \text{ jours} \quad [10]$$

Les turnovers C, N et S journaliers des vers de terre (tissus + mucus) et des plantes (parties aériennes + racines) sont calculés sur la base des transferts biogéniques C, N et S et de respiration pour le C (Whalen *et al.* 2000) selon l'équation :

$$\text{Turnover journalier} = (\text{transferts biogéniques journalier} / \text{stock}_{\text{compartiment}}) \times 100 \quad [11]$$

4.3. Analyses des flux de C des communautés microbiennes actives

L'approche SIP ^{13}C -PLFAs permet de mesurer les quantités de ^{13}C incorporé dans les PLFAs de la communauté microbienne active de la tourbe, et par conséquent d'estimer des flux de C. Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de chaque PLFA ont été corrigées pour l'addition de l'atome de C supplémentaire introduit lors de la transestérification avec le méthanol ($\delta^{13}\text{C} = -45.85 \text{ ‰}$) selon l'équation (Butler *et al.* 2003) :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} = [(C_{\text{PLFA}} + 1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}] / C_{\text{PLFA}} \quad [12]$$

où C_{PLFA} correspond au nombre de carbone du PLFA.

La quantité de ^{13}C incorporé entre deux dates dans un PLFA (en ng de $^{13}\text{C} \cdot \text{g}^{-1}$ de tourbe sèche) est calculée selon l'équation de Moore-Kucera et Dick (2008) :

$$^{13}\text{C}_{\text{incorp}} = (F_{t_x} - F_{t_0}) \times [\text{PLFA}_i]_{t_x} \times 1000 \quad [13]$$

où $[\text{PLFA}_i]_{t_x}$ représente la concentration en μg de $\text{C} \cdot \text{g}^{-1}$ de tourbe sèche après incubation, et F la fraction de ^{13}C avant (t_0) et après incubation (t_x) selon l'équation :

$$F = ^{13}\text{C} / (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}) = R / (R + 1) \quad [14]$$

Le ratio isotopique du C (R) a été déterminé à partir des valeurs de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}}$ par rapport au standard PDB ($R_{\text{PDB}} = 0.0112$) selon l'équation :

$$R = [(\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} / 1000) + 1] \times R_{\text{PDB}} \quad [15]$$

4.4. Traitements d'images et calculs des abondances en ^{15}N et ^{34}S avec la NanoSIMS

Les abondances isotopiques en ^{15}N et ^{34}S ont été calculés à partir des images 2D acquises par NanoSIMS selon l'équation (Li *et al.* 2008) :

$$\text{Atom \% } ^{15}\text{N} = (^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-) / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-) \times 100 \text{ [16]}$$

$$\text{Atom \% } ^{34}\text{S} = (^{34}\text{S}^-) / (^{32}\text{S}^- + ^{34}\text{S}^-) \times 100 \text{ [17]}$$

Pour procéder à ces calculs, les images isotopiques ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.45h) et le module d'analyses NRIMS disponibles sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/> et http://www.nrims.hms.harvard.edu/NRIMS_ImageJ.php, respectivement. La procédure complète de calculs est détaillée en Annexe III.

4.5. Analyses statistiques

La normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk avec si nécessaire une transformation *racine* ($x + c$) ou *ln* ($x + c$) avant de procéder aux tests (constante c utilisée si il y a des valeurs négatives ou nulles). Selon le type de données, différents tests statistiques ont été utilisés :

- Non paramétrique : tests de corrélation de Spearman pour déterminer la force de liaison entre différentes variables (^{15}N Atom %, ^{34}S Atom % et la distribution en $^{16}\text{O}^-$),
- Paramétriques : tests t de Student pour comparer les échantillons deux à deux et des ANOVAs à l'aide la procédure GLM pour tester la réponse des variables à différents facteurs (« masse », « durée », « traitements », « compartiments », « habitat *fen-bog* » et « OTCs »).

Le risque d'erreur est fixé à 5 % quelque soit le test utilisé. L'ensemble des tests statistiques a été réalisé avec le logiciel *R* (version 2.12.0). Toutes les valeurs affichées sur les graphiques ou dans le texte correspondent à des moyennes \pm leur erreur standard S.E.

Références

- Aerts R, Cornelissen JHC, Dorrepaal E, Van Longtestijn RSP, Callaghan TV (2004) Effects of experimentally imposed climate scenarios on flowering phenology and flower production of subarctic bog species. *Glob Change Biol* 10:1599-2609
- Andersen R, Grasset L, Thormann MN, Rochefort L, Francez AJ (2010) Changes in microbial community structure and function following Sphagnum peatland restoration. *Soil Biol Biochem* 42:291-301
- Auterives C (2007) Influence des flux d'eau souterraine entre une zone humide superficielle et un aquifère profond sur le fonctionnement hydrochimique des tourbières : Exemple des marais du Cotentin, Basse-Normandie. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, pp 261
- Bachelier (1973) Extraction et comptage des enchytréides du sol. *Cahiers ORSTOM, série Pédologie* 11:79-84
- Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegård Å (1996) Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fertil Soils* 22:261-264
- Bossio DA, Scow KM (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35:265-278
- Bouché MB, Aliaga R (1986) Contre une dégradation physique et chimique des sols et pour leur optimisation économique, l'échantillonnage des lombriciens : une urgente nécessité. *La Défense des végétaux* 242:30-36
- Brookes PC, Landman A, Pruden G, Jenkinson DS (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol Biochem* 17:837-842
- Butler JL, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD (2003) Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Appl Environ Microb* 69:6793-6800
- Campy M, Richard H (1987) Dynamique et typologie des remplissages lacustres tardi- et postglaciaires de la chaîne jurassienne. *Documents du CERLAT, Mémoire 1* :165-180
- Clément B, Danais M (2001) Réhabilitation de la tourbière de Baupte – Rapport final de synthèse. Programme national de recherche « Recréer la nature », pp 68
- Clément B, Francez AJ (2001) Réhabilitation de la tourbière de Baupte – Zones Humides Infos, 34:4-5
- Curry JP, Schmidt O (2006) Long-term establishment of earthworm populations in grassland on reclaimed industrial cutaway peatland in Ireland. *Suo* 57:65-70
- Delarue F, Laggoun-Défarge F, Buttler A, Gogo S, Jasey VEJ, Disnar JR (2011) Effects of short-term ecosystem experimental warming on water-extractable organic matter in an ombrotrophic Sphagnum peatland (Le Forbonnet, France). *Org Geochem* 42:1016-1024
- Duraffourg M, Palacio P (1981) Etude géologique, géophysique, géotechnique, hydrologique du synclinal de Frasne-Bonnevaux (Doubs). Thèse de 3ème cycle, géologie appliquée, Besançon, pp 160
- Dyckmans J, Scrimgeour CM, Schmidt O (2005) A simple and rapid method for labelling earthworms with ¹⁵N and ¹³C. *Soil Biol Biochem* 37:989-993
- Francez AJ, Loiseau P (1999) Devenir de l'azote minéral dans une tourbière à *Sphagnum fallax* Klinggr. et *Carex rostrata* Stokes du Massif central (France). *Can J Bot* 77:1136-1143

- Frostegård Å, Bååth E (1996) The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* 22:59-65
- Gicquel A, Francez AJ, Delhaye T, Gruau G, Hallaire V, Binet F (2012) Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Biogeochemistry* doi:10.1007/s10533-012-9714-3
- Herrmann AM, Ritz K, Nunan N, Clode PL, Pett-Ridge J, Kilburn MR, Murphy DV, O'Donnell AG, Stockdale EA (2007a) Nano-scale secondary ion mass spectrometry – A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biol Biochem* 39:1835-1850
- Herrmann AM, Clode PL, Fletcher IR, Nunan N, Clode PL, Stockdale EA, O'Donnell AG, Murphy DV (2007b) A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 21:29-34
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Buttler A, Toussaint ML, Binet P (2011) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. *Glob Change Biol* 17:2945-2957
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Toussaint ML, Binet P (2012) Phenoloxidase and peroxidase activities in *Sphagnum*-dominated peatland in a warming climate. *Soil Biol Biochem* 46:49-52
- Kieft TL, Wilch E, O'Connor K, Ringelberg DB, White DC (1997) Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl Environ Microb* 63:1531-1542
- Li T, Wu TD, Mazéas L, Toffin L, Guerquin-Kern JL, Leblon G, Bouchez T (2008) Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ Microbiol* 10:580-588
- Lucassou F (2011) Avis sur l'exploitation de la tourbière de Baupte – vallée de la Sèves (Manche). BRGM/RP-60160, pp 19
- Magnon G, Terraz L (2002) Documents d'objectifs Natura 2000, Bassin du Dugeon. Syndicat mixte de la vallée du Dugeon et du plateau de Frasné, pp 187
- Makulec G (1993) Abundance and biomass of earthworms (Lumbricidae) in hydrogenous soils under various degree of mucking. *Z Probl Postępow Nauk Rol* 406:119-127
- Manneville O, Vergne V, Villepoux O, le Groupe d'Etudes des Tourbières (1999) Le monde des tourbières et des marais, France, Suisse, Belgique, Luxembourg. Coll. Bibliothèque du naturaliste, Delachaux et Niestlé Lausanne-Paris, pp 320
- Marion GM (1996) Temperature enhancement experiments. In: Molau U, Mølgaard P (eds) *The ITEX Manual*. Danish Polar Center, Copenhagen, pp 17-22
- Mariotti A (1991) Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur de la dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *Cahiers ORSTOM, série Pédologie* 26:299-313
- Mégnién C (1999) Baupte : une tourbière française en exploitation. Extrait du numéro spécial : La tourbe. *Géochronique*. Société géologique de France et le BRGM (eds), Paris. n° 71, pp 40
- Moore-Kucera J, Dick RP (2008) Application of ¹³C-labeled litter and root materials for in situ decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biol Biochem* 40:2485-2493
- Powelson DS, Barraclough D (1993) Mineralization and assimilation in soil-plant systems, in: Knowles R, Blackburn TH (Eds.), *Nitrogen isotope techniques*. Academic Press Inc., San Diego, Calif. pp. 209–242

- Raoul F, Deplazes P, Rieffel D, Lambert JC, Giraudoux P (2010) Predator dietary response to prey density variation and consequences for cestode transmission. *Oecologia* 164:129-139
- Ringelberg DB, Davis JD, Smith GA, Pfiffner SM, Nichols PD, Nickels JS, Henson JM, Wilson JT, Yates M, Kampbell DH, Read HW, Stocksdales TT, White DC (1989) Validation of signature polarlipid fatty acid biomarkers for alkane-utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials. *FEMS Microbiol Lett* 62:39-50
- Ringelberg DB, Stair JO, Almeida J, Norby RJ, O'Neil EG, White DC (1997) Consequences of rising atmospheric carbon dioxide levels for the belowground microbiota associated with white oak. *J Env Qual* 26:495-503
- Smith BN, Epstein S (1971) Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiol* 47:380-384
- Sparling GP, Feltham CW, Reynolds J, West AW, Singleton P (1990) Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the kecfactor. *Soil Biol Biochem* 22:301-307
- Whalen JK, Parmelee RW, Subler S (2000) Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ^{15}N . *Biol Fert Soils* 32:347-352
- Wilkinson SC (1988) Gram-negative bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SC (eds) *Microbial lipids*, vol 1. Academic, London, pp 299-488
- Williams BL, Sparling GP (1984) Extractable nitrogen and phosphorus in relation to microbial biomass in acid organic soils. *Plant Soil* 76:139-148
- Williams BL, Silcock DJ (1997) Nutrient and microbial changes in the peat profile beneath *Sphagnum magellanicum* in response to additions of ammonium nitrate. *J Appl Ecol* 34:961-970
- Wretensjö I, Svensson L, Christie WW (1990) Gas chromatographic-mass spectrometric identification of the fatty acids in borage oil using the picolinyl ester derivatives. *J Chromatogr* 521:89-97
- Wu J, O'Donnell AG, He ZL, Syers JK (1994) Fumigation-extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biol Biochem* 26:117-125
- Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fert Soils* 29:111-129
- Zhao FJ, Verkampen KCJ, Birdsey M, Blake-Kalff MMA, McGrath SP, B (2001) Use of the enriched stable isotope ^{34}S to study sulphur uptake and distribution in wheat. *J Plant Nutr* 24:1551-1560

CHAPITRE III

Turnovers C, N et S et devenir des transferts biogéniques de *L. rubellus* : approche écophysiological et traits fonctionnels

1. Synopsis

Les plantes comme les linaigrettes (*Eriophorum spp*) colonisent rapidement les surfaces de tourbe ré-humectée et contribuent à la régénération de la fonction d'accumulation de tourbe. Des vers de terre comme *Lumbricus rubellus* H. colonisent également la tourbière anciennement exploitée mais leur impact sur la fonction de « puits » ou de « source » n'est pas quantitativement démontré.

Le premier article (article 1) intitulé « Ecological significance of physiological traits of earthworm (*Lumbricus rubellus* H.) in S-C-N nutrients availability and peatland functioning », se propose de montrer comment les traits physiologiques exprimés à l'échelle de l'individu se traduisent dans l'efficacité du recyclage des nutriments C, N et S, à l'échelle de l'écosystème. Pour cela, nous avons procédé à un triple traçage isotopique ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S par la méthode de pulse-chase labelling d'organismes collectés *in situ* de deux classes de taille, pendant 8 et 22 jours, afin de mettre en évidence le contrôle potentiel exercé par les variables « masse » et « durée » sur l'incorporation des éléments et leur remise à disposition. Cette étude a permis de démontrer que le S de *L. rubellus* présente des turnovers beaucoup plus rapides comparé au C et au N. Ce travail a également permis de caractériser les traits écophysologiques de *L. rubellus* relatif à l'efficacité du recyclage des éléments C, N et S dans le système ver de terre-tourbe et l'identification de deux réservoirs, le mucus à turnover rapide et les tissus à turnover lent, avec des différences en fonction de la classe de taille (masse). Ce ver de terre épi-anécique, soumis à la stochasticité environnementale caractéristique de la couche supérieure de la tourbe, possède des capacités de régulation plus élevées et plus rapides qu'une espèce anécique ou endogée. Notre étude conforte l'hypothèse selon laquelle les vers de terre sont en mesure de favoriser un retour plus rapide à la fonction de « puits » des tourbières anciennement exploitées en accélérant la remise à disposition de nutriments C, N et S pour les producteurs primaires de ces écosystèmes généralement pauvres en nutriments.

La deuxième partie de ce chapitre rédigée sous forme d'article (article 2) et intitulée « Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry », a pour objectif de caractériser le devenir des transferts d'N et de S de *L. rubellus* au niveau de l'interface biophysique non destructurée, la paroi de galerie. Pour cela, nous avons utilisé deux types d'outils complémentaires : les traceurs isotopiques ^{15}N - ^{34}S et la sonde ionique NanoSIMS.

Cette dernière a permis d'établir une cartographie isotopique de surface des enrichissements en N et S de la tourbe générés ver de terre avec une résolution de l'ordre de la centaine de nm. Les enrichissements montrent que les transferts biogéniques du ver de terre ne se font pas au-delà d'1 mm de la paroi de galerie. Ils décroissent pour le N et apparaissent plus hétérogènes pour le S. Un des résultats majeurs de cette étude est l'« anticorrélation » spatiale observée entre les spots enrichis en ^{15}N et ^{34}S . Cela semble démontrer que les communautés bactériennes et les activités biogéochimiques au sein de l'écosystème sont spatialement influencées par ces ingénieurs d'écosystèmes.

2. Ecological significance of physiological traits of earthworm (*Lumbricus rubellus* H.) in S-C-N nutrients availability and peatland functioning (article 1)

Aurélien Gicquel, André-Jean Francez, Nathalie Le Bris-Josselin, Marie-Paule Briand
and Françoise Binet

UMR 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex,
France

Soumis à **Functional Ecology** (mai 2012).

Summary

1. The carbon (C) “sink” function of peatlands can be doubly perturbed by intensive harvesting and the development of sulphur (S) deficiencies due to the reduction of atmospheric S deposits of industrial origin in Europe. Although restoration of the “sink” function in abandoned peatlands can be initiated by rapid recolonization by plants, the role of ecosystem engineers such as earthworms in the biogeochemical functioning and regeneration of the peatland are not known.
2. The aim of this work was to quantify the ecological impact of expression of the ecophysiological traits of *Lumbricus rubellus* (H.) on nutrient cycling efficiency in the peatland ecosystem. Individual earthworms were triply labelled with ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N , and reared in peat microcosms to study the coupling and renewal of S, C and N stocks in mucus and tissues of earthworms and to calculate the transfers to peat.
3. S is the most reactive element with a half-life in the mucus and tissues of less than 1 day. The half-lives of C in the mucus and tissues vary from 3 to 4 days and 5 to 30 days respectively. The half-life of N is 1 day in the mucus and ranges from 5 to 7 days in the tissues.
4. The mucus is the substrate most rich in nutrients, particularly S, as shown by the stoichiometric S:C:N ratio of 1:67:12, and the stocks of C and N are replenished 6 times more rapidly in the mucus than in the tissues.
5. The daily turnovers of S, C and N in *L. rubellus* (tissues + mucus) vary from 1.3 to 2.0 %, 1.3 to 1.4 % and 0.5 to 0.6 % respectively, resulting notably in transfers of S from *L. rubellus* to peat of 159 to 197 $\mu\text{g S. g}^{-1}$ earthworm (fresh mass).day $^{-1}$. The biogenic inputs of S, C and N, estimated on the peatland ecosystem scale, vary from 0.2 to 0.3, from 1.9 to 2.2, and from 0.6 to 1.0 $\text{g.m}^{-2}.\text{year}^{-1}$ respectively.
6. *L. rubellus* is an epi-aneic species subjected to environmental stochasticity and its regulatory capacities (C and N turnover) are greater and more rapid than those of anecic or endogeic species. The particularities demonstrated support the concept of functional diversity in earthworm communities. Thus this ecosystem engineer is able to more rapidly promote restoration of the “sink” function in abandoned peatland by accelerating the availability of S, C and N nutrients to the primary producers in these ecosystems which are generally nutrient-deficient.

Key-words: ^{34}S - ^{13}C - ^{15}N tracers, earthworm labelling, ecosystem engineer, functional diversity, metabolic traits, nutrients transfers, peatland restoration

2.1. Introduction

Peatlands are ecosystems which naturally accumulate organic matter in the form of peat and function as “sinks” for carbon (C) and nitrogen (N). This “sink” function may be degraded when peatlands are intensively harvested. In fact, destruction of the vegetation and the construction of drains to evacuate excess water will amplify microbial activity and lead to a significant increase of C emissions to the atmosphere (Francez, Gogo & Josselin 2000; Bardgett, Freeman & Ostle 2008). Peatland functioning may also be impacted by other anthropic activities. Thus the control and reduction of atmospheric pollution in Europe, in recent decades, has resulted in a drastic reduction of atmospheric sulphur (S) deposits to such an extent that certain ecosystems have become S-deficient (Ceccotti & Messick 1997; Mathot, Théliier-Huché & Lambert 2009). However, S is an important element in peatland functioning because it controls methane emissions into the atmosphere (Dise & Verry 2001) and is coupled with N dynamics (Moore *et al.* 2005).

Restoration of the “sink” function in abandoned peatlands is feasible so long as the hydrological functioning of the ecosystem can be re-established. In this case, certain plants such as cottongrass (*Eriophorum spp*) rapidly colonize the surface of remoistened peat and help to regenerate the peat accumulation process (Komulainen *et al.* 1999; Waddington, Strack & Greenwood 2010). Earthworms will also rapidly colonize abandoned peatlands but their impact on the “sink” or “source” function has not been demonstrated quantitatively. However, these soil engineers (Jones, Lawton & Schachak 1997) create biostructures (casts, burrows and middens) which modify the forms and availabilities of nutrients and generate “hot-spots” of microbial activity (Binet, Fayolle & Pussard 1998; Brown, Barois & Lavelle 2000). The impact of bioturbation on the dynamics of restoration in abandoned peatlands also needs to be quantified. *Lumbricus rubellus* Hoffmeister (Oligochaeta: Lumbricidae) is an epinecic earthworm typical of organic soils. Its abundance in peat ranges from 8 to 600 individuals.m⁻² depending on the harvesting pressure (Makulec 1993; Curry & Schmidt 2006). The key role of these animals in the recycling of organic matter can be studied from their trophic activities (ingestion and release of nutrients to peat) and their bioturbatory activities (modification of the peat’s physical and chemical properties) which have different effects on nutrient redistribution and ecosystem productivity (Barot, Ugolini & Bekkal Brikci 2007). The properties of ecosystems are known to be strongly affected by the traits of the species which they harbour. The biological, functional and behavioural traits of these organisms must

therefore be differentiated and determined in order to decipher their roles in ecosystem function (Hooper *et al.* 2005) as in numerous studies on the biological and functional traits of plants (Lavorel & Garnier 2002; Kattge *et al.* 2011), notably in peatlands (Ward *et al.* 2009). In comparison, the traits of heterotrophic soil organisms such as earthworms, their diversity, complementarities or redundancies within soil biota communities, have been little studied and the present investigation was motivated by this lack of knowledge.

Whereas studies have been carried out to assess earthworm impact on the C cycle (Scheu 1991; Zhang & Hendrix 1995; Jégou *et al.* 2000), N cycle (Binet & Tréhen 1992; Curry, Byrne & Boyle 1995; Whalen, Parmelee & Subler 2000) and P cycle (Le Bayon & Binet 2001; Le Bayon & Binet 2006) in soils, studies of S are almost nonexistent (Grethe *et al.* 1996) even though this element is involved in the synthesis of amino acids essential to life (cysteine and methionine). Recent works suggest that the labile S secreted by *L. rubellus* can be transformed by the microbial communities in peat (Gicquel *et al.* 2012). However, to date, no studies have been carried out to quantify S transfers from earthworms to the substrate. Isotopic tracers are powerful tools for investigating and quantifying the role of earthworms in nutrient cycling (Bohlen, Parmelee & Blair 2004; Tiunov 2007). They can be used to investigate the biogeochemical processes and interactions occurring with the microbial compartment, which are still poorly understood at the drilosphere level (Brown & Doube 2004).

In the present study, we used the earthworm *Lumbricus rubellus* H as model engineer because its bioturbation activities observed *in situ* in peatlands are likely to have a key role in the reclamation of peatlands abandoned after peat harvesting (Gicquel *et al.* 2012). Our aim was to show how the physiological traits expressed on the scale of the individual affect the recycling efficiency of S, C and N nutrients, on the scale of the ecosystem. We hypothesized that S metabolism would involve reservoirs with contrasting turnovers (represented by the mucus and tissues). We also hypothesized that the turnover of S and N, associated with catabolic processes (sulphur and nitrogenous excretions), would be more rapid than that of C, the element most involved in anabolic processes.

We tested these hypotheses by triple isotopic labelling with ^{34}S - ^{13}C - ^{15}N using the method of pulse-chase labelling of organisms collected *in situ*, on two classes of size, with two lengths of labelling period in order to demonstrate the potential control exerted by the variables “mass” and “duration” on the incorporation of elements and their subsequent bioavailability. In a novel approach we also quantified the biogenic transfers from the

earthworm to peat in order to evaluate the role of this engineer organism in the recycling of nutrients and particularly of S in peat.

Our study made it possible to characterize the ecophysiological traits of ecosystem engineers (*L. rubellus*) in relation to the efficiency of S, C and N recycling in peat. We also analyzed the extent of the physiological traits vary within species, which opens up interesting perspectives concerning the concept of lumbricid functional diversity and more widely the implications of the relationship between taxonomic diversity and functional diversity in ecosystem functioning.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Peat enrichment in ^{13}C , ^{15}N and ^{34}S

The peat and earthworms were sampled from the peatland of Baupte (France, 49° 16' 51.71" North; 1° 23' 30.15" West). This peatland was intensively harvested from the end of the Second World War until 1995 when part of the site was partially flooded in order to encourage its regeneration. The principal colonizing plant species are *Eriophorum angustifolium* and *Agrostis stolonifera*. *Lumbricus rubellus* dominates the peat macrofauna. The harvested peat (pH = 5.4 and relative humidity 85 %) was sieved through 4 mm mesh then stored at 15°C away from light for 1 week before the start of labelling. The composition of the peat in elemental S, C and N is presented in Table 1.

Table 1. Comparison of elemental S-C-N, stoichiometric ratios and isotopic compositions of unlabelled peat, unlabelled tissues and unlabelled mucus (Analysis by EA-IRMS; Means \pm S.E.; $n = 8$ for peat, $n = 24$ for earthworms, $n = 6$ for mucus; different small letters in the same column denote significant differences, t tests with $P < 0.05$)

Sample	% S	% C	% N	S:C:N	^{34}S Atom %	^{13}C Atom %	^{15}N Atom %
unlabelled peat	1.0 (± 0.0) ^b	48.6 (± 0.9) ^b	2.1 (± 0.0) ^a	1:129:5 ($\pm 0:2:0$)	4.41 (± 0.00) ^b	1.081 (± 0.000) ^a	0.369 (± 0.000) ^a
unlabelled tissues	0.7 (± 0.0) ^a	48.7 (± 1.1) ^b	12.0 (± 0.5) ^b	1:196:42 ($\pm 0:9:3$)	4.37 (± 0.00) ^a	1.085 (± 0.001) ^b	0.369 (± 0.001) ^a
unlabelled mucus	1.0 (± 0.1) ^{ab}	24.2 (± 3.7) ^a	4.9 (± 1.1) ^a	1:67:12 ($\pm 0:10:3$)	4.50 (± 0.08) ^{ab}	1.312 (± 0.045) ^c	0.646 (± 0.168) ^a

Incorporation of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N into the microbial biomass of the peat was optimized by enriching 3 kg of peat containing 3 g (dry mass) of crushed *Agrostis stolonifera* litter in 3 successive stages:

- a first addition of ^{34}S - ^{13}C - ^{15}N after 24 h, composed of 0.55 g of elemental ^{34}S (99 Atom %; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France), 3 g of ^{13}C -glucose (D-glucose, U- $^{13}\text{C}_6$ at 99 Atom %; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France) and 1.5 g of ^{15}N -ammonium chloride ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ at 99 Atom %; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA),
- a second addition of ^{13}C - ^{15}N , 120 h after the first, composed of 3 g of ^{13}C -glucose and 1.5 g of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$,
- a final addition of 6 g of ^{13}C -glucose, 48 h after the second addition. After incubation for 8 days at 15°C away from light, the Atom % excess in ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N of the enriched peat was 4.5, 1.3 and 6.2 % respectively.

2.2.2. Triple isotopic labelling of earthworms

Individual adult *Lumbricus rubellus* H. were sampled by formaldehyde method from 1 m² squares of vegetation (*Eriophorum angustifolium* and *Agrostis stolonifera*). The abundance of *L. rubellus* was 10.5 ± 4.7 individuals.m⁻² corresponding to a biomass of 4.9 ± 3.1 g of fresh matter.m⁻² (means \pm S.E.). The earthworms ($n = 152$) were separated into six classes according to size, based on the individual fresh matter biomass: class *a* = 460 ± 7 mg ($n = 38$), class *b* = 540 ± 5 mg ($n = 38$), class *c* = 623 ± 3 mg ($n = 19$), class *d* = 688 ± 12 mg ($n = 19$), class *e* = 756 ± 5 mg ($n = 19$) and class *f* = 878 ± 11 mg ($n = 19$). A comparison of “small” vs. “large” earthworms was obtained by comparing classes *a-b* with classes *c-d-e-f*.

One hundred and twenty eight individuals were labelled with isotopic tracers and 24 non-labelled individuals served as control. Each earthworm was placed in a polycarbonate box (volume 100 mL, diameter 6 cm) containing 20 g of peat, previously enriched in ^{34}S - ^{13}C - ^{15}N , and 6 mL of distilled water, then kept for 8 days (short labelling period = D₈) or 22 days (long labelling period= D₂₂) under controlled conditions in a climatic chamber (Convicon GR96; day/night cycle: 16/8 hours; radiation 10 to 150 μmol ; 10°C night to 15°C day; humidity = $70 \pm 5\%$). Each earthworm was then rapidly rinsed in distilled water then transferred to non-labelled peat (polycarbonate box 200 mL in volume and 8 cm in diameter containing 80 g of unlabelled peat and 20 mL of distilled water). The earthworms were then fed by placing 80 mg (dry matter) of *A. stolonifera* litter on the peat surface. De-labelling was

carried out under the same conditions of temperature and humidity as labelling and lasted up to 28 days. A larger amount of peat was used during de-labelling to enable *L. rubellus* to create adequate burrows. The natural abundances of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N in the 24 unlabelled control earthworms and in the unlabelled peat were measured at 0, 8 and 22 days in order to check that these values did not evolve over time (Table 1). None of the earthworms died during the labelling and de-labelling periods.

Eight earthworms ($2a + 2b + 1c + 1d + 1e + 1f$) were analysed per date at days 4, 8, 16 and 22 during the labelling period and at days 1, 3, 7, 14, 21 and 28 during the de-labelling periods of D_8 and D_{22} . Before analysis, the earthworms were weighed, rinsed with distilled water then transferred for 6 minutes to Petri dishes containing $2 \times 50 \mu\text{L}$ of 0.05 M HCl to collect the mucus (Dyckmans, Scrimgeour & Schmidt 2005). The secreted mucus was removed by pipette then transferred to a tin capsule and dried for 48 h at 60°C in an oven for isotopic analyses. The mean amount of mucus obtained was $70 \pm 3 \text{ mg.individual}^{-1}$ (means \pm S.E. in fresh matter, $n = 152$). The earthworms were then rinsed again in distilled water, the excess water was removed with absorbent paper after which the earthworms were weighed before being euthanized by freezing. After removal of the digestive tube by dissection, the tissues were oven-dried for 48 h at 60°C then ground and transferred to tin capsules.

After 3 and 21 days of de-labelling, peat samples (drilosphere) were taken from the burrow walls (less than 2mm thick), oven-dried for 48 h at 105°C then ground and transferred to tin capsules. These amounts of peat corresponded to between 1.9 and 3.3 mg of dry peat per box. Measurements of C-CO₂ and ^{13}C -CO₂ respiration were also obtained by static chamber method for 1 h on each day of labelling and de-labelling from 8 earthworms ($2a + 2b + 1c + 1d + 1e + 1f$). The amounts of CO₂ expressed in mg of C-CO₂.g⁻¹ of earthworm.day⁻¹ were measured by gas phase chromatography (MicroGC 3000 equipped with a 6m Poraplot-U column, SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). The gas samples for measurements of ^{13}C were obtained with a syringe then collected in 12 mL tubes under vacuum (VC309, Labco Limited) and stored in the refrigerator away from light until analysis.

2.2.3. S-C-N- analyses

The analyses of elemental and isotopic S, C and N of the samples of mucus, tissues and peat were carried out by the laboratory Iso-Analytical Limited (UK). They were measured by EA-IRMS: elemental analyser (Europa Scientific Roboprep, Crewe, UK) coupled with an isotope

ratio mass spectrometer (Europa Scientific 20-20 IRMS, Crewe, UK). The precision of the instrument provided by the laboratory was ± 0.2 ‰ (at one standard deviation). The analyses of ^{13}C -CO₂ were carried out by IRMS at the IBFA laboratory of the University of Caen with a Microgas analyser, precision ± 0.3 ‰ (GV Instruments, Manchester, UK) fitted with a Gilson sample changer.

2.2.4. Data processing and statistical analyses

The isotopic enrichment (^{34}S , ^{13}C and ^{15}N) of the mucus, tissues and peat was expressed in Atom % excess (APE) which corresponded to the difference between the Atom % of the labelled sample and the Atom % of non-labelled samples (Table 1).

The kinetics of enrichment and depletion of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N in the mucus and tissues were fitted to exponential functions:

$$y = a(1 - e^{-bx}) + c \quad (\text{Eq. [1] for labelling})$$

$$y = a e^{-bx} + c \quad (\text{Eq. [2] for de-labelling})$$

where a, b and c are fitted constants. The *rates* of enrichment or depletion (Atom %·day⁻¹) were calculated from the derivative of the function during the most rapid phases, i.e., between 0 and 4 days. The values at equilibrium represent the absence of gain or additional depletion of the elements. Thus we deduced a maximum value for enrichment corresponding to the beginning of the *plateau* phase of equation [1] and a maximum depletion corresponding to the *baseline* of equation [2]. Finally the *half-life* ($t_{1/2}$), during which the enrichments in ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N in the tissues and mucus were divided by two, was taken to represent the time of renewal of these elements in the two compartments. For each of these models, an adjusted R^2 was calculated according to the formula $1 - \text{RSS}/\text{AdjSS}$, where RSS is the residual sum of squares and AdjSS is the sum of squares of the deviations of the observed responses from their mean (Raoul *et al.* 2010).

If it is assumed that the different isotopic forms composing an element do not exhibit any differences in transfer (Powlson & Barraclough 1993), the estimated fluxes of the ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N isotopes are representative of the overall fluxes of S, C and N. We calculated the stocks of labelled elements and recovery of added tracers in the different compartments of the microcosms (mucus, tissues and peat), together with the C losses by respiration. The recovery

in each compartment was expressed in relation to the amount of tracer added to each microcosm, by applying the following equation (Powlson & Barraclough 1993; Francez & Loiseau 1999), to each element:

$$\text{Recovery \%} = (\text{APE}_{\text{compartment}} / \text{APE}_{\text{added}}) \times (\text{stock}_{\text{compartment}} / \text{stock}_{\text{added}}) \times 100 \quad [3]$$

The amounts of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N supplied to the peat originated solely from the labelled earthworms added to the microcosms. The overall Atom % of earthworms was calculated according to the following equation for each element:

$$\text{Atom \% earthworm} = [(\text{Atom \%}_{\text{tissues}} \times \text{stock}_{\text{tissues}}) + (\text{Atom \%}_{\text{mucus}} \times \text{stock}_{\text{mucus}})] / (\text{stock}_{\text{tissues}} + \text{stock}_{\text{mucus}}) \quad [4]$$

The S recovered in the peat was calculated from the difference between the total of 100 % and the sum of the values obtained for the mucus and tissues and assuming that there were no or negligible losses in gaseous forms.

The biogenic transfers of S, C and N calculated from the amounts recovered in the peat were expressed in $\mu\text{g.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day $^{-1}$ and the daily turnovers of S, C and N in the earthworms (mucus + tissues) were calculated on the basis of the transfer and respiration for C (Whalen, Parmelee & Subler 2000) according to the equation:

$$\text{Daily turnover} = (\text{daily biogenic transfers} / \text{stock}_{\text{earthworm}}) \times 100 \quad [5]$$

The adjustment to exponential models and the statistical analyses were carried out with the software *R* (version 2.12.0). The level of significance for all analyses was set at $P < 0.05$. Analyses of variance (ANOVA using the GLM procedure) were performed to test the effect of “size” (“small” vs. “large”) and “length of the labelling period” (D₈ vs. D₂₂) on the isotopic composition (^{34}S , ^{13}C and ^{15}N) of the samples. *t* tests were carried out to determine the effect of “labelling duration” on ^{13}C -CO₂ enrichment and the amounts recovered.

2.3. Results

2.3.1. Labelling, enrichments and tracer losses

The mucus was proportionally richer in S and poorer in N than the tissues (Table 1), and as shown by the stoichiometric S:C:N ratios, the mucus is particularly rich in nutrients. The kinetics of labelling of the mucus and tissues could be fitted to exponential functions whatever the element (Fig. 1 and Table 2). The mucus was enriched more rapidly (5 to 13 times) and more strongly (3 to 7 times) than the tissues but with greater variability (Fig. 1 and Table 2). This enrichment occurred in two stages: an initial rapid phase followed by an equilibrium phase which was attained more rapidly for S (13 days) than for C (16 days) or N (22 days). Maximum tissue enrichment was attained solely for S in “small” earthworms (7 days) and C in “large” earthworms (21 days). The initial rates of enrichment of the mucus and tissues were identical for all 3 elements (0.7 and 0.1 Atom % per day, respectively) but the maximum intensity was greater for ^{15}N than for ^{13}C , which was greater than for ^{34}S (Table 2). “Small” earthworms were significantly more enriched in ^{13}C and ^{15}N than large earthworms (ANOVAs: ^{13}C $P = 0.039$; ^{15}N $P = 0.017$), but “size” had no effect on ^{34}S enrichment ($P = 0.684$).

Table 2. Comparisons of the initial rates of labelling and de-labelling (D_8 and D_{22}) calculated between 0 and 4 days, the number of days required to attain a plateau (labelling) or a baseline (de-labelling), the maximum and minimum intensities of enrichment (in APE), and the half-lives calculated for each of the adjustments in Figures 1 and 2 (Significance for R^2 : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). n.d. = non defined

		Mucus			Tissue “Small”			Tissue “Large”		
		Labelling	D_8	D_{22}	Labelling	D_8	D_{22}	Labelling	D_8	D_{22}
^{34}S	Initial rate (in Atom%.d ⁻¹)	0.67	0.94	1.14	0.11	0.08	0.03	0.05	0.04	0.12
	Plateau or baseline (in d.)	13	4	3	7	2	13	n.d.	3	2
	Min. or Max. (in APE)	4.3	0.0	0.1	0.6	0.1	0.2	0.8	0.1	0.3
	Half-life (in days)	n.d.	0.9	0.6	n.d.	0.4	4.6	n.d.	0.9	0.4
	R^2	0.985***	0.994***	0.995***	0.617***	0.458**	0.597***	0.733***	0.477**	0.798***
^{13}C	Initial rate (in Atom%.d ⁻¹)	0.75	0.48	0.26	0.12	0.03	0.10	0.14	n.d.	0.02
	Plateau or baseline (in d.)	16	16	16	n.d.	n.d.	16	21	n.d.	n.d.
	Min. or Max. (in APE)	5.1	0.8	1.4	1.6	0.4	0.8	1.3	n.d.	0.8
	Half-life (in days)	n.d.	3.4	3.9	n.d.	11.5	4.5	n.d.	n.d.	30.1
	R^2	0.623**	0.669***	0.686***	0.945***	0.452**	0.646***	0.956***	0.229	0.450*
^{15}N	Initial rate (in Atom%.d ⁻¹)	0.72	0.78	0.95	0.12	0.04	0.09	0.11	n.d.	0.04
	Plateau or baseline (in d.)	22	5	6	n.d.	22	17	n.d.	n.d.	20
	Min. or Max. (in APE)	6.2	1.0	1.8	1.8	0.4	0.9	1.4	n.d.	0.9
	Half-life (in days)	n.d.	1.1	1.2	n.d.	7.0	4.6	n.d.	n.d.	7.3
	R^2	0.885***	0.879***	0.805***	0.920***	0.471**	0.634***	0.955***	0.287	0.493**

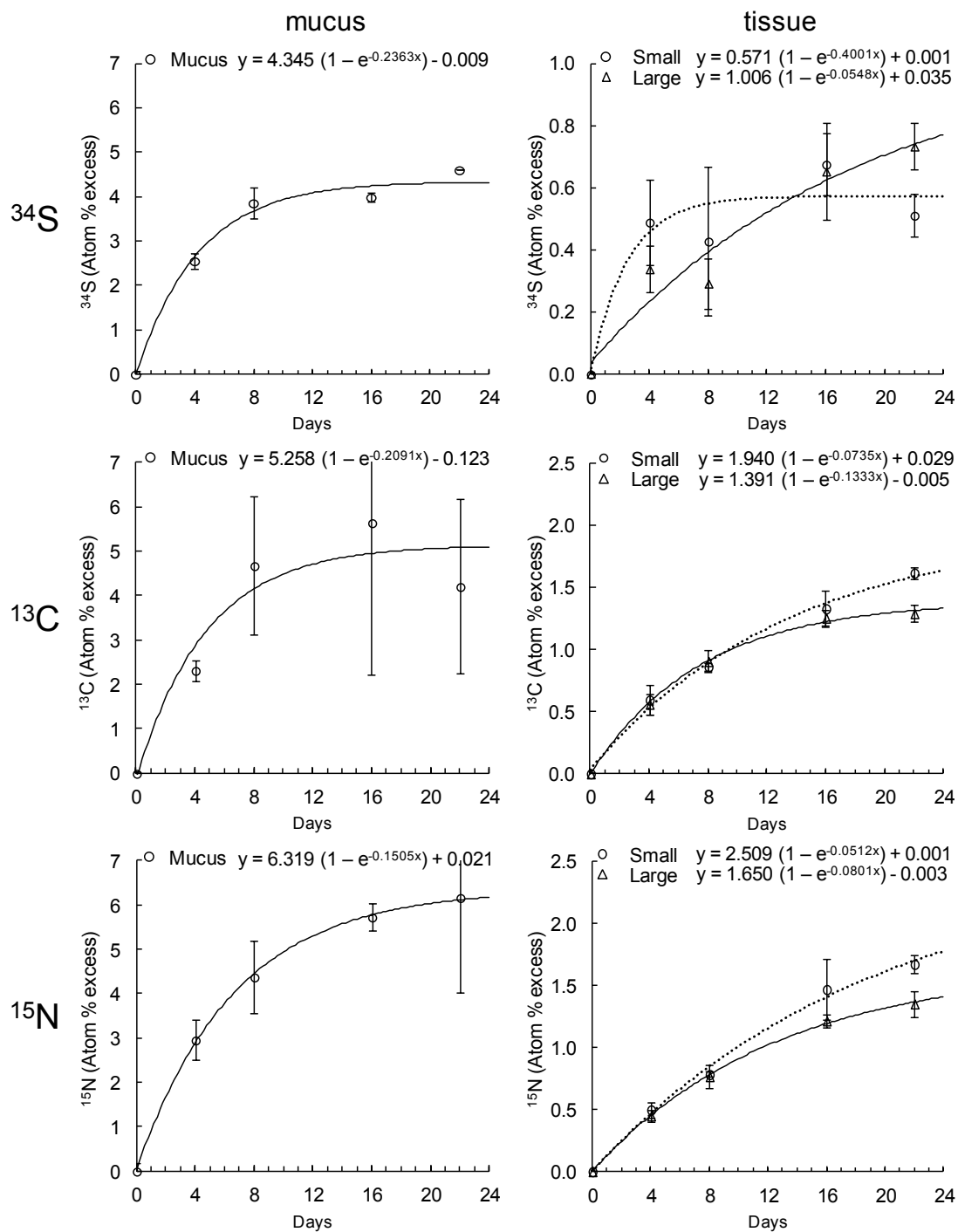


Fig. 1. Changes occurring in ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N enrichment of the mucus and tissues of “small” (○) and “large” earthworms (△) over 22 days. Means \pm S.E. ($n = 1$ to 3 for the mucus and $n = 4$ for the tissues). The unbroken lines for the mucus, the dotted lines (“small”) and the unbroken lines (“large”) for the tissues, represent the adjustments made by applying the exponential function in Eq. 1 to the entire data set. To improve clarity, the scales differ depending on the element for the earthworm tissues.

The kinetics of depletion of elements from the mucus and tissues could be fitted to exponential functions (Fig. 2 and Table 2). The mucus was very rapidly depleted of its enrichment in ^{34}S and ^{15}N , the loss of tracers occurring 1.1 to 1.7 times more rapidly than the gains (Fig. 2 and Table 2). The half-lives of S in the mucus and tissues were less than one day. The half-lives of C and N were 6 times shorter in the mucus than in the tissues. The depletion of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N from the mucus occurred in two stages: an initial rapid phase followed by an equilibrium phase, which was systematically attained more rapidly for S (3 to 4 days) than for N (5 to 6 days) and C (16 days), whatever the initial duration of enrichment. For the tissues, the equilibrium phase was also attained more rapidly for S (2 to 13 days) than for N (17 to 22 days). For C, only a baseline was obtained in “small” earthworms after the longer duration of labelling (16 days). The kinetics of depletion, in contrast to those of labelling, differed between the 3 elements: the mucus and tissues became poorer in ^{34}S more rapidly (half-lives < 1 day) than in ^{15}N (half-lives of 1 to 7 days) or in ^{13}C (half-lives of 3 to 30 days).

The kinetics of de-labelling in the tissues was independent of earthworm size, irrespective of the element (ANOVAs: ^{34}S $P = 0.627$; ^{13}C $P = 0.561$; ^{15}N $P = 0.136$). The intensity of enrichment in the tissues was significantly greater after the longer labelling period for all 3 elements (ANOVAs: ^{34}S $P < 0.001$; ^{13}C $P < 0.001$; ^{15}N $P < 0.001$). In contrast, the duration of labelling only affected the level of N enrichment in the mucus (ANOVAs: ^{34}S $P = 0.337$; ^{13}C $P = 0.192$; ^{15}N $P < 0.001$). The overall losses (from mucus and tissues) occurred more rapidly and were more intense after the longer labelling period (Table 2).

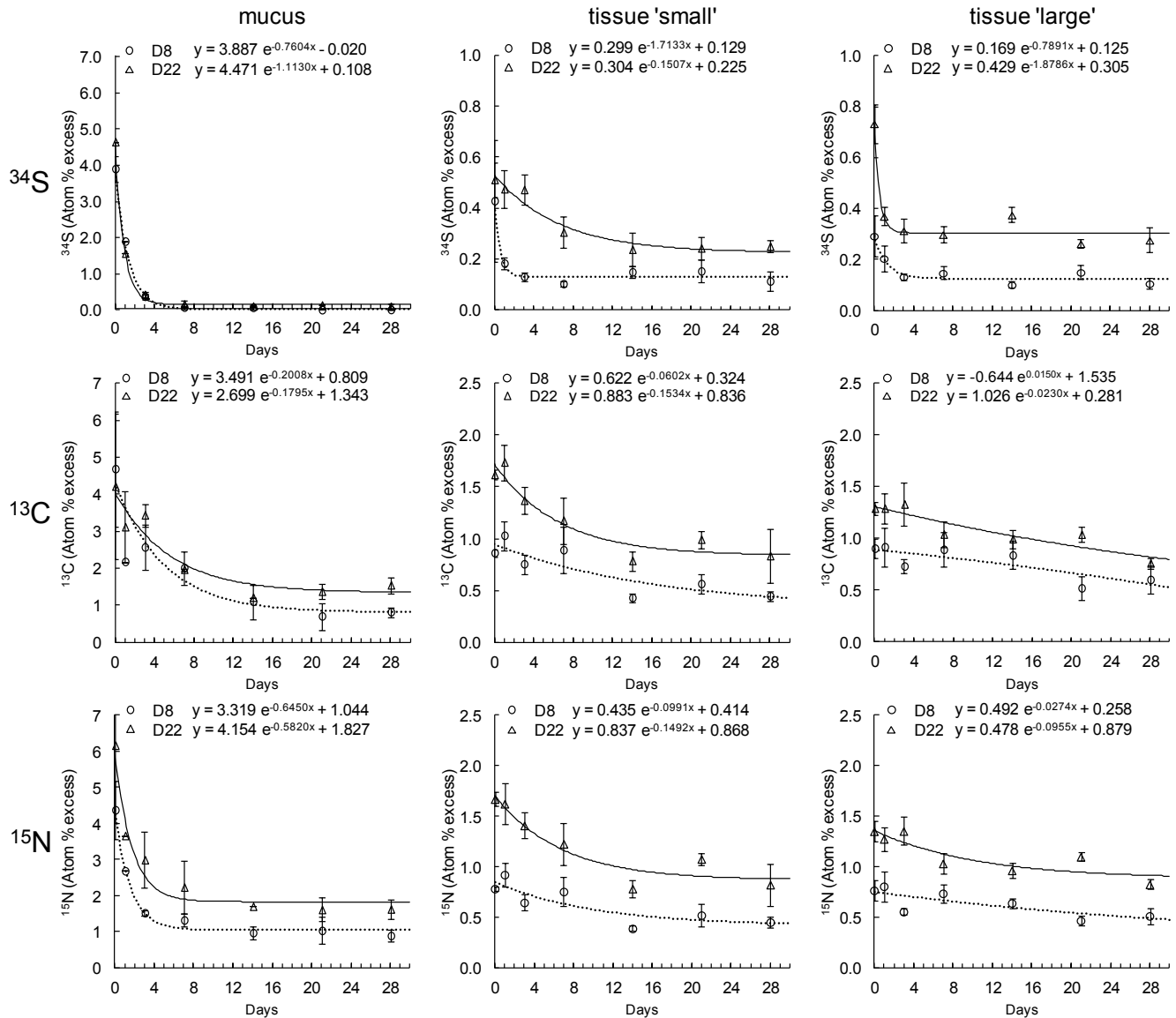


Fig. 2. Changes in the de-labelling of ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N in the mucus and tissues of “small” and “large” earthworms over 28 days. The values obtained after a short labelling period (8 days: D₈) are represented by ○ and those obtained after a long labelling period (22 days: D₂₂) by △. Means ± S.E. ($n = 1$ to 3 for mucus and $n = 4$ for tissues). The dotted (D₈) and unbroken lines (D₂₂) represent the adjustments made by applying the exponential function in Eq. 2 to the entire data set. To improve clarity, the scales differ according to the elements for the earthworm tissues.

2.3.2. C respiration losses, recoveries and biogenic inputs to peat

The kinetics of the cumulated amounts of respired C were identical whatever the labelling duration i.e., 5.4 ± 0.1 and 5.3 ± 0.1 mg C-CO₂.g⁻¹ of earthworm (fresh mass).day⁻¹, after short and long labelling periods, respectively (Fig. 3). In contrast, the isotopic content of

respired C was affected by the length of the labelling period. The isotopic excess was two times higher at the beginning of de-labelling and was depleted more rapidly, after a short labelling period than after a long labelling period. At the end of de-labelling, the isotopic excesses were of the same order of magnitude (Fig. 3). At the beginning of labelling, the amounts of respired C-CO₂ were equivalent to 12 % and 7 % of the initial amounts of C derived from the earthworms after short and long labelling periods, respectively (Fig. 4). They represented only 2 % of the initial C after 21 days of de-labelling.

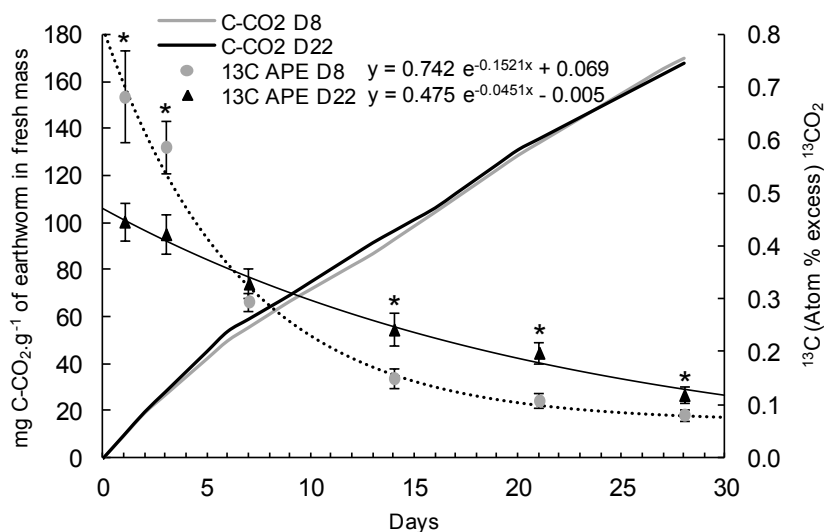


Fig. 3. Changes in the cumulated respiration in mg of C-CO₂ per g of earthworm (in fresh mass) and in Atom % excess (APE) of ¹³C₂O₂ after a short labelling period (8 days: D₈) or a long labelling period (22 days: D₂₂) over 28 days. Means ± S.E. for the APE in ¹³C₂O₂ (*n* = 8). The * represent the significant differences between the APE by date (*t* tests with *P* < 0.05). The dotted lines (D₈: *R*² = 0.821***) and the unbroken lines (D₂₂: *R*² = 0.719**) represent the adjustments made by applying the exponential function in Eq. 2 to the entire data set. The natural abundance of ¹³C-CO₂ is 1.090 %.

The calculated C and N recoveries ranged from 84 ± 10 % to 112 ± 13 % and were not significantly different from 100 %, irrespective of the lengths of the labelling period and the initial and final phases of de-labelling (Fig. 4).

Significant amounts of S, C and N were transferred from earthworm to peat from the 3rd day of de-labelling onwards (Fig. 4). Additional amounts of S, C and N derived from the earthworms were observed in the peat after 21 days. In the tissues, the S, C and N stocks were depleted between 0 and 3 days of de-labelling whereas only the S stocks were depleted between 3 and 21 days, (- 31 ± 9 %) after the long labelling period. In the mucus, the S, C and N stocks were also depleted between 0 and 21 days of de-labelling (-6 to -27 % for S and -5 to

-7 % for C and N). The dynamics of transfer were not identical for the 3 elements. The S derived from earthworms was rapidly transferred to peat after 3 days of de-labelling (44 to 77 % of the S initially contained in the earthworm) whereas C and N transfers occurred much more slowly (Fig. 4).

The amounts of S transferred by the earthworm to peat were much smaller than the amounts of C and N, due to the very low initial S stocks (Fig. 4). Thus, during the first 3 days of de-labelling, the S, C and N transfers from an average-sized *L. rubellus* ranged from 159 to 197, 1336 to 1388 and 456 to 632 μg of S, C and N.g⁻¹ of earthworm (fresh matter).day⁻¹ depending on the length of the labelling period (Fig. 5). Based on these rates of transfer, the daily turnovers of S, C and N in *L. rubellus* (tissues + mucus) ranged from 1.3 to 2.0 %, 1.3 to 1.4 % and 0.5 to 0.6 %, respectively (Fig. 5).

The stoichiometric S:C:N ratios showed that peat sampled from burrow linings was more enriched in S (1:122:5 \pm 0:4:0) than the surrounding bulk peat (1:129:5 \pm 0:2:0). The S:C:N ratios calculated from the daily transfers (1:20:7 \pm 0:3:1) followed those of the mucus (1:67:12 \pm 0:10:3) rather than those of the tissues (1:196:42 \pm 0:9:3).

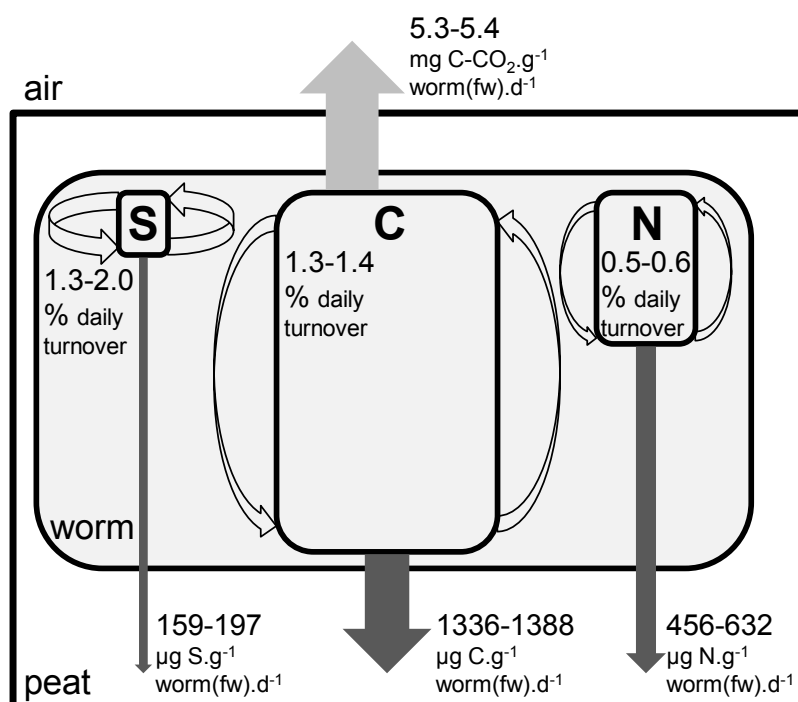


Fig. 5. Daily turnovers of S, C and N in *L. rubellus* (tissues + mucus) and associated fluxes of S, C and N (transfers + respiration).

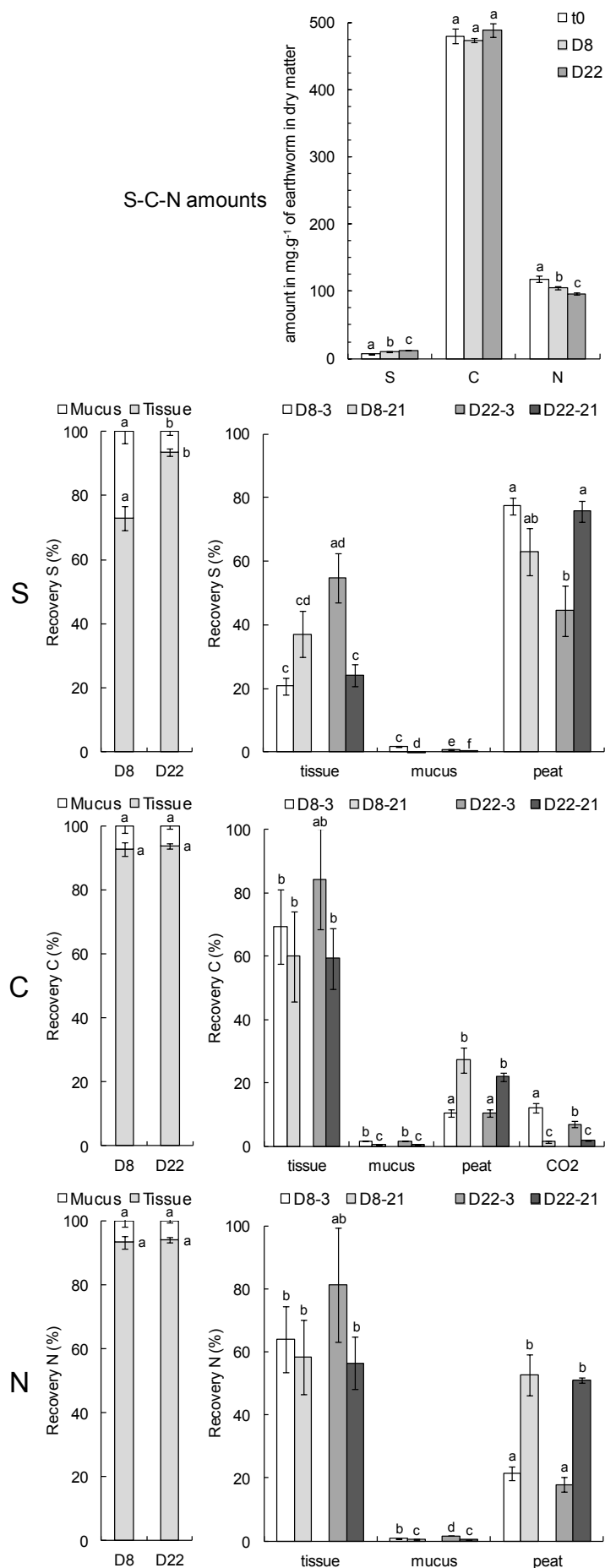


Fig. 4. Quantities of S, C and N in labelled *L. rubellus* and distributions at the end of labelling and after 3 and 21 days of de-labelling in the S, C and N recovered from the tissue, mucus, peat and CO₂ compartments after a short period (D₈) or a long period of labelling (D₂₂). The letters illustrate significant differences between the dates and periods of labelling for a same compartment (*t* tests with $P < 0.05$). Means ± S.E. ($n = 8$ for the tissues; $n = 1$ to 3 for mucus; $n = 2$ to 4 for peat; $n = 8$ for the CO₂).

2.4. Discussion

2.4.1. Efficiency of *L. rubellus* in the recycling of S, C and N nutrients: expression of ecophysiological traits

The amounts recovered and the measurements of earthworm respiration showed that the labelling conditions were suitable for monitoring S, C and N turnovers in compartments of different nature, such as the mucus and tissues. In fact, the calculations showed that, overall, the elements initially supplied via the earthworms were recovered from the compartments analysed at the different dates. This excluded potential losses due to denitrification or ammonia volatilization (unlikely due to the acid pH of peat).

The mucus of *L. rubellus* was richer in S and poorer in N than the tissues, as attested by the stoichiometric N:S ratios (11.6 ± 2.6 for mucus and 41.7 ± 3.1 for tissues). The very low C:N ratios in the mucus (6.0 ± 0.9) and tissues (4.8 ± 0.2) of *L. rubellus*, were comparable to those measured in the mucus of *O. lacteum* (3.8 ± 0.3 ; Scheu 1991) and in the mucus and tissues of *L. festivus* (6.0 ± 0.8 and 5.0 ± 0.2 , respectively; Schmidt, Scrimgeour & Curry 1999). We thus confirm the N-rich status of earthworms and demonstrate for the first time that the earthworm mucus is specifically rich in S. According to Bouché (1972), the mucus produced by *L. rubellus* is abundant and iridescent and it would be interesting to analyse its chemical composition to determine the possible role of S in this appearance.

The pulse-chase labelling approach allowed clear differentiation between the mucus and tissues in terms of S-C-N turnovers, the tissues constituting a reservoir with slow turnover (half-lives of 1 to 30 days) and the mucus a reservoir with rapid turnover (half-lives of 1 to 4 days). This corresponded to the expression of two major metabolic traits of the epi-anecic *L. rubellus* and of earthworms in general. The observed differences in the speed and intensity of enrichment between the mucus and tissues can be explained by the very nature of these two reservoirs. The mucus is composed of mucoproteins secreted by the epidermal glands and representing a labile pool which is continually generated and released by the earthworm (catabolic activity). The tissues consist of more complex molecules associated with anabolic activity and thus constitute a pool with a slower turnover, the renewal of S, C and N stocks occurring on the scale of the earthworm's life (Whalen & Janzen 2002; Curry & Schmidt 2007).

S is the most reactive element, as attested by the great rapidity of enrichment (half-lives of less than 1 day) compared with C and N. The differences in reactivity between the

three elements corroborate the observations of Martínez del Rio *et al.* (2009). In fact, these authors suggest that the rapidity with which animals incorporate the isotopic signal from their food supply into their tissues will vary considerably due to differences in turnover between proteins, physiological conditions and individual growth. Thus the processes of incorporation and remobilisation of substrate-derived nutrients in the tissues of *L. rubellus* occur more rapidly for molecules containing S than for those containing C or N. These results should be connected with those of Gicquel *et al.* (2012) who distinguished, by coupling stable isotopes and NanoSIMS imagery, different ^{15}N and ^{34}S labellings in the tissues of an intestinal villus of *L. rubellus*. Renewal of the S stocks in the tissues and mucus of *L. rubellus* take less time than renewal of the C and N stocks, as shown by the calculated daily turnovers in the present study. The estimated daily turnover of C, here 1.3-1.4 %, is a little higher than the 1.1 % measured by Scheu (1991) in individuals of *O. lacteum*. The daily turnover of N, here estimated at 0.5-0.6 %, is a little lower than the 0.7-0.8 % measured by Whalen, Parmelee & Subler (2000) in individuals of *L. rubellus* of similar size. Thus, contrary to our hypothesis, S behaves differently to N in terms of reactivity. The observed differences are probably linked to the nature and composition of the molecules enriched in ^{34}S , ^{13}C and ^{15}N (lipids, amino acids, etc.), which will need to be determined.

Also, and contrary to our expectations, no effect of earthworm size was observed on the kinetics of release of the S, C and N derived from the tissues even though the intensity of C and N labelling was affected by size. “Small” *L. rubellus*, which were usually young individuals, became more strongly enriched in C and N than the larger-sized adults which had completed their growth and attained a stable biomass. Similar differences in C and N enrichment linked to the biomass of individuals were observed in the endogeic species *A. tuberculata* (Whalen & Janzen 2002) and *A. caliginosa* (Dyckmans, Scrimgeour & Schmidt 2005) but, to this day, no effect of size has been demonstrated on the rate that C and N derived from the earthworm tissues is made available to the environment. We show here another major metabolic trait of earthworms, particularly useful for quantifying the role of these organisms on the ecosystem scale.

We confirmed our hypothesis that labelling efficacy would be increased by the length of the labelling period and that this would explain the reactivity of S, C and N (rapidity of depletion) from the mucus and tissues. As the amounts of respired C were identical after short or long labelling periods, the earthworms did not seem to have suffered any stress linked to the duration of the labelling period which affected only the quality of the respired C (isotopic

excess). Thus increasing the length of the labelling period increased the intensity of this latter, and probably affected various other types of molecules to a greater extent than one of shorter duration.

2.4.2. S, C and N turnovers and functional diversity in lumbricids

In the present study, the C and N turnovers in the tissues of the epi-anecic earthworm (*L. rubellus*) were respectively up to 6 and 7 times more rapid than those of an anecic worm (*L. terrestris*) and up to 6 and 11 times more rapid than those of an endogeic earthworm (*A. caliginosa*; Table 3). It is interesting to note that these differences in ecophysiological traits also correspond to differences in the modes of life and action of these species in the soil. An epi-anecic earthworm (“r” strategy; Satchell 1980) is subjected to the environmental stochasticity prevalent in the upper soil layer (variations in T°C and moisture content, quality and quantity of the food resources, etc.; Bouché 1977), and in response possesses greater and more rapid regulatory capacities than anecic or endogeic species (“K” strategy) which inhabit deeper layers of the soil. Similarly, other factors such as diet (litter-feeders or geophagous) and nature of the substrate (mineral or organic) will affect the ecophysiological traits. The differences in turnover reported for the two anecic earthworms *A. longa* (Bouché 1984) and *L. terrestris* (Curry, Byrne & Boyle 1995; Heiner *et al.* 2011) would result more from the different experimental conditions (*in situ* vs. microcosms) than from different types of behavior or physiological trait. Similarly, the differences observed for N between two studies with *A. caliginosa* (Dyckmans, Scrimgeour & Schmidt 2005 and Heiner *et al.* 2011) would be linked to the limited number of replicates ($n \leq 3$) in the work by Heiner *et al.* (2011), who reported non-optimal conditions and considerable mortality. Regarding the mucus of *L. rubellus* and *A. caliginosa*, the N turnovers are clearly of the same order and the C turnovers about 6 times less rapid for *L. rubellus*. This unexpected difference in C turnover may be partially explained by the fact that Dyckmans, Scrimgeour & Schmidt (2005) adjusted their data with two-term exponential functions and described two sub-pools with rapid and slower turnovers respectively. However, the observed turnovers of C and N are always more rapid in the mucus than in the tissues, whether the species is epi-anecic or endogeic.

C losses by respiration were approximately 7 times higher for the epi-anecic *L. rubellus* than estimates for the anecic species *L. terrestris* (Binet, Fayolle & Pussard 1998) or the endogeic *A. caliginosa* (Byzova 1965). These results clearly indicate that the earthworm’s

respiratory metabolism is closely linked to its way of life and need to be taken into consideration when assessing the role of these soil engineers on carbon emissions and exchanges between the soil and the atmosphere. It is also apparent that further complementary studies of S metabolism are required to determine the extent of the variations of this physiological trait existing between the ecological categories and thus refine the concept of functional diversity in earthworm communities.

Table 3. Assessing the functional diversity in Lumbricid communities. Comparisons of the half-lives of C, N and S measured in species of earthworms belonging to different ecological categories. For our study, the half-lives were calculated on the whole set of earthworms (“small” + “large”, $n = 8$) at D_8 and D_{22} . For the results of Heiner *et al.* (2011), the values correspond to extrapolations of the treatment ‘staggered + incub’

Species	Ecological Categories	Experiments	Method of labelling	Time of labelling	Compartments	Half-lives (in days)			References
						^{13}C	^{15}N	^{34}S	
<i>Lumbricus rubellus</i>	Epi-aneic	<i>Ex situ</i> + peat	Incubation soil (8 d.)	8 days (D_8) or 22 days (D_{22})	Tissues (D_8)	24.6	9.3	0.6	Present study
					Tissues (D_{22})	6.0	5.2	1.2	
					Mucus (D_8)	3.4	1.1	0.9	
					Mucus (D_{22})	3.9	1.2	0.6	
<i>Lumbricus terrestris</i>	Anecic	<i>Ex situ</i> + soil composite	Labelled litter	80 days	Tissues	-	35	-	Curry, Byrne & Boyle (1995)
<i>Lumbricus terrestris</i>	Anecic	<i>Ex situ</i> + arable soil	Incubation soil (7 d.)	4 days	Tissues	37	30	-	Heiner <i>et al.</i> (2011)
<i>Aporrectodea longa</i>	Anecic	<i>In situ</i> + arable soil	Labelled algae	40 days	Tissues	12	12	-	Bouché (1984)
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Endogeic	<i>Ex situ</i> + arable soil	Incubation soil (7 d.)	4 days	Tissues	36.6	16.1	-	Dyckmans, Scrimgeour & Schmidt (2005)
					Mucus	0.6	0.7	-	
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Endogeic	<i>Ex situ</i> + arable soil	Incubation soil (7 d.)	4 days	Tissues	26	55	-	Heiner <i>et al.</i> (2011)

2.4.3. Biogenic inputs of S, C and N on the ecosystem scale

We have shown that the transfers of S, C and N from earthworm to peat occur rapidly. Nevertheless, the fates of the 3 elements in the earthworm-peat system showed important differences. Most of the S derived from earthworms was rapidly transferred to the peat, unlike the C and N. For the first time, to our knowledge, our study has allowed measurement of the transfers of S from a soil engineer, i.e. the earthworm, to the substrate in which it is operating, in this case peat. Based on the average mass of an individual, and without taking “size” into consideration, we calculated that between 159 and 197 $\mu\text{g S} \cdot \text{g}^{-1}$ earthworm (fresh mass).day⁻¹

derived from *L. rubellus* were incorporated into the peat and could potentially be mobilized by plants and/or micro-organisms. These biogenic inputs of sulphur may come from the secretion of S-rich mucoproteins by the epidermal cells of earthworms, as suggested by Gicquel *et al.* (2012). When size is taken into consideration, “large” earthworms secrete 1.3 times more S (242 vs. $184 \mu\text{g S.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day⁻¹) than “small” earthworms.

Although a large proportion of ¹³C and ¹⁵N remained in the tissues during de-labelling, significant biogenic transfers of C and N to the peat took place. *L. rubellus* transferred between 1336 and $1388 \mu\text{g C.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day⁻¹, which represents about 25 % of carbon losses from the earthworm. Losses via the mucus account for up to 63 % of the daily C depletion from the endogeic species *O. lacteum* (Scheu 1991). According to Scheu (1991) and Zhang & Schrader (1993), this C is mainly present as polysaccharides produced by the chloragogenous cells of the earthworms. In the same way as for S and taking “size” into consideration, “large” earthworms secrete 1.8 times more C (6665 vs. $3756 \mu\text{g C.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day⁻¹) than “small” earthworms.

N depletion by *L. rubellus* fluctuated between 456 and $632 \mu\text{g N.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day⁻¹, these values being comparable to those obtained by Whalen, Parmelee & Subler (2000), in individuals of the same species and similar size. As the works of Whalen, Parmelee & Subler (2000) were carried out in an arable soil, we can conclude that this is a specific trait of *L. rubellus* which is independent of the substrate. The transfers of biogenic N are mostly in mineral form i.e., N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ (32 %) or in a dissolved organic form such as urea (17 %) (Edwards & Bohlen 1996; Whalen, Parmelee & Subler 2000). The remaining 51 % of the N excreted by the earthworm are either immobilized in the microbial biomass or released in gaseous form (Whalen, Parmelee & Subler 2000). Although we did not record any losses of N during our experiment, the fact that the earthworms were able to produce nitrates in peat is important for ecosystem functioning. Such inputs have recently been demonstrated to trigger the process of denitrification in the absence of vegetative cover in degraded peatlands (Francez *et al.* 2011). When size is taken into consideration, “large” earthworms secrete 1.5 times more N (1868 vs. $1237 \mu\text{g N.g}^{-1}$ of earthworm (fresh mass).day⁻¹) than “small” earthworms.

The stoichiometric S:C:N ratio of these transfers ($1:20:7 \pm 0:3:1$), shows that earthworms have a greater impact on S than on C and N in the environment. The observed S enrichment of the peat in the burrow-linings (drilosphere) would be due to the fact that most

transfers came from the mucus (S:C:N ratio of 1:67:12 \pm 0:10:3) rather than the tissues (1:196:42 \pm 0:9:3).

By calculating the flux on the scale of the individual and knowing the size structure and numbers of individuals in the active population of *L. rubellus* in the Baupte peatland, it was possible to determine the amounts of S, C and N of biogenic origin in the peat on the scale of the ecosystem. The estimated transfers ranged from 0.2 to 0.3 g.m⁻².year⁻¹ for S, 1.9 to 2.2 g.m⁻².year⁻¹ for C and 0.6 to 1.0 g.m⁻².year⁻¹ for N (with 10.5 individuals.m⁻² and a mean activity of 250 days). When we integrated the estimates of size structure of the population of *L. rubellus* observed in the Baupte peatland, where our individuals were sampled (31 % of “large” corresponding to classes *c-d-e-f* and 69 % of “small” belonging to classes *a-b*), these transfers were calculated to be 0.3 g of S.m⁻².year⁻¹, 6.6 g of C.m⁻².year⁻¹ and 2.0 g of N.m⁻².year⁻¹. These calculated transfer values are up to 3 times higher than those estimated in a population of average-sized *L. rubellus*. It would thus appear essential to take the size structure into account when evaluating the impact of the population in the recycling of S, C and N nutrients on the ecosystem scale.

In conclusion, this study was able to show that S exhibits much rapid turnovers than C and N. This work also made it possible to characterize the ecophysiological traits of *L. rubellus* in relation to the efficiency of S, C and N recycling in peat and to demonstrate its particularities in relation to other species, which also opens up interesting perspectives concerning the concept of lumbricid functional diversity. This epi-anecic earthworm, subjected to the environmental stochasticity characteristic of the upper layers of peat, possesses higher and more rapid regulatory capacities than anecic or endogeic species. Further studies are thus needed to more explore the relationship between taxonomic diversity and functional diversity in Lumbricids as model of ecosystem engineers. Earthworms are important organisms for the functioning of formerly exploited peatlands as they supply the peat with inputs of S, C and N nutrients essential to the support of microbial biogeochemical cycles and the productivity of these ecosystems generally poor in nutrients. Our study comforts the hypothesis that earthworms serve as relays for plant recolonization and a return to the “sink” function in abandoned peatlands.

Acknowledgements

This work was part of the ECCO-PNBC program funded by the INSU-CNRS institute and part of the ANR-VMC “Peatwarm” programme funded by the National Research Agency. It was supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research to A. Gicquel. We also thank Diana Warwick for her support in English editing.

References

- Bardgett, R.D., Freeman, C. & Ostle, N.J. (2008) Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *The ISME Journal*, **2**, 805-814.
- Barot, S., Ugolini, A. & Bekkal Brikci, F. (2007) Nutrient cycling efficiency explains the long-term effect of ecosystem engineers on primary production. *Functional Ecology*, **21**, 1-10.
- Binet, F. & Tréhen, P. (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**, 1501-1506.
- Binet, F., Fayolle, L. & Pussard, M. (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, **27**, 79-84.
- Bohlen, P.J., Parmelee, R.W. & Blair, J.M. (2004) Integrating the effects of earthworms on nutrient cycling across spatial and temporal scales. *Earthworm Ecology* (ed C.A. Edwards), pp. 161-180. CRC Press, Boca Raton.
- Bouché, M.B. (1972) Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. INRA (ed) Annales de Zoologie-Ecologie Animale, Paris, pp. 671.
- Bouché, M.B. (1977) Stratégies lombriciennes. *Soil Organisms as Components of Ecosystems* (eds U. Lohm & T. Persson), pp. 122-133. Ecological Bulletins, **25**, Stockholm, Sweden.
- Bouché, M.B. (1984) Une méthode de mesure du débit d'éléments dans un sol non perturbé : azote et carbone des lombriciens (Lumbricidæ, Annelida). *Pedobiologia*, **27**, 197-206.
- Brown, G.G., Barois, I. & Lavelle, P. (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology*, **36**, 177-198.
- Brown, G.G., Doube, B.M. (2004) Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. *Earthworm Ecology* (ed C.A. Edwards), pp. 213-239. CRC Press, Boca Raton.
- Byzova, J.B. (1965) Comparative rate of respiration in some earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, **2**, 207-216.
- Ceccotti, S.P., Messick, D.L. (1997) A global review of crop requirements, supply, and environmental impact on nutrient sulphur balance. *Sulphur metabolism in higher plants* (eds W.J. Cram, L.J. De Kok, I. Stulen, C. Brunold & H. Rennenberg), pp. 155-163. Backhuys, Leiden.
- Curry, J.P., Byrne, D. & Boyle, K.E. (1995) The earthworm population of a winter cereal field and its effects on soil and nitrogen turnover. *Biology and Fertility of Soils*, **19**, 166-172.

- Curry, J.P. & Schmidt, O. (2006) Long-term establishment of earthworm populations in grassland on reclaimed industrial cutaway peatland in Ireland. *Soil Biology and Biochemistry*, **57**, 65-70.
- Curry, J.P. & Schmidt, O. (2007) The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, **50**, 463-477.
- Dise, N.B. & Verry, E.S. (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry*, **53**, 143-160.
- Dyckmans, J., Scrimgeour, C.M. & Schmidt, O. (2005) A simple and rapid method for labelling earthworms with ^{15}N and ^{13}C . *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 989-993.
- Edwards, C.A. & Bohlen, P.J. (1996) Biology and ecology of earthworms. 3rd edn. Chapman and Hall, London.
- Francez, A.J. & Loiseau, P. (1999) Devenir de l'azote minéral dans une tourbière à *Sphagnum fallax* Klinggr. et *Carex rostrata* Stokes du Massif central (France). *Canadian Journal of Botany*, **77**, 1136-1143.
- Francez, A.J., Gogo, S. & Josselin, N. (2000) Distribution of potential CO_2 and CH_4 productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany (France). *European Journal of Soil Biology*, **36**, 161-168.
- Francez, A.J., Pinay, G., Josselin, N. & Williams, B.L. (2011) Denitrification triggered by nitrogen addition in *Sphagnum magellanicum* peat. *Biogeochemistry*, **106**, 435-441.
- Gicquel, A., Francez, A.J., Delhay, T., Gruau, G., Hallaire, V. & Binet, F. (2012) Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Biogeochemistry*, doi:10.1007/s10533-012-9714-3.
- Grethe, S., Schrader, S., Gieseemann, A., Larink, O. & Weigel, H.J. (1996) Influence of earthworms on the sulfur turnover in the soil. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **32**, 211-217.
- Heiner, B., Drapela, T., Frank, T. & Zaller, J.G. (2011) Stable isotope ^{15}N and ^{13}C labelling of different functional groups of earthworms and their casts: A tool for studying trophic links. *Pedobiologia*, **54**, 169-175.
- Hooper, D.U., Chapin, F.S. III, Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J. & Wardle, D.A. (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, **75**, 3-35.
- Jégou, D., Cluzeau, D., Hallaire, V., Balesdent, J. & Tréhen, P. (2000) Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *European Journal of Soil Biology*, **36**, 27-34.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. & Shachak, M. (1997) Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*, **78**, 1946-1957.
- Kattge, J., et al. (2011) TRY – a global database of plant traits. *Global Change Biology*, **17**, 2905-2935.
- Komulainen, V.M., Tuittila, E.S., Vasander, H. & Laine, J. (1999) Restoration of drained peatlands in southern Finland: initial effects on vegetation change and CO_2 balance. *Journal of Applied Ecology*, **36**, 634-648.
- Lavorel, S. & Garnier, E. (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**, 545-556.
- Le Bayon, R.C. & Binet, F. (2001) Earthworm surface casts affect soil erosion by runoff water and phosphorus transfer in a temperate maize crop. *Pedobiologia*, **45**, 430-442.

- Le Bayon, R.C. & Binet, F. (2006) Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 235–246.
- Makulec, G. (1993) Abundance and biomass of earthworms (Lumbricidae) in hydrogenous soils under various degree of mucking. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, **406**, 119-127.
- Martínez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S.A. & Gannes, L.Z. (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, **84**, 91-111.
- Mathot, M., Théliér-Huché, L. & Lambert, R. (2009) Sulphur and nitrogen content as sulphur deficiency indicator for grasses. *European Journal of Agronomy*, **30**, 172-176.
- Moore, T., Blodau, C., Turunen, J., Roulet, N. & Richard, P.J.H. (2005) Patterns of nitrogen and sulfur accumulation and retention in ombrotrophic bogs, eastern Canada. *Global Change Biology*, **11**, 356-367.
- Powlson, D.S. & Barraclough, D. (1993) Mineralization and assimilation in soil–plant systems. *Nitrogen isotope techniques* (eds R. Knowles & T.H. Blackburn), pp. 209–242. Academic Press Inc., San Diego, Calif.
- Raoul, F., Deplazes, P., Rieffel, D., Lambert, J.C. & Giraudoux, P. (2010) Predator dietary response to prey density variation and consequences for cestode transmission. *Oecologia*, **164**, 129-139.
- Satchell, J.E. (1980) ‘r’ worms and ‘K’ worms: a basis for classifying lumbricid earthworm strategies. Soil biology as related to land use practices (ed D.L. Dindal), pp. 848-854. Proc. 7th Intl Colloq, Soil Zool. Syracuse, Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Scheu, S. (1991) Mucus excretion and carbon turnover of endogeic earthworms. *Biology and Fertility of Soils*, **12**, 217-220.
- Schmidt, O., Scrimgeour, C.M. & Curry, J.P. (1999) Carbon and nitrogen stable isotopes ratios in body tissue and mucus of feeding and fasting earthworms (*Lumbricus festivus*). *Oecologia*, **118**, 9-15.
- Tiunov, A.V. (2007) Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies. *Biology Bulletin*, **34**, 395-407.
- Waddington, J.M., Strack, M. & Greenwood, M.J. (2010) Toward restoring the net carbon sink function of degraded peatlands: Short-term response in CO₂ exchange to ecosystem-scale restoration. *Journal of Geophysical Research*, **115**, G01008, doi:10.1029/2009JG001090.
- Ward, S.E., Bardgett, R.D., McNamara, N.P. & Ostle, N.J. (2009) Plant functional group identity influences short-term peatland ecosystem carbon flux: evidence from a plant removal experiment. *Functional Ecology*, **23**, 454-462.
- Whalen, J.K., Parmelee, R.W. & Subler, S. (2000) Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. *Biology and Fertility of Soils*, **32**, 347-352.
- Whalen, J.K. & Janzen, H.H. (2002) Labeling earthworms uniformly with ¹³C and ¹⁵N: implications for monitoring nutrient fluxes. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 1913-1918.
- Zhang, H. & Schrader, S. (1993) Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biology and Fertility of Soils*, **15**, 229-234.
- Zhang, Q.L. & Hendrix, P.F. (1995) Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) effects on carbon flux in soil. *Soil Science Society of America Journal*, **59**, 816-823.

3. Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry (article 2)

Aurélien Gicquel¹, André-Jean Francez¹, Thomas Delhay², Gérard Gruau³, Vincent Hallaire⁴ and Françoise Binet¹

¹UMR CNRS 6553 ECOBIO & Observatoire de Rennes OSUR, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

²Plateforme NanoSIMS de Rennes, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

³UMR CNRS 6118 Géosciences Rennes & Observatoire de Rennes OSUR, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

⁴UMR INRA 1069 SAS & Observatoire de Rennes OSUR, 65 rue de St-Brieuc, F-35042 Rennes Cedex, France

Biogeochemistry (published online 18 March 2012) doi:10.1007/s10533-012-9714-3

Abstract

Earthworm burrow-lining is a biophysical interface where the relationship between the spatial location of active soil microorganisms and the actual physical structure of the soil has a major influence on geochemical processes and nutrient cycling. Isotopic tracers and NanoSIMS were combined to highlight, at the nanometric scale, N and S transfers from earthworms to this non-structured biophysical interface. Peat mesocosms were inoculated with double labelled earthworms (^{15}N and ^{34}S ; *Lumbricus rubellus* H.) and then sampled for NanoSIMS quantitative measurements. The maximum enrichments of ^{15}N and ^{34}S detected in peat after 24 days were 1.6 and 5.6 APE (Atom % excess), respectively. NanoSIMS analyses, performed along a transect in peat at increasing distances from contact between the epidermis of an earthworm and its burrow-lining, revealed rapid and brief transfers of biogenic N and S into peat with two contrasted distributions i.e., decreasing ^{15}N and patchy ^{34}S . The sphere of influence of *L. rubellus* was clearly delimited after 24 days at 1 mm around the burrow, thus specifying the functional traits of this epi-anecic earthworm. The observed N inputs into peat were probably derived from oxidation of the labile products of earthworm metabolism, such as urea and/or ammonium, as shown by the strong linkage of ^{15}N with oxygen measured as ^{16}O . The transfers of labile S products from earthworm to the surrounding soil are reported here for the first time and could be derived from mucoprotein secretion. The interesting spatially inverse relationship between ^{15}N and ^{34}S enriched-spots at increasing distances from the burrow-lining highlighted different fates of the biogenic N and S compounds excreted by earthworms and could reveal the activities of syntrophic partnerships in N and S cycling. The strategy of combining isotopic tracers with NanoSIMS demonstrated high potential for determining the fate of biogenic nutrient inputs occurring in a complex matrix such as soil. It opens up considerable opportunities to link the biological traits of specific soil engineers with geochemical processes operating at the microbial scale in the spatial structure created by earthworms.

Keywords: Biophysical interface; Burrow-lining; *in situ* nutrients mapping; isotopic tracers; biogenic sulphur; NanoSIMS; *Lumbricus rubellus* H.

3.1. Introduction

Soil biodiversity is intimately involved in the association of ecosystem function and soil functioning (Schwartz et al. 2000; Swift et al. 2004) and plays a key role in sustaining ecosystem productivity as well as in maintaining environmental quality. Because ecosystem properties are strongly influenced by species functional characteristics, there is a need to link biological, functional and behavioral traits to assess the impacts of organisms on their environment (Hooper et al. 2005). In terrestrial ecosystems, plants and earthworms are major ecosystem engineers that are capable of bioturbation (Jones et al. 1997). By side-pushing, compacting or excavating soil components, they physically disturb the soil matrix and create specific biopores (Keudel and Schrader 1999). However, these two ecosystem engineers express different biological and functional traits. Plants are autotrophic organisms that play a critical role in soil carbon (C) dynamics through rhizodeposition: on average, 17% of the net carbon fixed by photosynthesis is converted into rhizodeposits (Nguyen 2003). Although earthworms also drive soil C dynamics by pulling dead organic litter into the soil (Binet and Curmi 1992; Jégou et al. 2000), they above all contribute to a large input of nitrogen (N) into the soil, by excreting urea and ammonium, due to their heterotrophic status for C (Binet and Tréhen 1992; Bohlen et al. 2004). Their role in driving sulphur (S) inputs into the soil, however, has not yet been evidenced. Although much attention in the literature has been paid to the functional traits of plants in an attempt to decipher their role in soil functioning (Garnier et al. 2007; Kattge et al. 2011), fine quantitative studies in heterotrophic soil organisms such as earthworms are comparatively scarce. Through the diversity of burrow morphology that they create (Brown et al. 2000) and the quantity of excretions (Bohlen et al. 2004), earthworms exhibit specific biological, functional and behavioral traits that need to be correlated in order to understand their impacts on their geochemical environment. In soil, biological pores are known to differ from the surrounding bulk soil in terms of porosity, nutrient content and oxygenation (Jégou et al. 2001) and therefore to sustain different microbial abundances and activities (Binet et al. 1998; Monard et al. 2008; Tiunov and Scheu 1999). It can therefore be hypothesized that these biopores constitute specific “hot spots” in soil in which the nutrient linkages (stoichiometry) and cycling dynamics of N and S (Grethe et al. 1996) would be different from other parts of the soil. Soil biopores, such as earthworm burrow-lining, represent a biophysical interface where the relationship between the spatial location of active soil microorganisms and the genuine physical structure of the soil has a

major influence on biological processes such as nutrient cycling (Herrmann et al. 2007a). Before recent advances in imaging techniques, our understanding was limited by the lack of suitable and reliable methods for locating, imaging, and quantifying the associated microbial processes that occur in burrow-linings on the sub-micrometre scale, i.e. bacterial scale (O'Donnell et al. 2007).

In this study, two powerful tools were combined to chemically reveal the biophysical interface of entire and non-destructed earthworm burrow-linings: i) isotopic tracers, which provide qualitative and quantitative information on the fate and cycling of nutrients at the ecosystem level (Bohlen et al. 2004; Tiunov 2007) and ii) nano-scale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS), a relatively new tool in soil science which provides information on the fine structure of intact biostructures at high mass resolution and, at the same time, maintains excellent signal transmission and high spatial resolution (150 to 200 nm) (Herrmann et al. 2007b). This combined approach has already proved suitable for imaging the differential partitioning of $^{15}\text{NH}_4^+$ between plant roots and native soil microbial communities (Clode et al. 2009) or for direct quantification of both $^{13}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{N}_2$ fixation at the single cell level of a cyanobacterial mat (Finzi-Hart et al. 2009). To advance our understanding of biogenic N and S transfers in soil and their possible linkage we performed double labelling (^{15}N and ^{34}S tracers), scanning electron microscopy (SEM) and NanoSIMS analyses, using as soil engineer model the epi-aneic earthworm *Lumbricus rubellus* H., that lives in cutover peat. As far as we know, this is the first study of N- and S- flow pathways operating at the nanometric scale at a non-destructed biophysical interface.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Earthworm labelling and mesocosm preparation

Earthworms (*Lumbricus rubellus* Hoffmeister) and peat samples were collected in a cutover peatland abandoned after exploitation (Baupte, France, 49° 16' 51.71" North; 1° 23' 30.15" West). The peat (pH = 5.4) was sieved (< 4 mm) and stored in a cool, dark room five days prior to experimentation. For isotopic labelling, the earthworms were fed on labelled peat amended with 6.7 g of ^{15}N -ammonium chloride / kg of dry peat ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ at 99 Atom % of ^{15}N ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, U.S.A.) and 1.2 g of elemental ^{34}S / kg of dry peat (elemental ^{34}S at 99 Atom %; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France) and supplied with 6.7 g of *Agrostis stolonifera* powder / kg of dry peat as additional food matter.

Ammonium rather than nitrate was used as N tracer to ensure better enrichment of the earthworms (Dyckmans et al. 2005) and microbial transformation of the N and S tracers was permitted during the pre-incubation week. Seven days later, single earthworms were placed in polycarbonate boxes (6 cm \varnothing \times 4 cm height) with 20 g of labelled peat in a climatic room for 16 days (Conviron GR96; day/night cycle: 16/8 hours; radiation of 10 to 150 μmol ; night temperature 10°C; day temperature 15°C; moisture = 70 \pm 5%). The elementary and stable isotope N-S ratios of earthworms and peat were obtained by Iso-Analytical Limited in the UK and measured by elemental analyser-isotope ratio mass spectrometry using a Europa Scientific Roboprep elemental analyser linked to a Europa Scientific 20-20 IRMS (Crewe, UK). An instrumental measurement precision of \pm 0.2 ‰ (at one standard deviation) is quoted by the laboratory. The EA-IRMS analysis confirmed the successful enrichment of earthworms (Table 1) and three labelled earthworms (1.01 \pm 0.07 g in fresh matter) were individually transferred into three unlabelled peat mesocosms (replicates A, B and C) compacted at the natural peat density (12 cm \varnothing \times 18 cm height, bulk density = 0.83 g.cm⁻³) for 24 days in the same climatic conditions as for earthworm labelling. Mineral water (Luchon, France; pH = 8; [HCO₃⁻] = 78.1 mg.L⁻¹; [SO₄²⁻] = 8.2 mg.L⁻¹; [NO₃⁻] = 1.8 mg.L⁻¹) was added to keep the water table level in the mesocosms constant throughout the experiment (at 15 cm depth). In addition, the first surface casts produced after earthworm inoculation were taken out of the unlabelled peat mesocosms to prevent any indirect contamination by labelled peat particles.

Table 1. C-N-S elementary and isotopic ¹⁵N and ³⁴S compositions of peat and earthworms prior and after labelling (Analysis by EA-IRMS; mean value \pm standard error; n = 4 for unlabelled and labelled peat, n = 9 for unlabelled earthworms tissue, n = 12 for labelled earthworms tissue; different small letters in the same column denote significant differences, *t*-tests with P < 0.05)

	% C	% N	% S	¹⁵ N Atom %	³⁴ S Atom %
Unlabelled peat	45.85 (\pm 0.19) ^a	2.02 (\pm 0.01) ^a	0.84 (\pm 0.01) ^a	0.38 (\pm 0.00) ^a	4.40 (\pm 0.00) ^a
Labelled peat	45.70 (\pm 0.07) ^a	2.17 (\pm 0.00) ^b	0.97 (\pm 0.01) ^b	6.92 (\pm 0.02) ^b	14.14 (\pm 1.87) ^b
Unlabelled earthworms	44.94 (\pm 0.50) ^a	11.00 (\pm 0.20) ^c	0.82 (\pm 0.02) ^a	0.37 (\pm 0.00) ^c	4.35 (\pm 0.00) ^c
Labelled earthworms	46.03 (\pm 0.33) ^a	10.94 (\pm 0.16) ^c	0.84 (\pm 0.03) ^a	2.02 (\pm 0.08) ^d	5.20 (\pm 0.04) ^d

3.2.2. Samples preparation for NanoSIMS analysis

Peat cores (9 × 6 × 5 cm) were sampled within the top 10 cm of the mesocosms and immediately fixed with 2 % glutaraldehyde in 0.1x PBS buffer. They were then progressively dehydrated after complete water–acetone exchanges and impregnated with a polyester resin (Crystic SR 17449). The peat cores from replicates A and B showed unoccupied burrows at the fixation time whereas the peat core from replicate C contained an earthworm. After localizing the earthworm burrows, sub-samples were prepared for NanoSIMS analysis as described by Herrmann et al. (2007a): samples were sawn into 2 mm thick slices 8 mm in diameter, polished by diamond paper, re-embedded in 10 mm diameter mounts and coated with 20 nm gold. Prior to NanoSIMS analysis, biophysical interfaces of interest were preselected by SEM (JEOL JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan) at 10 kV. SEM images were also used to select small areas in the peat in order to set up a transect at increasing distances from the burrow-linings or to select areas of intestinal epithelium (replicate C, Fig. 1).

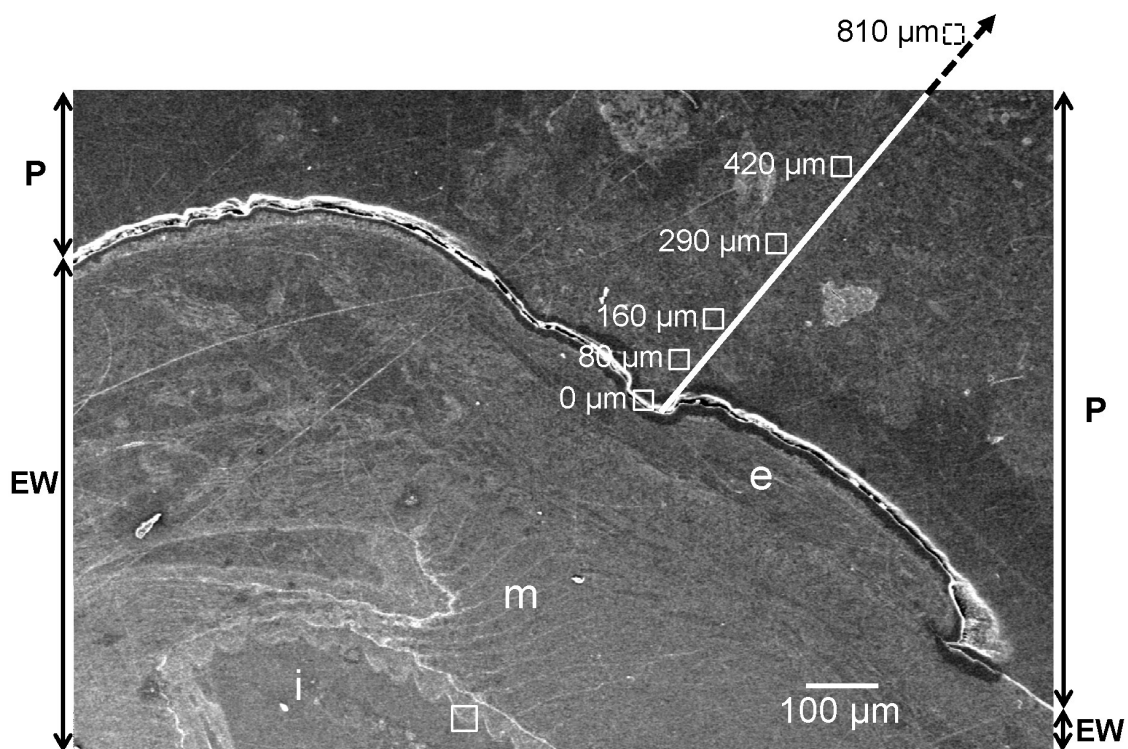


Figure 1. SEM image showing intestinal tract (i), muscle (m) and epidermis (e) of the earthworm (EW) within the peat (P) in sample C. The square in the intestinal tract represents the NanoSIMS area of the intestinal villus detailed in Figure 2. Arrow depicts the transect of NanoSIMS images at increasing distances from the burrow-lining and the six squares represent the six NanoSIMS analysis areas detailed in Figure 3

3.2.3. NanoSIMS analyses

A NanoSIMS-50 instrument (CAMECA, Gennevilliers, France) equipped with a caesium source (Cs^+) was used. The elements monitored were nitrogen (by detecting the CN^- cluster composed of $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ and $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$) and sulphur ($^{32}\text{S}^-$ and $^{34}\text{S}^-$). In addition, $^{16}\text{O}^-$ was monitored as a proxy for total oxygen (O) distribution to detect patterns of association with ^{15}N and ^{34}S , which might offer information about possible oxidation processes. During analysis, the Cs^+ probe size of about 120 nm in diameter allowed point-by-point scanning with a definition of 128×128 pixels (counting time = 50-80 ms per pixel) for areas of $15 \times 15 \mu\text{m}$, $30 \times 30 \mu\text{m}$ or $40 \times 40 \mu\text{m}$. High-mass resolution (5000 MRP) was used to resolve mass interferences on mass 26 ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$) and mass 27 ($^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$). Isotopic composition was determined by image processing using ImageJ software (1.45h version) and the NRIMS ImageJ Analysis module. The abundances of ^{15}N and ^{34}S in Atom % were determined with the following formulae (Li et al. 2008):

$$^{15}\text{N Abundance} = (^{12}\text{C}^{15}\text{N}) / (^{12}\text{C}^{14}\text{N} + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}) \times 100\%$$

$$^{34}\text{S Abundance} = (^{34}\text{S}) / (^{32}\text{S} + ^{34}\text{S}) \times 100\%$$

The resulting abundance distributions were displayed in 32-bit floating images after smoothing the images by applying a mean filter treatment with a radius of 1 pixel for each pixel. Linescans were generated with the function 'Plot Profile' after reducing the background noise of the isotopic distributions by applying a mean filter treatment, with a radius of 3 pixels for each pixel.

3.2.4. Image sampling and statistical analyses

Quantitative analyses were carried out on the three samples from replicates A, B and C, to determine the surface area and the Atom % of the ^{15}N enriched-spots detected in peat. As ^{34}S enriched-spots were only detected in sample C, quantitative analyses of ^{34}S were only carried out on this sample. In the calculations, isotopic enrichment is expressed in Atom % excess (APE), where APE is the difference in Atom % between the sample and the natural abundance level of ^{15}N and ^{34}S either in the control peat or in the control earthworm (Table 1).

Statistical analyses were carried out using the software *R* (2.12.0 version) and statistical significance was assigned for P -value < 0.05 in all analyses. The significance of the labelling effect and the differences between ^{15}N Atom % of spots in peat were assessed by *t*-tests. Spearman rank correlations were also calculated to determine the degree of relationship between ^{15}N and ^{34}S Atom % and $^{16}\text{O}^-$ distribution patterns in peat. Data are given as mean \pm standard error (S.E.).

3.3. Results

3.3.1. ^{15}N and ^{34}S earthworm labelling

The intestinal villus of earthworm showed high ^{15}N and ^{34}S enrichments with maximum levels at 5 and 20 Atom % respectively (Fig. 2) compared with the natural abundances in unlabelled earthworm tissues (0.37 and 4.35 Atom % respectively; Table 1), i.e. an APE of 4.6 and 15.7 respectively. The grainy area of the intestinal epithelium (e) was exclusively and uniformly labelled with ^{15}N whereas the smooth area of the intestinal mucosa (mu) was exclusively 'spot' labelled with ^{34}S . In addition, the statistical analyses of the linescans data (x to y Fig. 2B) showed a negative correlation between ^{15}N and ^{34}S abundances (Spearman test: $n = 495$, $r = -0.199$, $P < 0.001$; Fig. 2C), a positive correlation between ^{34}S abundance and $^{16}\text{O}^-$ distribution (Spearman test: $n = 495$, $r = 0.311$, $P < 0.001$; Fig. 2C), while no correlation was apparent between ^{15}N abundance and $^{16}\text{O}^-$ distribution (Spearman test: $n = 495$, $r = 0.075$, $P = 0.095$; Fig. 2C). No enrichment was visible in the intestinal lumen. Epidermal cells in contact with peat were also highly ^{15}N enriched (1.6 to 5.6 APE) but were not ^{34}S enriched (at 0 μm ; Fig. 3).

Overall, the NanoSIMS analyses showed that the N and S isotopic tracers were unevenly distributed in the earthworm, depending on the organ tissue, and were selectively assimilated in the entire earthworm with enrichments for ^{15}N and ^{34}S of 1.7 and 0.9 APE respectively (Table 1).

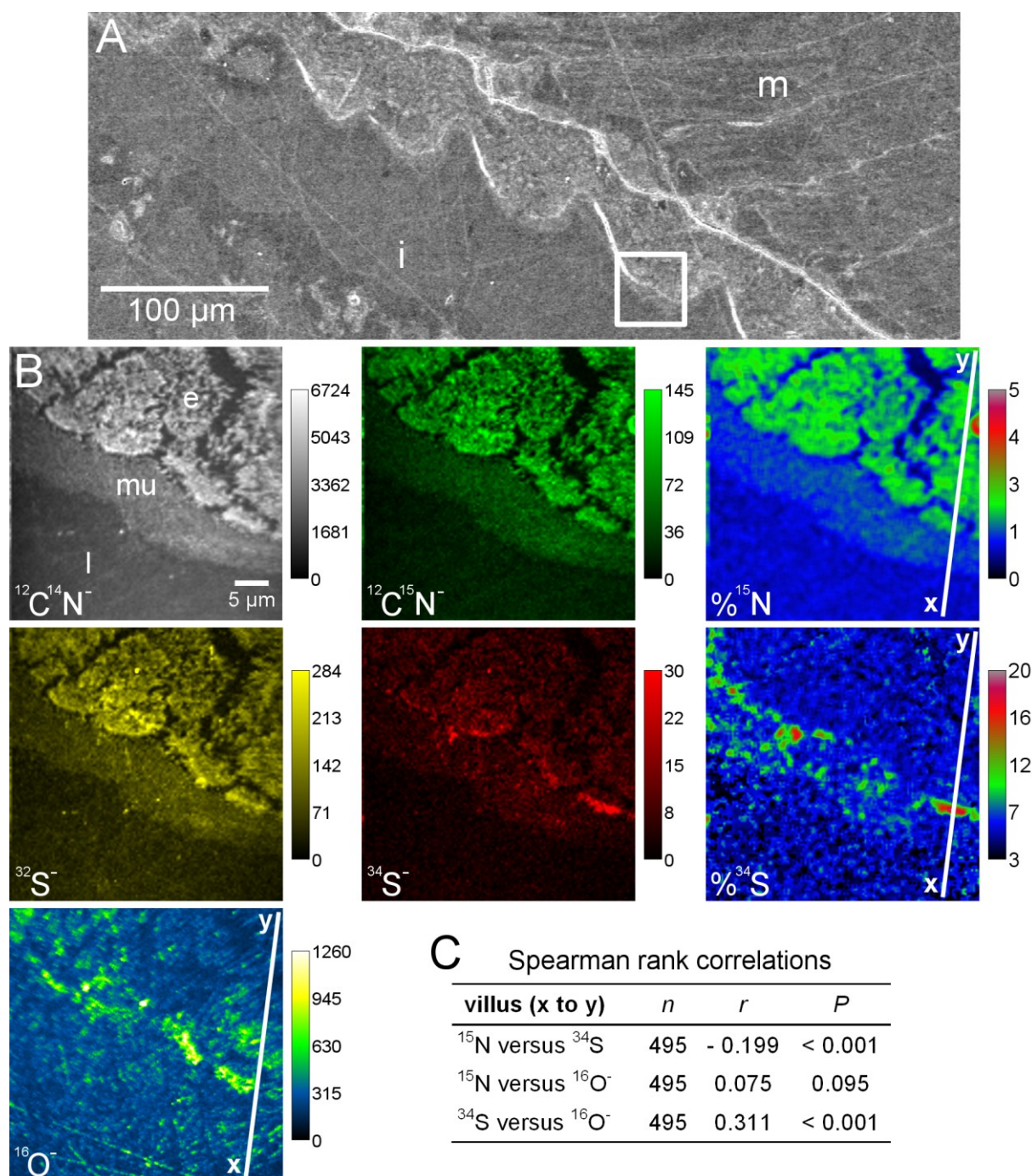


Figure 2. $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, $^{32}\text{S}^-$, $^{34}\text{S}^-$ and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images and ^{15}N and ^{34}S calculated isotopic images of the intestinal villus (B; e = intestinal epithelium; mu = intestinal mucus layer; l = intestinal lumen) of sample C depicted in Figure 1 (A; m = muscle; i = intestinal mucus tract). The colour scales of the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, $^{32}\text{S}^-$, $^{34}\text{S}^-$ and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images represent the counts per second (cps) measured by NanoSIMS and the colour scales of the ^{15}N and ^{34}S calculated isotopic images indicate the ^{15}N and ^{34}S Atom %, with natural abundance levels (no enrichment) represented as blue (0.37 % and 4.35 % respectively), changing to red with increasing ^{15}N and ^{34}S levels (5 % and 20 % respectively). Bar = 5 µm. (C) Spearman rank correlations of $^{16}\text{O}^-$, ^{15}N and ^{34}S abundance data corresponding to the linescans of the depicted lines of x to y

3.3.2. N transfers to peat

Burrow-linings in the three samples A, B and C presented ^{15}N enriched-spots in the surrounding peat (Fig. 4). The surface area of ^{15}N enriched-spots in sample C ($9.54 \pm 2.13 \mu\text{m}^2$) was significantly higher than that of samples A and B (3.47 ± 1.07 and $1.71 \pm 0.32 \mu\text{m}^2$) whereas the ^{15}N Atom % were of the same order of magnitude in all three samples (Table 2).

The transect from burrow-lining to bulk peat, that we set up in sample C (Fig. 3), highlighted a decrease of the ^{15}N enriched-spots with distance from the burrow interface. The maximum enrichment of ^{15}N detected in peat was 1.6 APE (at 80 and 160 μm), and no ^{15}N enriched-spots were detected beyond 1 mm. Analysis of the oxygen distribution at 0, 160, 290, 420 and 810 μm distance from the burrow-lining, revealed that $^{16}\text{O}^-$ was closely linked to ^{15}N (Spearman tests: $P < 0.05$; Fig. 5).

Table 2. Comparison of surface areas and isotopic measurements of ^{15}N enriched-spots in peat along burrow-linings depicted in Figure 4 (Analysis by NanoSIMS-50; mean value \pm standard error; $n = 7$ for A_1+A_2 and B_1+B_2 , $n = 23$ for C_1+C_2 ; different small letters in the same column denote significant differences, t -tests with $P < 0.05$)

Sample	Surface area of ^{15}N enriched spots / μm^2	Mean ^{15}N Atom %	Min. ^{15}N Atom %	Max. ^{15}N Atom %
A_1+A_2 Burrow 1	$3.47 (\pm 1.07)^a$	$0.74 (\pm 0.02)^a$	$0.56 (\pm 0.00)^a$	$1.00 (\pm 0.04)^a$
B_1+B_2 Burrow 2	$1.71 (\pm 0.32)^a$	$0.73 (\pm 0.03)^{ab}$	$0.54 (\pm 0.00)^b$	$1.01 (\pm 0.06)^a$
C_1+C_2 Burrow 3	$9.54 (\pm 2.13)^b$	$0.68 (\pm 0.02)^b$	$0.56 (\pm 0.01)^{ab}$	$0.83 (\pm 0.04)^b$

3.3.3. S transfers to peat

Peat in contact with epidermis was clearly ‘spot’ enriched with ^{34}S in sample C (up to 1.6 APE at 0 μm ; Fig. 3). The transect from burrow-lining to bulk peat, done on sample C (Fig. 3), highlighted the patchy distribution of these ^{34}S enriched-spots in peat. The maximum enrichment of ^{34}S detected in peat was 5.6 APE (at 80 and 290 μm), and no ^{34}S enriched-spots were detected beyond 1 mm. In contrast to the ^{15}N distribution, an inverse correlation between ^{34}S abundance and $^{16}\text{O}^-$ distribution was revealed over the entire transect from burrow-lining to bulk peat (Spearman tests: $P < 0.001$; Fig. 5).

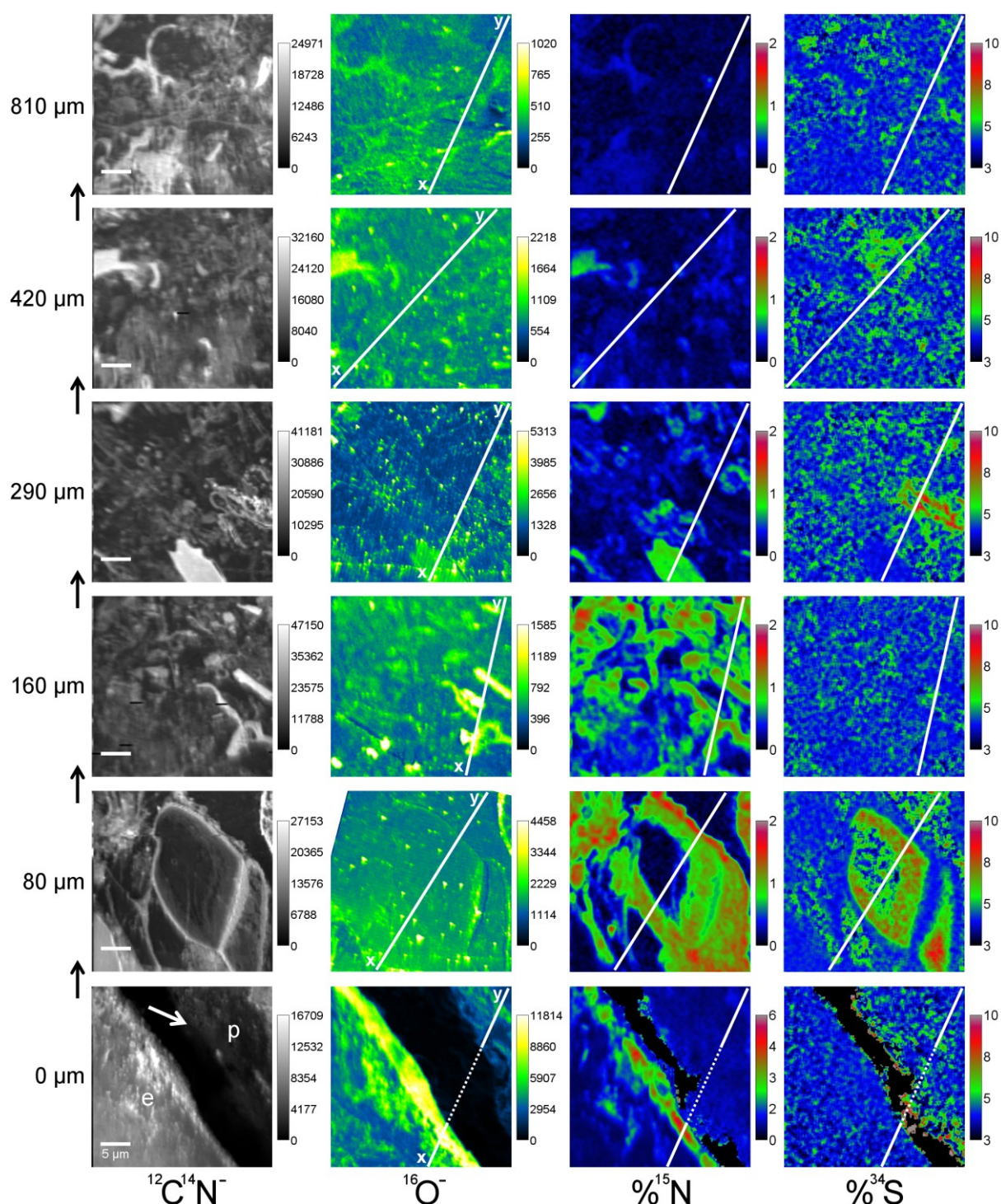
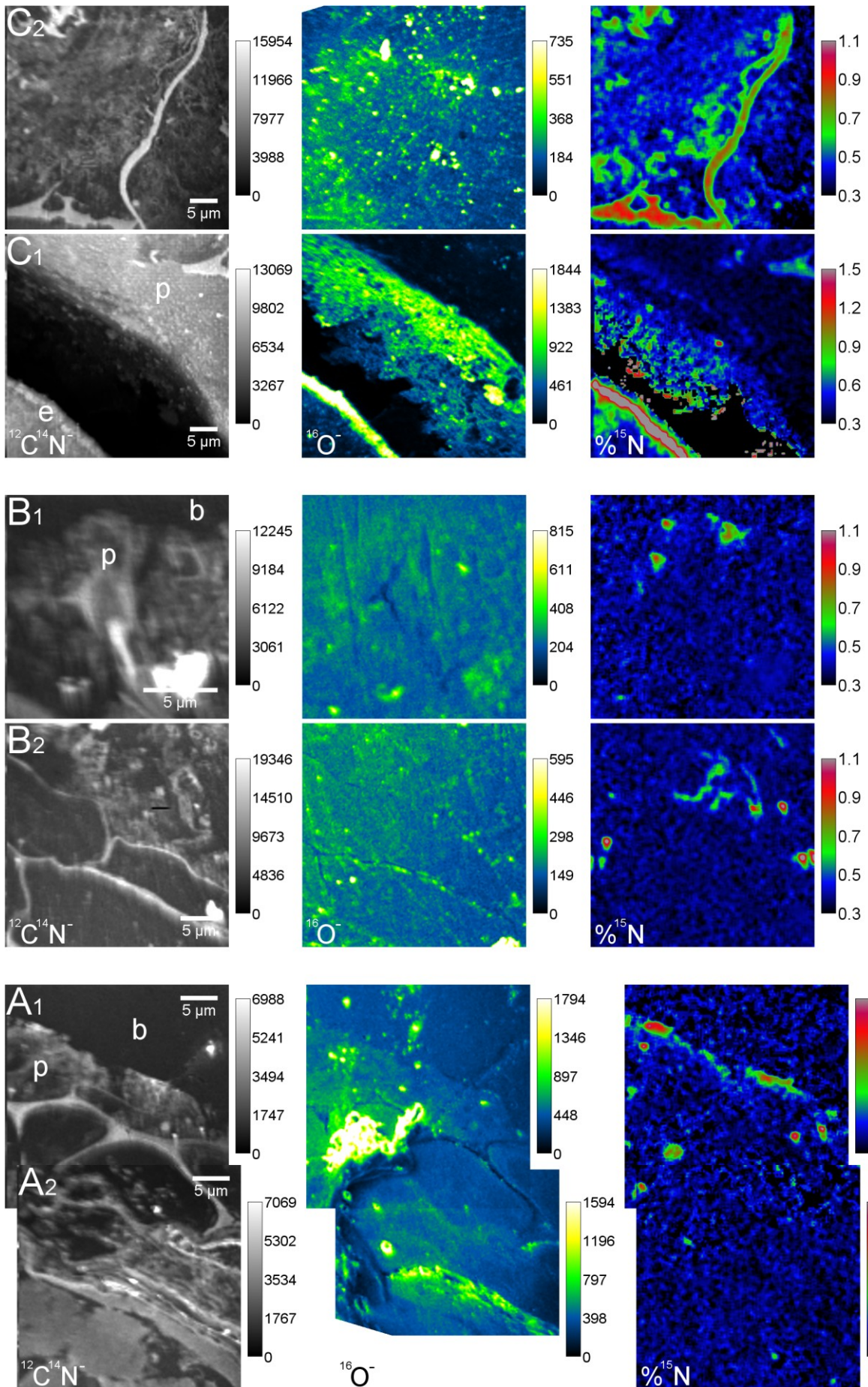


Figure 3. Series of $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ (“organic matrix”) and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images and ^{15}N and ^{34}S calculated isotopic images at increasing distances from the burrow-lining (0 μm = zone of contact (arrow); e = earthworm, p = peat) in sample C (Figure 1). The colour scales of the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images represent the counts per second (cps) measured by NanoSIMS and the colour scales of the ^{15}N and ^{34}S calculated isotopic images indicate the ^{15}N and ^{34}S Atom %, with natural abundance levels (no enrichment) represented as blue (0.38 % and 4.4 % respectively), changing to red with increasing ^{15}N and ^{34}S levels (2-6 % and 10 % respectively). Bars = 5 μm . Linescans data performed from x to y with each image are available in Figure 5. The $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, $^{32}\text{S}^-$ and $^{34}\text{S}^-$ isotopic images are not shown for easier reading



◀ **Figure 4.** $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ (“organic matrix”) and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images and ^{15}N calculated isotopic images of burrow-lining interfaces in the 3 mesocosms: A, B and C (C = sample presented in Figure 1). A_1 , B_1 and C_1 are images of the interface (0 μm) and A_2 , B_2 and C_2 are images of the zone 30 and 30 micrometers beneath the interface and 40 micrometers above the interface (b = pore burrow, e = epidermal cells, p = peat), respectively. The colour scales of the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ and $^{16}\text{O}^-$ isotopic images represent the counts per second (cps) measured by NanoSIMS and the colour scales of the ^{15}N calculated isotopic images indicate the ^{15}N Atom %, with natural abundance levels (no enrichment) represented as blue (0.38 %), changing to red with increasing ^{15}N (1.1-1.5 %). Bars = 5 μm . No $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ isotopic images are shown for easier reading

3.3.4. N and S linkage

As no significant transfer of labelled ^{34}S was detected in samples A and B, a detailed analysis of ^{15}N and ^{34}S linkage was only done on sample C. The peat close to the burrow-lining (at 0 and 80 μm ; Fig. 3) revealed a positive correlation between ^{15}N and ^{34}S abundances (Spearman tests: $P < 0.001$; Fig. 5). Beyond 80 μm (at 160, 290, 420 and 810 μm distance from the burrow-lining; Fig. 3), ^{15}N enriched-spots corresponded to poorly or non- ^{34}S enriched-spots and vice versa and there was a negative correlation between ^{15}N and ^{34}S abundances (Spearman tests: $P < 0.001$; Fig. 5).

3.4. Discussion

3.4.1. ^{15}N and ^{34}S earthworm labelling

The ^{15}N and ^{34}S highly enriched-spots in the intestinal villus (up to 4.6 and 15.7 APE respectively) highlighted the great capacity of this intestinal structure to absorb digested nutrients and thus to take up ^{15}N and ^{34}S enriched elements from the labelled peat (Fig. 2). The difference in enrichment between the ^{15}N labelled intestinal epithelium tissue and the ^{34}S labelled mucus layer could reveal a gradient of digestion and absorption from this hydrophilic intestinal mucus layer to cells and indicate that *L. rubellus* villi are more metabolically active for N compounds than for S compounds. The distribution patterns of ^{15}N and ^{34}S in this earthworm tissue corroborate the observations of Martínez del Rio et al. (2009) who explained that the rate at which animals incorporate the isotopic signal from their diets into their tissues can vary considerably due to differences in protein turnover and physiological conditions. We observed that ^{34}S occurred spatially with ^{16}O (Fig. 2C) but the kind of

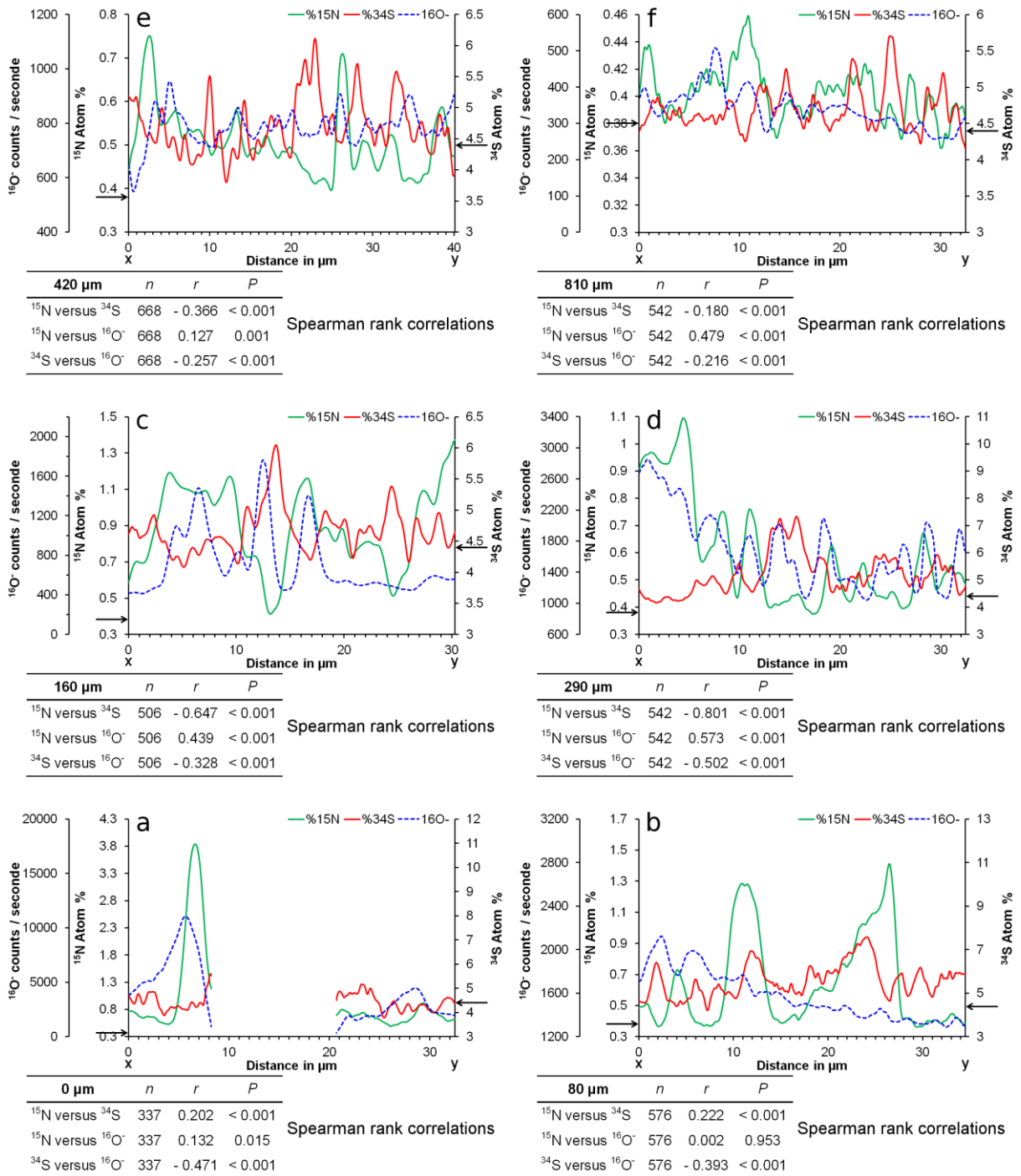


Figure 5. Linescans of ^{16}O , ^{15}N abundance and ^{34}S abundance data for the depicted lines from x to y for the 0 μm (a), 80 μm (b), 160 μm (c), 290 μm (d), 420 μm (e) and 810 μm (f) areas of Figure 3 and associated Spearman rank correlations. Arrows on y axis represent natural ^{15}N and ^{34}S abundances of the peat (0.38 % and 4.4 % respectively)

transformation operating during S transit into the earthworm could not be predicted. Further experiments are needed to decipher the linkage between these two elements in order to explain the observed correlations. Earthworm epidermal cells in contact with peat (at 0 μm ; Fig. 3), showed greater ^{15}N enrichment (1.6 to 5.6 APE) than earthworm muscle (natural abundance). The numerous ^{34}S enriched-spots observed close to the earthworm epidermis (at 0 μm ; Fig. 3) were too small ($\approx 1 \mu\text{m}$) to be attributed to setae ($\approx 30\text{-}60 \mu\text{m}$ in width and 150-200 μm in length), which are known to be composed of sulphur-rich keratin (Stork 1983).

Isotopic tracers combined with NanoSIMS allowed us to map differences in N and S distributions between earthworm organs and tissues (histology) and suitably complemented the more global labelling assessment of entire earthworms by EA-IRMS.

3.4.2. N transfers to peat

The earthworm was shown to produce significant ^{15}N enrichment in the peat in proximity to the burrow-lining and the various sizes of ^{15}N enriched-spots detected in the three samples suggest that the biogenic N inputs in peat soil engineered by an earthworm are spatially heterogeneous. Indeed, the ^{15}N enriched-spots decreased in numbers and size with the distance from the burrow interface and no ^{15}N labelling was detected beyond 1 mm. Hence, the influence of *Lumbricus rubellus* bioturbation after 24 days did not attain around 2 mm, in contrast to previous eyed-reports on other species in agroecosystem and forest soils (Bouché 1975; Monard et al. 2008; Parkin and Berry 1999; Tiunov and Scheu, 1999). Thus, it would be interesting to compare the extent of the drilosphere of other earthworm species in order to discriminate their particular biological and functional traits. The maximum enrichment of ^{15}N detected in peat was 1.6 APE. These observed N inputs into peat are probably derived from labile products of earthworm metabolism, such as urea and/or ammonium, as demonstrated in other soil types (Edwards and Bohlen 1996; Whalen et al. 2000). The close occurrence of ^{15}N with $^{16}\text{O}^-$ (Fig. 5) might reflect a rapid oxidation of biogenic N inputs by nitrification operating in the drilosphere, as first suggested by Binet and Tréhen (1992) using ^{15}N on *L. terrestris* or more recently, in the soil surrounding nest of termites (Ji and Brune 2006).

3.4.3. S transfers to peat

Quantitative analyses of ^{34}S transfers could only be carried out on sample C (which contained an earthworm). The maximum enrichment of ^{34}S detected in peat was 5.6 APE. These observed ^{34}S enriched-spots exhibited a patchy distributed in peat and cannot be related to residual contamination by elemental ^{34}S particles brought in by the earthworm because their enrichments ($\approx 10\text{-}20$ Atom %) were considerably lower than the elemental ^{34}S added to peat (99 Atom %). As the ^{34}S enriched-spots close to the earthworm epidermal cells could not correspond to setae, they probably corresponded to diffuse inputs of a labile form of S. This labile form of S that entered the peat, until 1 mm from the burrow-lining, might be derived from the secretion of sulphur-enriched mucoprotein by the earthworm's body surface, but we were unable to verify this hypothesis here. However, the observed discordance between ^{34}S abundance and ^{16}O distribution (Fig. 5), in contrast to the ^{15}N distribution, may be consistent with an organic origin of enriched ^{34}S -compounds in the drilosphere of *Lumbricus rubellus*. Further analyses of the level of oxidation of S compounds are necessary to ascertain the form of these enriched ^{34}S -compounds. Our present study provides additional information about the fate of biogenic S in soil and suitably complements the work of Grethe et al. (1996) who reported that feeding activity of *L. terrestris* and *A. caliginosa* increased total S-content and changed $\delta^{34}\text{S}$ -values in soil engineered by these species.

3.4.4. N and S linkage

Of particular interest is the spatially inverse relationship between ^{15}N and ^{34}S enriched-spots that was clearly visible in the peat over 160 μm distance from the burrow-lining but not in proximity to the source of labelling, i.e. the earthworm (Fig. 3). The ^{15}N enriched-spots corresponded to poorly or non- ^{34}S enriched-spots and vice versa at 160, 290, 420 and 810 μm distance from the burrow-lining. Negative correlations between ^{15}N and ^{34}S abundances at the peat interface influenced by the earthworms could be explained by the activity of syntrophic microbial communities involved in both N and S cycling. As reported in the literature, at a larger scale than the nanometric one, the physical disturbance of the surrounding soil created by the earthworm as it builds up its burrows, can result in a spatially heterogeneous distribution of soil compounds, such as organic matter as well as nutrient contents (Binet and Curmi 1992; Jégou et al. 2001). However in the present study, the fact that the spatial

discordance between N and S was repeatedly observed (e.g., significant spatially inverse relationship based on several linescans, Fig. 5) in the peat around the burrow-lining but not inside it, strongly suggests that the biogenic N and S inputs are later processed and transformed by syntrophic microbial communities in peat. The physical heterogeneity and abiotic conditions of the soil generated by earthworm bioturbation was shown to sustain numerous and diverse microbial activities (Furlong et al. 2002; Monard et al. 2011). For instance, bacteria such as *Thiobacillus denitrificans* can oxidize sulphur compounds using NO_3^- and release N_2 in the absence of O_2 (Paul and Clark 1996). Further experiments are needed to confirm the existence of hot spots of microbial activities generated by biogenic N and S inputs. However, our assumption is consistent with another recent study using a SIMS approach that has proved the existence of a spatially inverse relationship between ^{13}C and ^{15}N nutrients due to microbial activities. This was demonstrated in deep-sea sediments by Pernthaler et al. (2008) and Dekas et al. (2009) who showed that the greatest ^{15}N incorporation in an archaeal-bacterial consortium corresponded to the light $\delta^{13}\text{C}$ core of methane-oxidizing archaea.

The link between ^{15}N and ^{34}S abundances observed in the peat in the proximity of the burrow-lining (at 0 and 80 μm ; Fig. 3) suggests recent and simultaneous transfers of ^{15}N and ^{34}S through earthworm excretion. It cannot be excluded, particularly in sample C, that the earthworm suffered stress during the chemical fixation of the peat core which led to a rapid release of ^{15}N and/or ^{34}S labile products in the first micrometers of the peat.

In conclusion, the strategy of combining isotopic tracers with NanoSIMS analysis showed high potential for *in situ* mapping of biogenic nutrient transfers into a complex matrix such as soil. It also opens up considerable opportunities to spatially link the physical structure created by soil engineers with their specific biological traits, and subsequently to gain insight into the microbial and biogeochemical processes operating at the nanometric scale. Of particular interest is the spatial discordance between ^{15}N and ^{34}S enriched-spots in the peat that occurred at increasing distances from the burrow-lining. This would indicate the extent to which bacterial communities and biogeochemical activities within the ecosystem are spatially driven by the soil engineers.

Acknowledgements

This work was part of the ECCO-PNBC Programme funded by the INSU-CNRS and the ANR-VMC ‘Peatwarm’ Programme funded by the Agence Nationale de la Recherche – Vulnérabilité Milieu Climat. We thank the Région Bretagne, the Conseil Général d’Ille-et-Vilaine and Rennes Métropole for financial support of the imaging platform ONIS (GIS Europa). We also thank Yannick Bénard, Xavier Le Coz and Joseph Le Lannic for their technical assistance and Diana Warwick for English editing. We are also grateful to the anonymous reviewers for their constructive comments on an earlier version of the manuscript.

References

- Binet F, Curmi P (1992) Structural effects of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on the soil-organic matter system: Micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol Biochem* 24:1519-1523
- Binet F, Tréhen P (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biol Biochem* 24:1501-1506
- Binet F, Fayolle L, Pussard M (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biol Fert Soils* 27:79-84
- Bohlen PJ, Parmelee RW, Blair JM (2004) Integrating the effects of earthworms on nutrient cycling across spatial and temporal scales. In: Edwards CA (ed) *Earthworm Ecology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 161-180
- Bouché MB (1975) Action de la faune sur les états de la matière organique dans les écosystèmes. In: Kilbertus G, Reisinger O, Mourey A, Cancela da Fonseca JA (eds) *Humification et Biodégradation*. Pierron, France, pp 157-168
- Brown GG, Barois I, Lavelle P (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol* 36:177–198
- Clode PL, Kilburn MR, Jones DL, Stockdale EA, Cliff JB, Herrmann AM, Murphy DV (2009) *In situ* mapping of nutrient uptake in the rhizosphere using nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol* 151:1751-1757
- Dekas AE, Poretsky RS, Orphan VJ (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* 326:422-426
- Dyckmans J, Scrimgeour CM, Schmidt O (2005) A simple and rapid method for labelling earthworms with ¹⁵N and ¹³C. *Soil Biol Biochem* 37:989-993
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) *Biology and ecology of earthworms*. 3rd edn. Chapman and Hall, London
- Finzi-Hart JA, Pett-Ridge J, Weber PK, Popa R, Fallon SJ, Gunderson T, Hutcheon ID, Neelson KH, Capone DG (2009) Fixation and fate of C and N in the cyanobacterium *Trichodesmium* using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA* 106:6345-6350

- Furlong MA, Singleton DR, Coleman DC, Whitman WB (2002) Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl Environ Microbiol* 68:1265–1279
- Garnier E, et al. (2007) Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: a standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Ann Bot-London* 99:967–985
- Grethe S, Schrader S, Giesemann A, Larink O, Weigel HJ (1996) Influence of earthworms on the sulfur turnover in the soil. *Isot Environ Health S* 32:211-217
- Herrmann AM, Clode PL, Fletcher IR, Nunan N, Clode PL, Stockdale EA, O'Donnell AG, Murphy DV (2007a) A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 21:29-34
- Herrmann AM, Ritz K, Nunan N, Clode PL, Pett-Ridge J, Kilburn MR, Murphy DV, O'Donnell AG, Stockdale EA (2007b) Nano-scale secondary ion mass spectrometry – A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biol Biochem* 39:1835-1850
- Hooper DU, Chapin FS III, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75:3-35
- Jégou D, Cluzeau D, Hallaire V, Balesdent J, Tréhen P (2000) Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *Eur J Soil Biol* 36:27-34
- Jégou D, Schrader S, Diestel H, Cluzeau D (2001) Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. *Appl Soil Ecol* 17:165-174
- Ji R, Brune A (2006) Nitrogen mineralization, ammonia accumulation, and emission of gaseous NH₃ by soil feeding-termites. *Biogeochemistry* 78:267-283
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1997) Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78:1946-1957
- Kattge J, et al. (2011) TRY – a global database of plant traits. *Glob Change Biol* 17:2905-2935
- Keudel M, Schrader S (1999) Axial and radial pressure exerted by earthworms of different ecological groups. *Biol Fert Soils* 29:262–269
- Li T, Wu TD, Mazéas L, Toffin L, Guerquin-Kern JL, Leblon G, Bouchez T (2008) Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ Microbiol* 10:580-588
- Martínez del Rio C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84:91-111
- Monard C, Martin-Laurent F, Vecchiato C, Francez AJ, Vandenkoornhuyse P, Binet F (2008) Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biol Biochem* 40:2253-2259
- Monard C, Vandenkoornhuyse P, Le Bot B, Binet F (2011) Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME J* 5:1048-1056
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375-396
- O'Donnell AG, Young IM, Rushton SP, Shirley MD, Crawford JW (2007) Visualization, modelling and prediction in soil microbiology. *Nat Rev Microbiol* 5:689-699

-
- Parkin TB, Berry EC (1999) Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biol Biochem* 31:1765-1771
- Paul EA, Clark FE (1996) Sulfur transformations in soil. In: Paul EA, Clark FE (eds) *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp 300-312
- Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T, Orphan VJ (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *P Natl Acad Sci USA* 105:7052-7057
- Schwartz MW, Brigham CA, Hoeksema JD, Lyons KG, Mills MH, van Mantgem PJ (2000) Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia* 122:297-305
- Stork NE (1983) A comparison of the adhesive setae on the feet of lizards and arthropods. *J Nat Hist* 17:829-836
- Swift MJ, Izac A-MN, van Noordwijk (2004) Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes – are we asking the right questions? *Agr Ecosyst and Environ* 104:113-134
- Tiunov AV, Scheu S (1999) Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol Biochem* 31:2039-2048
- Tiunov AV (2007) Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies. *Biol Bull* 34:395-407
- Whalen JK, Parmelee RW, Subler S (2000) Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. *Biol Fertil Soils* 32:347-352

CHAPITRE IV

Rôle des interactions entre organismes ingénieurs sur les transferts C-N-S dans une tourbière en régénération après exploitation

1. Synopsis

L'exploitation des tourbières se traduit par une profonde transformation du fonctionnement liée au drainage, qui provoque une oxygénation de la tourbe et une activation de la dégradation microbienne (fonctionnement « source » de C). Le retour à un fonctionnement « puits » de C des tourbières abandonnées après exploitation est possible sous réserve de restaurer le fonctionnement hydrologique de l'écosystème. Dans ce cas, certaines plantes pionnières comme les linaigrettes (*Eriophorum spp*) colonisent rapidement les surfaces de tourbe ré-humectée et contribuent à la régénération de la fonction d'accumulation de tourbe. Des vers de terre, comme l'espèce épi-anécique *Lumbricus rubellus*, peuvent également coloniser les tourbières anciennement exploitées. Ces deux organismes « ingénieurs d'écosystèmes » se distinguent par l'expression de traits biologiques et fonctionnels différents : la plante joue un rôle de pourvoyeur de C dans l'activité biologique du sol alors que le ver de terre contribue avant tout à un apport important de N dans le milieu, essentiellement sous forme d'urée et d'ammonium.

Ce chapitre IV présenté sous forme d'article (article 3) et intitulé « Rôle des interactions entre organismes ingénieurs sur les transferts C-N-S dans une tourbière en régénération après exploitation », s'intéresse à identifier les interactions biotiques majeures mises en jeu dans des systèmes macroorganismes/tourbe. Nous nous sommes appuyés sur un dispositif expérimental en conditions contrôlées (mésocosmes). Les marqueurs isotopiques ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S ont été utilisés pour suivre de façon quantitative, sur des durées de 3 et 18 jours, les transferts C-N-S au niveau des sphères fonctionnelles de ces deux organismes, mais également entre organismes ingénieurs.

Les résultats obtenus démontrent que les deux organismes ingénieurs contribuent à des apports de C, d'N et de S dans la tourbe. Les rapports stœchiométriques C:N:S de la rhizosphère et de la drilosphère confortent notre hypothèse selon laquelle les plantes ont un plus grand impact sur la dynamique du C de la tourbe que les vers de terre, qui eux contribuent avant tout à des enrichissements en S du milieu. Des transferts en C, N et S ont également été mesurés entre les deux organismes ingénieurs, ce qui témoigne de la rapidité des interactions biotiques mises en jeu dans l'écosystème. Nous démontrons pour la première fois, à notre connaissance, que la présence conjointe de ces deux organismes ingénieurs permet d'améliorer leurs turnovers en C, N et S. Les vers de terre sont des organismes importants pour le fonctionnement des tourbières anciennement exploitées car ils fournissent

à la tourbe des apports en nutriments carbonés, azotés et soufrés, essentiels au soutien des cycles biogéochimiques microbiens et à la productivité de ces écosystèmes généralement pauvres en nutriments. En retour, *E. angustifolium* améliore le turnover en N de *L. rubellus*. Ainsi, notre étude conforte l'hypothèse selon laquelle les vers de terre constituent des relais à la recolonisation végétale et au processus de retour à un fonctionnement « puits » des tourbières anciennement exploitées.

2. Rôle des interactions entre organismes ingénieurs sur les transferts C-N-S dans une tourbière en régénération après exploitation (article 3)

Aurélien Gicquel¹, Françoise Binet¹, Servane Lemauviel-Lavenant²,
Nathalie Le Bris-Josselin¹, Marie-Paule Briand¹ et André-Jean Francez¹

¹UMR CNRS 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

²UMR INRA 950 EVA, Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen Cedex, France

2.1. Introduction

Les tourbières sont des écosystèmes qui accumulent naturellement de la matière organique sous forme de tourbe (Clymo 1983). Elles fonctionnent comme des systèmes « puits » pour les éléments tels que le carbone (C) et l'azote (N), en raison d'une production nette supérieure à la décomposition de la MO par les microorganismes. Cependant, l'exploitation des tourbières se traduit par une profonde transformation du fonctionnement liée au drainage, qui provoque une oxygénation de la tourbe et une activation de la dégradation microbienne (Francez *et al.* 2000 ; Bardgett *et al.* 2008). La minéralisation ainsi amplifiée se traduit par une augmentation importante du dégagement de CO₂ dans l'atmosphère (Petronne *et al.* 2001 ; Waddington *et al.* 2002 ; Waddington *et al.* 2010). Le processus de régénération du milieu favorisant à terme le retour à un fonctionnement « puits », peut être initié par *Eriophorum angustifolium* Honck, une plante typique de tourbières qui colonise les surfaces de tourbe ré-humectée (Komulainen *et al.* 1999 ; Waddington *et al.* 2010). *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, qui est un ver de terre épi-aneceique typique de sols organiques, se développe également dans ce type de tourbe (Makulec 1993, Curry et Schmidt 2006 ; Gicquel *et al.* 2012). Ces deux organismes, par leur impact sur la structure physique de la tourbe et leur rôle dans la redistribution des nutriments du milieu, constituent des ingénieurs d'écosystèmes (Jones *et al.* 1994 ; Jones *et al.* 1997).

Les vers de terre constituent la composante dominante de la faune des sols tempérés (Lavelle *et al.* 1998). Ils modifient les disponibilités et les formes des nutriments en créant des biostructures (turricules et galeries) qui sont autant d'« hot spots » d'activité microbienne (Binet *et al.* 1998 ; Brown *et al.* 2000). La rhizosphère des plantes correspond elle aussi à un volume de sol où il y a une forte activité microbienne en raison de la libération continue de molécules organiques (ou rhizodépôts) au niveau des racines (Lynch et Whipps 1990 ; Joergensen 2000). Les vers de terre par leurs réseaux de galeries ou les plantes via leurs pores racinaires, modifient l'hydrologie du système et son fonctionnement biogéochimique. En effet, les macropores créés sont des voies préférentielles d'infiltration d'eau et d'échanges de gaz (Edwards et Shipitalo 1998). Ils peuvent favoriser le lessivage de nitrates (NO₃⁻) et de DOC (Edwards *et al.* 1989) ou l'adsorption sur leurs parois de molécules comme l'atrazine (Binet *et al.* 2006). Ainsi, ces zones de sol sous influence biologique, que l'on appelle sphères fonctionnelles (drilosphère pour les lombriciens et rhizosphère pour les végétaux), constituent des milieux favorables à des échanges de nutriments vers le reste du système moins riche.

Les propriétés des écosystèmes sont fortement influencées par les traits des espèces qu'ils abritent. Il est donc nécessaire de différencier et évaluer les traits biologiques et fonctionnels des organismes afin de démêler leur rôle dans le fonctionnement de l'écosystème (Hooper *et al.* 2005). Les deux ingénieurs d'écosystèmes que sont la plante et le ver de terre, se distinguent par l'expression de traits biologiques et fonctionnels différents. Les plantes sont des organismes autotrophes qui jouent un rôle majeur dans la dynamique du C du sol à travers la rhizodéposition : en moyenne, 17 % du C fixé par photosynthèse est convertie en rhizodépôts (Nguyen 2003). Bien que les vers de terre peuvent également agir sur la dynamique du C en enfouissant de la MO en profondeur (Binet et Curmi 1992 ; Jégou *et al.* 2000), leur statut hétérotrophe contribue avant tout à un apport important de N dans le sol via l'excrétion d'urée et d'ammonium (Binet et Tréhen 1992 ; Bohlen *et al.* 2004). Si de nombreuses études se sont intéressées aux traits biologiques et fonctionnels des plantes (Garnier *et al.* 2007 ; Kattge *et al.* 2011), elles sont comparativement peu étudiées pour les organismes hétérotrophes du sol comme les vers de terre (Gicquel *et al.* 2012).

De nombreuses études ont tenté de quantifier les transferts de C et N d'un organisme ingénieur vers l'ensemble du système (Binet et Tréhen 1992 ; Curry *et al.* 1995 ; Ostle *et al.* 2003 ; Bazot *et al.* 2007), mais également entre individus bioturbateurs autotrophes et hétérotrophes (Whalen *et al.* 1999). De l'ordre de quelques jours, ces interactions permettent un turnover rapide des nutriments dans l'écosystème. Les études sont plus rares pour les sols organiques de tourbières et quasi-inexistants pour le soufre (S) qui est un élément important dans le fonctionnement de l'écosystème tourbière, de par les quantités importantes séquestrées dans la tourbe, son contrôle sur les flux de C comme l'émission de méthane (Dise et Verry 2001) ou sa dynamique couplée à l'N (Moore *et al.* 2005). Des travaux récents suggèrent également que le S labile sécrété par *L. rubellus* pourrait être transformé par les communautés microbiennes de la tourbe (Gicquel *et al.* 2012). En définitive, il paraît donc important de coupler l'étude des transferts de C, d'N et de S pour caractériser les interactions biotiques majeures préexistantes dans la tourbière et qui pourraient être impliquées dans le fonctionnement de régénération de tourbières abandonnées après exploitation.

Le but de cette étude, a été d'identifier les interactions biotiques majeures mises en jeu dans des systèmes macroorganismes/tourbe, caractéristiques de jeunes stades de régénération de tourbière abandonnée après exploitation. Ces jeunes systèmes en régénération, par leur relative simplicité comparés à un système exploité, doivent permettre de quantifier le rôle écologique et l'expression des traits fonctionnels des deux types d'organismes ingénieurs que

sont la plante colonisatrice (*E. angustifolium*) et le ver de terre (*L. rubellus*) sur le fonctionnement de l'écosystème tourbière. Nous faisons l'hypothèse que la plante par son statut autotrophe a un impact plus important sur la dynamique du C de la tourbe, contrairement au ver de terre qui doit lui contribuer avant tout à des apports de N et S dans le milieu. Nous émettons aussi l'hypothèse que ces deux organismes mettent en place des échanges de nutriments C, N et S via leurs sphères fonctionnelles. Ces interactions biotiques doivent ainsi améliorer l'efficacité du recyclage des nutriments (turnover) et soutenir la productivité de l'écosystème, et donc favoriser à terme un retour plus rapide à la fonction « puits » des tourbières anciennement exploitées. Pour répondre à ces objectifs, nous nous sommes appuyés sur un dispositif expérimental en conditions contrôlées. Sont utilisés conjointement les marqueurs isotopiques du carbone (^{13}C), de l'azote (^{15}N) et du soufre (^{34}S), pour suivre de façon quantitative les transferts C-N-S dans des mésocosmes de tourbe soumis à bioturbation, après un temps de contact de 3 et 18 jours entre des organismes marqués (sources) et non marqués (récepteurs).

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Matériels d'étude

L'ensemble du matériel d'étude provient de la tourbière de Baupré (Manche, 49° 16' 51.71" Nord ; 1° 23' 30.15" Ouest) qui a été exploitée intensivement de la fin de la Seconde Guerre mondiale à 1995. A cette date une partie du site a été partiellement remise en eau pour favoriser la régénération de la tourbière. Les plantes, les vers de terre et la tourbe ont été récoltés dans un secteur de tourbière abandonnée après exploitation de tourbe, actuellement en jeune phase de recolonisation par la végétation. Les *E. angustifolium* correspondent à des plantes jeunes typiques de cette phase de relance. Après culture en chambre de marquage, leur biomasse était de 5.26 ± 0.23 g (moyenne \pm S.E. en masse fraîche ; $n = 68$). Les vers de terre *L. rubellus* ont été prélevés par la méthode au formaldéhyde sur des carrés de 1 m². Trois classes de tailles ont été sélectionnées : classe $a = 0.85 \pm 0.01$ g, classe $b = 1.03 \pm 0.01$ g et classe $c = 1.20 \pm 0.01$ g (moyennes \pm S.E. en masses fraîches, $n = 39$ pour chaque classe).

La tourbe récoltée (pH = 5.4 et taux d'humidité de 85 %) a été tamisée à 4 mm puis stockée à 15°C à l'abri de la lumière pendant 1 semaine avant le début de l'expérimentation. La composition élémentaire C, N et S et les rapports stœchiométriques des plantes, des vers de terre et de la tourbe sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Comparaisons des compositions élémentaires C-N-S et des rapports stœchiométriques de la tourbe, des plantes et des vers de terre de Bauppte (Analyses par EA-IRMS ; moyennes \pm S.E. ; $n = 4$ pour la tourbe, $n = 6$ pour les plantes (aérien et racines) et $n = 9$ pour les vers de terre ; les différences significatives au sein d'une même colonne sont indiquées par des petites lettres, tests t avec $P < 0.05$)

Echantillons	% C	% N	% S	C:N	C:S	N:S	C:N:S
tourbe	45.9 (± 0.2) ^a	2.0 (± 0.0) ^a	0.8 (± 0.0) ^a	26.5 (± 0.1) ^a	145.6 (± 2.3) ^a	5.5 (± 0.1) ^a	146:5:1 ($\pm 2:0:0$)
<i>E. angustifolium</i> (aérien)	42.3 (± 0.2) ^b	1.7 (± 0.1) ^b	0.2 (± 0.0) ^b	29.0 (± 1.8) ^a	517.8 (± 78.5) ^b	17.8 (± 2.3) ^b	518:18:1 ($\pm 79:2:0$)
<i>E. angustifolium</i> (racines)	45.4 (± 2.7) ^{abc}	1.8 (± 0.2) ^{ab}	0.3 (± 0.0) ^b	30.7 (± 3.9) ^a	482.0 (± 79.6) ^b	15.5 (± 0.7) ^b	482:16:1 ($\pm 80:1:0$)
<i>L. rubellus</i>	45.0 (± 0.5) ^{ac}	11.0 (± 0.2) ^c	0.8 (± 0.0) ^a	4.8 (± 0.1) ^b	147.1 (± 3.7) ^a	30.9 (± 1.1) ^c	147:31:1 ($\pm 4:1:0$)

2.2.2. Triple marquage ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S des plantes et des vers de terre

Après la récolte à Bauppte, les plantes débarrassées de la tourbe ($n = 38$) ont été cultivées pendant 3 semaines dans un bac de perlite avec une solution nutritive enrichie en ^{15}N et en ^{34}S ($[\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3] = 1.5 \text{ mM}$ à 10 % de ^{15}N ; $[\text{SO}_4^{2-}] = 0.5 \text{ mM}$ à 1 % de ^{34}S). Au début de la 3^{ème} semaine, les plantes ont été transférées dans une chambre de marquage climatisée (cycle jour/nuit : 16/8 heures ; radiation de 300 μE ; 17 °C la nuit à 21 °C le jour ; humidité de 90 % la nuit à 65 % le jour) où l'atmosphère a été enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ ($[\text{CO}_2] = 430 \pm 60 \mu\text{L.L}^{-1}$ à 5.30 ± 0.70 % de ^{13}C). Un lot de plantes non marquées ($n = 30$) a été cultivé dans des conditions équivalentes d'éclairage et de nutrition.

Le marquage des vers de terre est basé sur un enrichissement préliminaire de la tourbe et des microorganismes présents dans celle-ci (période d'incubation). Les lombriciens s'enrichissent ensuite au contact et en ingérant cette tourbe enrichie en isotopes lourds (période de marquage). Pour faciliter l'incorporation en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S dans la biomasse microbienne de la tourbe, 3 kg de tourbe contenant 3 g de litière broyée d'*Agrostis stolonifera* (en masse sèche) ont été enrichis en 3 étapes successives :

- un apport initial ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S 24 h après composé de 3 g de ^{13}C -glucose (D-glucose, U- $^{13}\text{C}_6$ à 99 Atom % ; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France), 1.5 g de chlorure de ^{15}N -ammonium ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ à 99 Atom % ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, U.S.A.) et 0.55 g de ^{34}S élémentaire (99 Atom % ; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France),

- un apport ^{13}C - ^{15}N , 120 h après le premier, composé de 3 g de ^{13}C -glucose et 1.5 g de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$,

- un dernier apport en ^{13}C -glucose de 6 g, 48 h après le second. Après 8 jours d'incubation à 15 °C à l'abri de la lumière, les Atom % excess en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S de la tourbe enrichie étaient respectivement de 0.7, 6.5 et 9.7 %.

Soixante douze *L. rubellus* ont été marqués et 45 individus non marqués ont servi de contrôle. Après un tirage au sort au sein de chaque classe de taille ($n = 24$ individus marqués et 15 individus non marqués), les vers de terre sont placés individuellement dans une boîte en polycarbonate (volume 100 mL, diamètre 6 cm) contenant 20 g de tourbe préalablement enrichie en ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S ou non, et 6 mL d'eau distillée puis maintenu pendant 8 jours sous conditions contrôlées en enceinte climatique (Conviron GR96 ; cycle jour/nuit : 16/8 heures ; radiation de 10 à 150 μmol ; 10°C la nuit à 15°C le jour ; humidité = 70 \pm 5%).

2.2.3. Préparation des mésocosmes

L'expérimentation a été menée dans la même enceinte climatique et avec les mêmes paramètres que pour le triple marquage des vers de terre. Deux séries d'analyses espacées de 15 jours (t_3 et t_{18}) ont été définies pour pouvoir mettre en évidence les transferts d'éléments entre les 2 sphères fonctionnelles. La première date de mesures a été effectuée 3 jours après la reconstitution des microcosmes (t_0) pour permettre au système de se stabiliser.

Un traitement tourbe nue (T) a servi de contrôle interne à notre manipulation ($t_3 n = 4$; $t_{18} n = 4$). Trois traitements en abondance naturelle (Plantes (P), vers de terre (E) et plantes + vers de terre (PE)), ont été utilisés afin de vérifier la stabilité entre t_0 et t_{18} des compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des *E. angustifolium* et *L. rubellus* ($t_{18} n = 2$). Pour étudier l'effet de la plante sur le ver de terre, un traitement avec des vers de terre marqués (E*) a été comparé à un traitement avec la présence de plantes non marquées en plus des vers de terre marqués (PE*) ($t_3 n = 4$; $t_{18} n = 4$). De même, pour analyser l'effet de *L. rubellus* sur *E. angustifolium*, deux traitements avec des plantes marquées mais différant par la présence de vers de terre non marqués ont été utilisés (P* et P*E ; $t_3 n = 4$; $t_{18} n = 4$). Et enfin, pour mettre en évidence l'effet « source de marquage » sur les transferts C-N-S entre plantes et vers de terre, sont comparés les traitements plantes marquées + vers de terre (P*E) et plantes + vers de terre marqués (PE*).

Les mésocosmes de tourbe non marquée ont été reconstitués dans des tubes en PVC ($\text{Ø int.} = 12$ cm et hauteur = 20 cm), remplis et compactés jusqu'à 18 cm de hauteur à une

densité naturelle de $0.83 \text{ g de tourbe sèche.cm}^{-3}$ (Figure 1). Pour les mésocosmes avec *L. rubellus* (E, E*, PE, P*E et PE*), 3 vers de terre avec 1 individu de chaque classe ($a + b + c$) ont été inoculés. Pour les mésocosmes avec *E. angustifolium* (P, P*, PE, P*E et PE*), 2 plantes sont repiquées en vis-à-vis. Les mésocosmes ont ensuite été placés dans des pots contenant une solution nutritive d'eau minérale naturelle (Luchon, France; $\text{pH} = 8$; $[\text{HCO}_3^-] = 78.1 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{SO}_4^{2-}] = 8.2 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_3^-] = 1.8 \text{ mg.L}^{-1}$). Le niveau inférieur des mésocosmes avait été préalablement crépiné sur une hauteur de 6 cm pour permettre une meilleure circulation de l'eau, et un tissu maillé de 1 mm de porosité a été fixé à l'extrémité afin d'éviter une dispersion de la tourbe dans le pot. Les mésocosmes ont été maintenus à un niveau d'eau de $3 \pm 1 \text{ cm}$ par un apport régulier d'eau minérale. Une toile de 1 mm de porosité a été fixée à l'extrémité supérieure de chaque mésocosme afin d'éviter une éventuelle fuite des vers de terre.

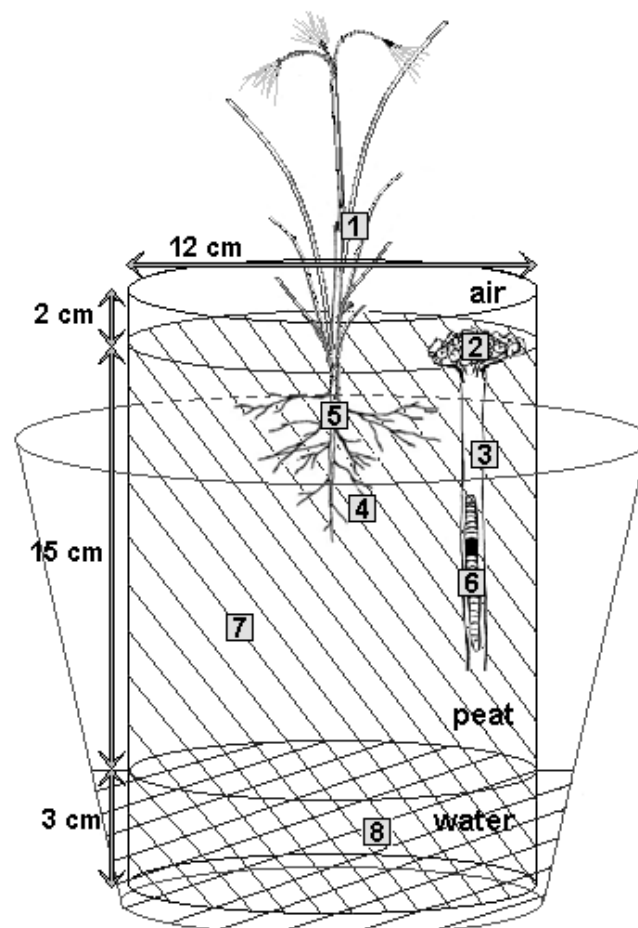


Figure 1. Coupe transversale d'un mésocosme et identification des différents compartiments biotiques et tourbe analysés

2.2.4. Echantillonnage des compartiments et mesures de respiration

Les parties aériennes des plantes [1] et les turricules [2] sont récupérés dans un premier temps en surface des mésocosmes (Figure 1). Puis le mésocosme est extrait du tube en PVC afin de récupérer les compartiments intra-tourbe : c'est-à-dire les galeries de vers de terre [3] en grattant soigneusement les parois sur une épaisseur inférieure à 2 mm ; la rhizosphère [4] en récupérant la tourbe accrochée aux racines ; les racines [5] et les vers de terre [6]. Le bulk [7], qui correspond à la tourbe non influencée de façon directe par les sphères fonctionnelles des deux organismes, est récupéré à plusieurs endroits en prenant bien soin de ne pas utiliser la tourbe présente aux 3 derniers centimètres de profondeurs. Enfin, l'eau [8] est prélevée dans les pots. Les vers de terre ont ensuite été mis à déféquer pendant 12 h dans des boîtes de Petri avec du papier absorbant imbibé d'eau distillé, puis congelés pour les euthanasier. Les différents échantillons ont ensuite été séchés 48 h à 50 °C à l'étuve puis broyés et transférés dans des capsules en étain.

Des mesures de respiration C-CO₂ et ¹³C-CO₂ ont été effectuées pour les traitements C, P*, E*, P*E et PE* par la méthode d'incubation des chambres statiques pendant 1 h entre les dates t₀ et t₁₈ (n = 3 par dates). Les quantités de C-CO₂ ont été mesurées par chromatographie en phase gazeuse (MicroGC 3000 équipé d'une colonne Poraplot-U de 6m, SRA Instruments, Marcy l'Etoile, France). Les échantillons de gaz pour mesures isotopiques en ¹³C ont été prélevés à l'aide d'une seringue puis récupérés dans des tubes sous vide de 12 mL (VC309, Labco Limited) et conservés au froid et à l'abri de la lumière avant analyse.

2.2.5. Analyses C-N-S

Les analyses élémentaires et isotopiques C, N et S des échantillons de plantes, vers de terre, rhizosphère, turricules, galeries, tourbe et eau ont été effectuées par le laboratoire Iso-Analytical Limited (UK). Elles sont mesurées par EA-IRMS : analyseur élémentaire (Europa Scientific Roboprep elemental analyser, Crewe, Angleterre) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (Europa Scientific 20-20 IRMS, Crewe, Angleterre). La précision instrumentale de mesure donnée par le laboratoire est de ± 0.2 ‰. Pour les échantillons d'eau, le C inorganique dissous (DIC) a été analysé par GC-IRMS après avoir filtré l'eau à 0.2 µm et transformé le DIC en CO₂ par un ajout d'acide phosphorique. Le N dissous a été analysé par EA-IRMS après avoir séché le filtrat (0.2 µm) jusqu'à obtention d'un résidu sec.

Les analyses de ^{13}C - CO_2 , ont été effectuées par IRMS au laboratoire IBFA de l'Université de Caen avec un analyseur Microgas d'une précision instrumentale donnée de $\pm 0.3 \text{ ‰}$ (GV Instruments, Manchester, Angleterre) et muni d'un passeur Gilson.

2.2.6. Traitements des données et analyses statistiques

La composition isotopique en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des différents échantillons est exprimée en $\delta \text{ ‰}$. Elle est déterminée à l'aide d'un standard de rapport isotopique ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S connue selon l'équation (Mariotti 1991) :

$$\delta (\text{‰}) = ((R_{\text{échantillon}} / R_{\text{standard}}) - 1) \times 1000 \quad [1]$$

où R représente le ratio isotope lourd / isotope léger. Les standards de référence utilisés sont le Pee Dee Belemnite (PDB) pour le ^{13}C ($R_{\text{PDB}} = 0.0112$), le N_2 atmosphérique pour le ^{15}N ($R_{\text{N}_2} = 0.0037$) et la Troïlite de la météorite du Canyon Diablo pour le ^{34}S ($R_{\text{CDT}} = 0.0450$).

Supposant qu'il n'y a pas de différence dans les processus de transferts des différentes formes d'isotopes composant un élément (Powlson et Barraclough 1993), les flux estimés des isotopes ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S sont représentatifs des flux globaux des éléments C, N et S. Nous avons estimé les stocks d'éléments marqués et les recouvrements des traceurs apportés dans les différents compartiments des mésocosmes, ainsi que les pertes de C par respiration et dans l'eau. Le recouvrement dans chacun des compartiments est exprimé relativement à la quantité de traceur apporté dans chaque mésocosme selon l'équation (Powlson et Barraclough 1993, Francez et Loiseau 1999), appliquée à chacun des éléments :

$$\text{Recouvrement \%} = (\text{APE}_{\text{compartiment}} / \text{APE}_{\text{apport}}) \times (\text{stock}_{\text{compartiment}} / \text{stock}_{\text{apport}}) \times 100 \quad [2]$$

où l'APE (Atom % excess) représente l'enrichissement isotopique en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des différents échantillons et correspond à la différence entre l'Atom % de l'échantillon marqué et l'Atom % d'échantillons non marqués. L'Atom % représente l'abondance isotopique calculée selon l'équation (Mariotti 1991) :

$$\text{Atom \%} = ((\text{isotope lourd} / (\text{isotope lourd} + \text{isotope léger})) \times 100 \quad [3]$$

Les quantités de ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S transférées proviennent des vers de terre et des plantes marquées introduites dans les systèmes. L'Atom % global de ces dernières (parties aériennes + racines) est calculé selon l'équation, pour chacun des éléments :

$$\text{Atom \% plantes} = [(\text{Atom \%}_{\text{aérien}} \times \text{stock}_{\text{aérien}}) + (\text{Atom \%}_{\text{racines}} \times \text{stock}_{\text{racines}})] / (\text{stock}_{\text{aérien}} + \text{stock}_{\text{racines}}) \quad [4]$$

Les recouvrements de S dans le bulk ont été estimés par différence entre le total de 100 % et la somme des différents compartiments en émettant l'hypothèse qu'il n'y a pas, ou de façon négligeable, de pertes sous formes gazeuses. Les flux nets vers un compartiment (transferts biogéniques), exprimés en μg de C, N ou S. g^{-1} de plante ou de ver de terre (masse fraîche). jour^{-1} , sont ensuite calculés selon l'équation :

$$\text{Flux.jour}^{-1} = [(\text{Recouvrement} \times \text{stock}_{\text{apport}}) / 100] / n \text{ jours} \quad [5]$$

Les turnovers C, N et S journaliers des vers de terre et des plantes (parties aériennes + racines) sont calculés sur la base des transferts biogéniques C, N et S et de respiration pour le C (Whalen *et al.* 2000) selon l'équation :

$$\text{Turnover journalier} = (\text{transferts biogéniques journalier} / \text{stock}_{\text{compartiment}}) \times 100 \quad [6]$$

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *R* (version 2.12.0). Le niveau de significativité pour toutes les analyses a été fixé à $P < 0.05$. Des analyses de variance (ANOVAs à l'aide la procédure GLM) ont été effectuées pour tester l'effet des facteurs 'traitements', 'durée de contact' et 'compartiments' sur la composition isotopique en ^{13}C , ^{15}C et ^{34}S des échantillons. Des tests *t* ont été effectués pour comparer des échantillons deux à deux. La normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk.

2.3. Résultats

2.3.1. Vérification de la méthodologie de triple marquage ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S

Que ce soit pour *E. angustifolium* ou *L. rubellus*, les individus marqués ont des compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S de 1.5 à 300 plus élevées que les individus non marqués (Tableau 2). Les parties aériennes des plantes marquées présentent des compositions isotopiques en ^{13}C et ^{34}S de 2 à 5 fois plus élevées que les parties racinaires (tests t : ^{13}C , $t = 5.43$, $P < 0.001$; ^{15}N , $t = 1.75$, $P = 0.113$; ^{34}S , $t = 3.94$, $P < 0.001$). Les petits individus de vers de terre marqués (classe *a* et *b*) présentent des compositions isotopiques en ^{13}C environ 50 % fois plus élevées que les individus de grandes tailles (classe *c*) (tests t : *a* vs. *c*, $t = 3.02$, $P < 0.05$; *b* vs. *c*, $t = 2.67$, $P < 0.05$).

Tableau 2. Comparaisons des compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S (δ ‰) des individus d'*E. angustifolium* et de *L. rubellus* non marqués et des individus en sortie de marquage (t_0). Moyennes \pm S.E. ; tests t avec * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$

<i>Eriophorum angustifolium</i>		individus non marqués ($n = 6$)			individus marqués ($n = 6$)			tests t
^{13}C	δ ^{13}C aérien	-26.6	\pm	0.1	285.2	\pm	34.5	***
	δ ^{13}C racines	-27.3	\pm	0.2	63.1	\pm	28.7	*
^{15}N	δ ^{15}N aérien	3.5	\pm	0.8	873.3	\pm	143.4	**
	δ ^{15}N racines	9.2	\pm	1.4	585.3	\pm	109.2	**
^{34}S	δ ^{34}S aérien	24.1	\pm	1.6	33.4	\pm	1.3	***
	δ ^{34}S racines	21.0	\pm	0.4	26.5	\pm	1.5	**
<i>Lumbricus rubellus</i>		individus non marqués ($n = 3$)			individus marqués ($n = 4$)			tests t
^{13}C	δ ^{13}C classe a	-26.6	\pm	0.4	1336.0	\pm	143.4	**
	δ ^{13}C classe b	-26.6	\pm	0.3	1296.4	\pm	150.9	**
	δ ^{13}C classe c	-26.7	\pm	0.3	877.9	\pm	100.5	**
^{15}N	δ ^{15}N classe a	14.6	\pm	2.5	4811.3	\pm	364.9	***
	δ ^{15}N classe b	15.0	\pm	1.2	4837.4	\pm	406.0	***
	δ ^{15}N classe c	14.8	\pm	1.1	4214.0	\pm	520.5	**
^{34}S	δ ^{34}S classe a	12.0	\pm	0.4	218.9	\pm	22.3	**
	δ ^{34}S classe b	11.2	\pm	0.4	240.2	\pm	14.0	***
	δ ^{34}S classe c	11.1	\pm	0.4	194.1	\pm	16.9	**

Les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des différents compartiments ont faiblement évolué au cours des 18 jours d'expérimentation (Tableau 3). L' ^{15}N est l'élément qui présente les fractionnements isotopiques les plus fréquents avec des diminutions de δ ^{15}N de -2 à -8 ‰ entre t_0 et t_{18} . Pour le C et le S, sont observés de faibles diminutions de δ ^{13}C des parties aériennes (-3 ‰) et des vers de terre (-2 ‰), et de δ ^{34}S des plantes (parties aériennes et racines : -7 et -9 ‰ respectivement).

Tableau 3. Evolutions entre t_0 et t_{18} des abondances naturelles en $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S (‰) des différents compartiments des mésocosmes (P, E et PE). Moyennes \pm S.E. et $n = 1$ à 9. Pour chaque élément, les différences significatives de δ (‰) au sein d'une même ligne sont indiquées par des petites lettres (tests t avec $P < 0.05$). nd = non défini

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{15}\text{N}$ (‰)				$\delta^{34}\text{S}$ (‰)			
	t_0	t_{18P}	t_{18E}	t_{18PE}	t_0	t_{18P}	t_{18E}	t_{18PE}	t_0	t_{18P}	t_{18E}	t_{18PE}
aérien	-26.6 $\pm 0.1^a$	-27.4 $\pm 0.6^a$	-	-29.2 $\pm 0.0^b$	3.5 \pm 0.8 ^a	3.2 \pm 0.8 ^a	-	1.4 \pm 0.0 ^b	24.1 \pm 1.6 ^a	15.6 \pm 0.5 ^b	-	14.9 \pm 0.0 ^b
racines	-27.3 $\pm 0.2^a$	-27.2 $\pm 0.5^a$	-	-28.3 $\pm 0.4^a$	9.2 \pm 1.4 ^a	2.7 \pm 1.2 ^b	-	3.6 \pm 0.2 ^b	24.1 \pm 1.6 ^a	16.7 \pm 1.7 ^b	-	18.4 \pm 0.5 ^b
rhizosphère	nd	-27.0 $\pm 0.3^a$	-	-27.1 $\pm 0.1^a$	nd	13.7 \pm 0.7 ^a	-	3.4 \pm 0.8 ^b	nd	22.8 \pm 0.8 ^a	-	22.6 \pm 1.2 ^a
vers	-26.6 $\pm 0.1^a$	-	-28.1 $\pm 0.5^b$	-26.6 \pm nd	14.8 \pm 0.7 ^a	-	6.8 \pm 1.1 ^b	8.7 \pm nd	11.4 \pm 0.3 ^a	-	12.9 \pm 0.9 ^a	13.1 \pm nd
galeries	nd	-	-27.3 $\pm 0.1^a$	-27.3 $\pm 0.0^a$	nd	-	5.3 \pm 0.0 ^a	6.0 \pm 0.1 ^b	nd	-	21.1 \pm 0.6 ^a	21.0 \pm 1.9 ^a
turricules	nd	-	-27.2 $\pm 0.1^a$	-27.2 $\pm 0.0^a$	nd	-	4.5 \pm 0.8 ^a	4.2 \pm 0.8 ^a	nd	-	22.3 \pm 0.1 ^a	21.5 \pm 0.2 ^a
bulk	-27.4 $\pm 0.0^a$	-27.2 $\pm 0.1^a$	-27.1 $\pm 0.3^a$	-27.3 $\pm 0.1^a$	9.5 \pm 0.6 ^a	3.3 \pm 0.6 ^b	2.7 \pm 0.8 ^b	2.1 \pm 0.0 ^b	22.0 \pm 0.7 ^a	23.5 \pm 1.9 ^a	22.2 \pm 0.6 ^a	23.1 \pm 0.5 ^a

Les rapports stœchiométriques C:N:S des individus marqués (parties aériennes 634:18:1 \pm 39:1:0, racines 442:15:1 \pm 33:1:0 et vers de terre 148:30:1 \pm 4:1:0) ne diffèrent pas de ceux des individus non marqués (Tableau 1).

Quelque soit le traitement avec des individus marqués, la signature isotopique du C respiré présente un flush avec des valeurs plus élevées entre t_1 et t_3 , et qui diminuent jusqu'à t_{18} (Figure 2). On remarque également que les traitements avec vers de terre marqués (E* et PE*) présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ supérieures aux traitements avec plantes marquées (P* et P*E), ce qui confirme les différences d'enrichissements en ^{13}C observées entre les deux organismes (Tableau 2). Pour le traitement tourbe nue (T), les valeurs sont stables dans le temps ($-18.7 \pm 0.1 \delta^{13}\text{C}$ ‰).

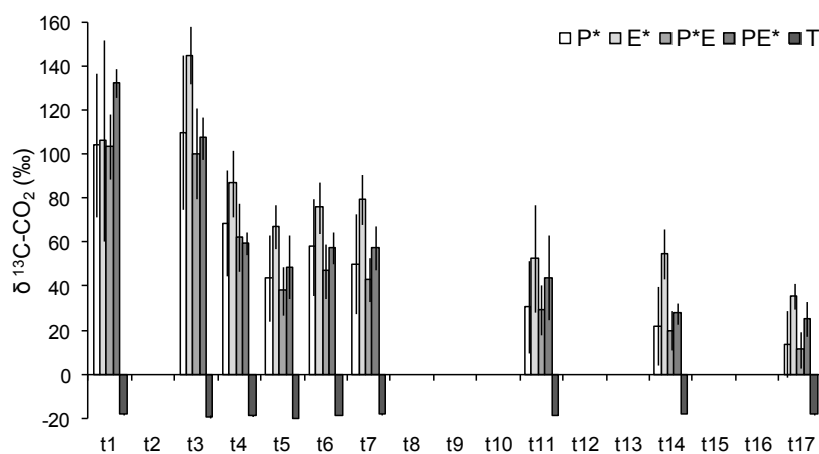


Figure 2. Evolution de t_1 à t_{17} de la composition isotopique du C respiré ($\delta^{13}\text{C-CO}_2$ ‰) des mésocosmes P*, E*, P*E, PE* et T (Moyennes \pm S.E. ; $n = 3$)

Les recouvrements calculés en C et N pour les différents traitements varient de 72 ± 7 % à 126 ± 10 % (Tableau 4). Le traitement avec les vers de terre marqués (E*) à t_{18} est celui qui présente les plus forts défauts de bilan en C et N de l'ordre de 20 %.

2.3.2. Transferts C-N-S de la plante et effet du ver de terre

Il n'a pas été observé de différences de compositions isotopiques en ^{13}C et ^{34}S des compartiments « sources » de marquage (parties aériennes et racines) entre les dates t_0 et t_{18} , et des compartiments « récepteurs » (rhizosphère et bulk) entre les dates t_3 et t_{18} (ANOVAs : $^{13}\text{C}_{\text{sources}} P = 0.392$ et $^{13}\text{C}_{\text{récepteurs}} P = 0.754$; $^{34}\text{S}_{\text{sources}} P = 0.077$ et $^{34}\text{S}_{\text{récepteurs}} P = 0.754$) (Figure 3). Pour le N, seule une diminution de $4 \delta^{15}\text{N} \text{‰}$ a été observée entre les dates t_3 et t_{18} du bulk (ANOVAs : $^{15}\text{N}_{\text{sources}} P = 0.212$ et $^{15}\text{N}_{\text{récepteurs}} P = 0.046$), i.e. du même ordre de grandeur que le fractionnement isotopique observé dans la tourbe en abondance naturelle (Tableau 3). Quelque soit l'élément C, N ou S, la rhizosphère a des $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S de 1.1 à 9 fois plus élevés que ceux du bulk (ANOVAs : $^{13}\text{C} P < 0.001$; $^{15}\text{N} P < 0.001$; $^{34}\text{S} P < 0.01$).

Les transferts de C, N et S de la plante vers la rhizosphère représentent respectivement de 0.1 à 0.2 %, de 1 à 2 % et de 8 à 14 % des stocks de C, N et S initiaux de la plante, selon la durée de contact t_3 ou t_{18} (Tableau 4). Ainsi, au cours des 3 premiers jours de contact, les transferts en C, N et S vers la rhizosphère varient de 11 à 45, 11 à 17 et 14 à 19 μg de C, N et S.g⁻¹ de plante (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement. Les quantités respirées C-CO₂ représentent à t_{18} de 2 à 5 % de la quantité initiale de C provenant des plantes, ce qui correspond à une perte en C de 613 à 1327 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de plante (masse fraîche).jour⁻¹. Les pertes de C et N sous formes dissoutes dans l'eau (DOC et DON) représentent à t_{18} respectivement de 5 à 11 % et de 1 à 2 % des stocks de C et N initiaux de la plante. Ce qui correspond à des transferts de 208 à 492 et 1 à 4 μg de C et N.g⁻¹ de plante (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement.

La présence de vers de terre n'a pas d'impact sur la composition isotopique en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des compartiments « sources » de marquage et « récepteurs » des traitements P* et P*E (ANOVAs : $^{13}\text{C}_{\text{sources}} P = 0.589$ et $^{13}\text{C}_{\text{récepteurs}} P = 0.171$; $^{15}\text{N}_{\text{sources}} P = 0.715$ et $^{15}\text{N}_{\text{récepteurs}} P = 0.605$; $^{34}\text{S}_{\text{sources}} P = 0.871$ et $^{34}\text{S}_{\text{récepteurs}} P = 0.391$) (Figure 3). Cependant, les turnovers en C, N et S journaliers d'*E. angustifolium* (parties aériennes + racines) sont respectivement 1.7, 1.7 et 1.6 fois plus rapides en présence de *L. rubellus* ($C_{P^*} = 0.3$ % et $C_{P^*E} = 0.5$ % ; $N_{P^*} = 2.7$ % et $N_{P^*E} = 4.6$ % ; $S_{P^*} = 2.0$ % et $S_{P^*E} = 3.2$ %).

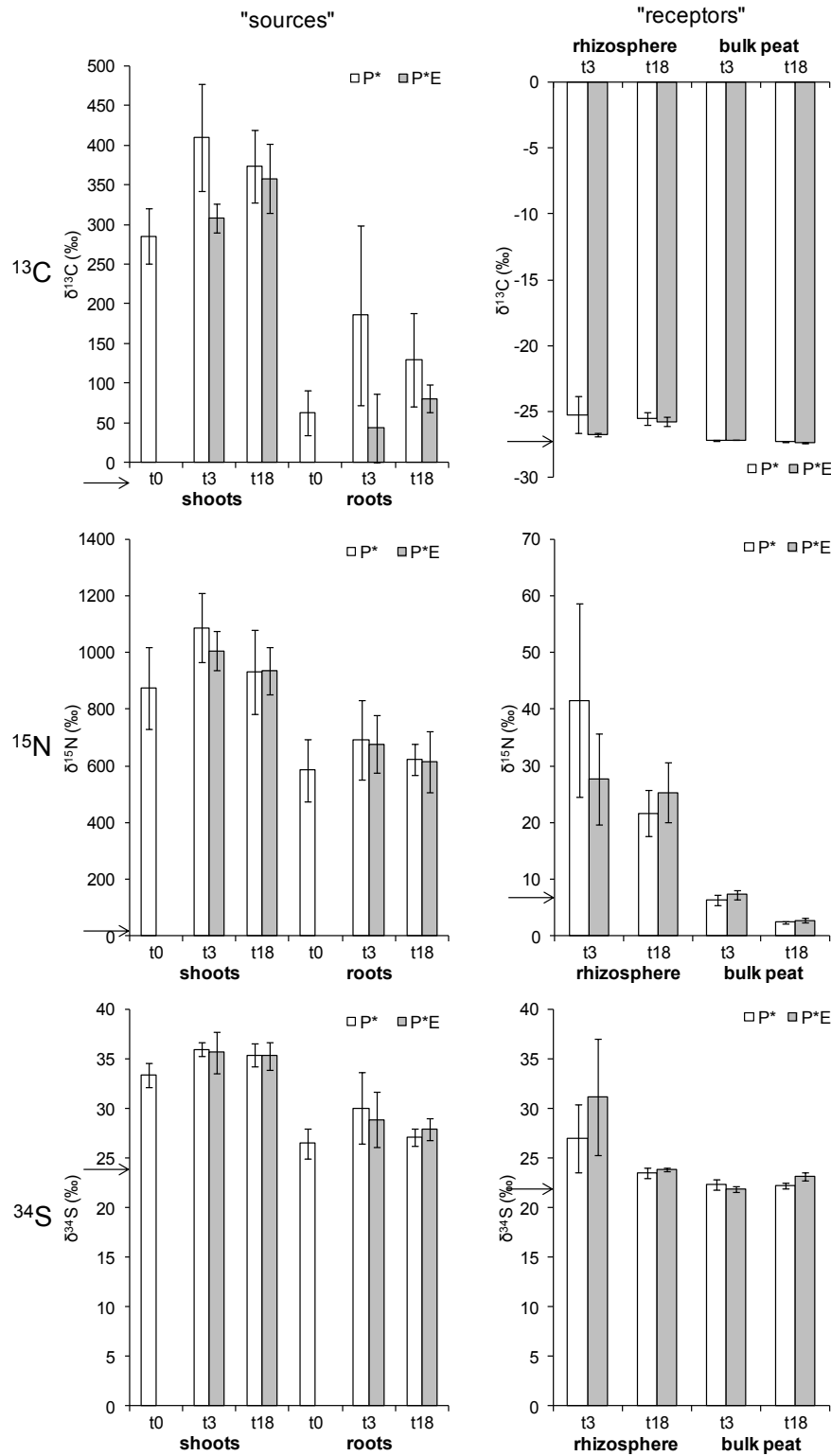


Figure 3. Compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S (δ ‰) des parties aériennes, racines, rhizosphère et bulk des traitements avec plantes marquées (P*) et plantes marquées avec vers de terre non marqués (P*E) à t₀, t₃ et t₁₈ (Moyennes \pm S.E. ; n = 3 ou 4). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S

2.3.3. Transferts C-N-S du ver de terre et effet de la plante

Les compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des vers de terre (« source » de marquage) diminuent de 1.5 à 2.5 fois entre les dates t_0 et t_{18} (ANOVAs : ^{13}C $P < 0.001$; ^{15}N $P < 0.001$; ^{34}S $P < 0.001$) (Figure 4). Pour les compartiments « récepteurs » de la drilosphère, les $\delta^{13}\text{C}$ et ^{15}N diminuent de 2 à 4 fois pour les turricules et de 1.1 à 1.4 fois pour les galeries entre les dates t_3 et t_{18} (ANOVAs : ^{13}C $P < 0.001$; ^{15}N $P < 0.001$; ^{34}S $P = 0.212$). On observe également une diminution de 4 à 5 $\delta^{15}\text{N}$ ‰ du bulk entre les dates t_3 et t_{18} , i.e. du même ordre de grandeur que le fractionnement isotopique observé dans la tourbe en abondance naturelle (Tableau 3). Les compositions isotopiques en ^{13}C et ^{15}N des turricules sont plus élevées que celles des galeries (ANOVAs : ^{13}C $P < 0.001$, test de Bonferroni $P < 0.001$; ^{15}N $P < 0.001$, test de Bonferroni $P < 0.001$), qui sont elles mêmes plus élevées que celles du bulk (^{13}C test de Bonferroni $P < 0.001$; ^{15}N test de Bonferroni $P < 0.001$). Pour le S, les compositions isotopiques en ^{34}S des turricules sont plus élevées que celles des galeries (ANOVA : $P < 0.001$, test de Bonferroni $P < 0.01$), et que celles du bulk (test de Bonferroni $P < 0.001$).

Les quantités de C, N et S transférées vers les galeries sont plus importantes que celles transférées vers les turricules (Tableau 4). Pour ces derniers, elles représentent respectivement de 1 à 2 %, 2 à 4 % et 4 à 17 % des stocks de C, N et S initiaux du ver de terre, selon la durée de contact t_3 ou t_{18} . Ainsi, au cours des 3 premiers jours de contact, les transferts en C, N et S vers les turricules varient de 179 à 210, 85 à 87 et 16 à 24 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement. Pour les galeries, elles représentent respectivement de 4 à 6 %, 6 à 8 % et 7 à 29 % des stocks de C, N et S initiaux du ver de terre, selon la durée de contact t_3 ou t_{18} . Ce qui correspond au cours des 3 premiers jours de contact à des transferts en C, N et S vers les galeries de 1084 à 1264, 388 à 422 et 25 à 74 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement. Les quantités respirées C-CO₂ représentent à t_{18} de 5 à 8 % de la quantité initiale de C provenant des vers de terre, ce qui correspond à une perte en C de 1001 à 1623 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹. Les pertes de C et N en DOC et DON représentent à t_{18} respectivement de 9 à 15 % et de 0.5 à 3 % des stocks de C et N initiaux du ver de terre. Ce qui correspond à des transferts de 307 à 505 et 4 à 28 μg de C et $\text{N}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement.

La présence de plantes a un impact positif sur la composition isotopique en ^{13}C des vers de terre à t_{18} (+ 90 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ ; test t : $t = -3.31$, $P < 0.05$; Figure 4), mais pas sur les compartiments « récepteurs » (ANOVA : $^{13}\text{C}_{\text{récepteurs}}$ $P = 0.531$). Pour le N et le S, aucun effet de la plante sur la composition isotopique en ^{15}N et ^{34}S des vers de terre et des compartiments

« récepteurs » n'a été observée (ANOVAs : $^{15}\text{N}_{\text{source}}$ $P = 0.919$ et $^{15}\text{N}_{\text{récepteurs}}$ $P = 0.409$; $^{34}\text{S}_{\text{source}}$ $P = 0.600$ et $^{34}\text{S}_{\text{récepteurs}}$ $P = 0.365$). Les turnovers journaliers en C et S de *L. rubellus* sont du même ordre de grandeur avec la présence ou non d'*E. angustifolium* ($C_{E^*} = 0.8\%$ et $C_{PE^*} = 0.9\%$; $S_{E^*} = 2.0\%$ et $S_{PE^*} = 2.2\%$), et 2 fois plus rapides pour le N en présence de la plante ($N_{E^*} = 0.5\%$ et $N_{PE^*} = 1.0\%$).

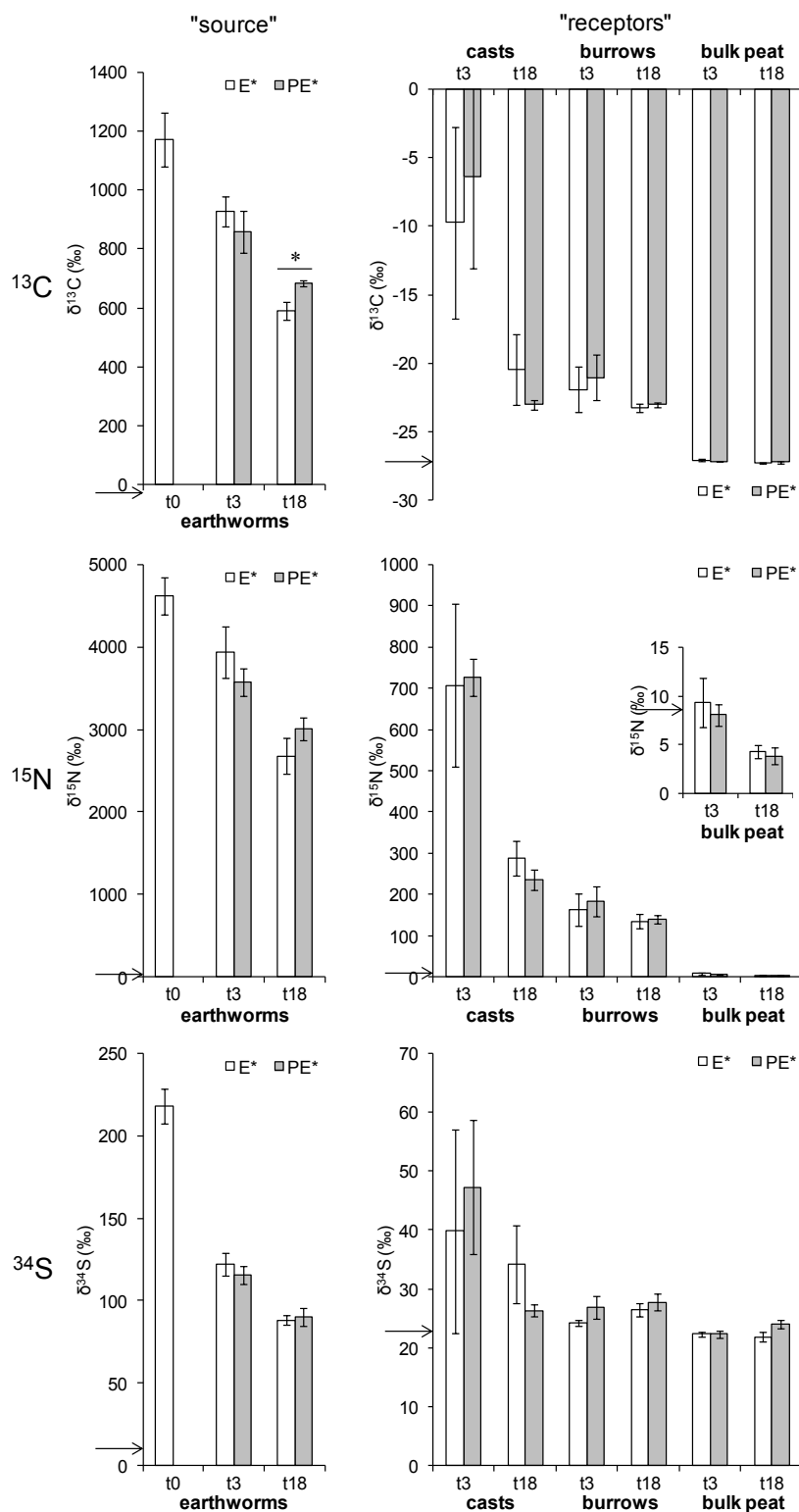


Figure 4. Compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S (δ ‰) des vers de terre, turricules, galeries et bulk des traitements avec vers de terre marqués (E^*) et vers de terre marqués avec plantes non marquées (PE^*) à t_0 , t_3 et t_{18} (Moyennes \pm S.E. ; $n = 3$ ou 4 ; tests t avec * $P < 0.05$). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S

Tableau 4. Répartitions à t_0 , t_3 et t_{18} des recouvrements C, N et S des compartiments biotiques et abiotiques après contact avec des plantes (P* et P*E) ou des vers de terre marqués (E* et PE*). Moyennes \pm S.E. ($n = 3$ ou 4). nd = non défini

Carbone en %	Plantes			Vers de terre							Total
	aérien	racines	rhizosphère	vers	turricules	galeries	bulk	eau	CO ₂		
P* t0	82 \pm 5	18 \pm 5	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 7	
P* t3	61 \pm 7	16 \pm 8	0.2 \pm 0.1	-	-	-	1 \pm 1	1.9 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	81 \pm 14	
P* t18	69 \pm 6	17 \pm 6	0.2 \pm 0.1	-	-	-	0 \pm 0	4.5 \pm 0.6	2.2 \pm 1.0	93 \pm 12	
E* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
E* t3	-	-	-	81 \pm 4	0.9 \pm 0.3	5.3 \pm 1.7	5 \pm 4	4.8 \pm 0.7	1.9 \pm 0.2	99 \pm 5	
E* t18	-	-	-	55 \pm 3	1.9 \pm 0.8	4.0 \pm 0.3	0 \pm 0	8.9 \pm 3.2	4.9 \pm 0.4	75 \pm 3	
P*E t0	82 \pm 5	18 \pm 5	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 7	
P*E t3	51 \pm 2	6 \pm 3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	1 \pm 1	12.4 \pm 6.4	2.1 \pm 0.3	72 \pm 7	
P*E t18	65 \pm 6	10 \pm 2	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4	0 \pm 0	10.7 \pm 1.6	4.8 \pm 1.3	91 \pm 7	
PE* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
PE* t3	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.4 \pm 0.3	78 \pm 6	1.0 \pm 0.3	6.1 \pm 1.7	2 \pm 1	22.5 \pm 8.1	2.4 \pm 0.2	112 \pm 15	
PE* t18	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.4 \pm 0.3	63 \pm 2	1.2 \pm 0.1	4.2 \pm 0.2	1 \pm 1	14.7 \pm 3.8	7.9 \pm 1.4	93 \pm 3	
Azote en %	Plantes			Vers de terre							Total
aérien	racines	rhizosphère	vers	turricules	galeries	bulk	eau	CO ₂			
P* t0	61 \pm 5	39 \pm 5	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 6	
P* t3	61 \pm 9	22 \pm 3	1.8 \pm 0.7	-	-	-	41 \pm 3	0.4 \pm 0.2	-	126 \pm 10	
P* t18	60 \pm 12	30 \pm 4	1.0 \pm 0.3	-	-	-	1 \pm 1	0.9 \pm 0.6	-	93 \pm 15	
E* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
E* t3	-	-	-	85 \pm 5	1.7 \pm 0.5	7.7 \pm 1.9	13 \pm 5	0.0 \pm 0.0	-	107 \pm 3	
E* t18	-	-	-	59 \pm 5	4.0 \pm 0.7	6.5 \pm 0.8	3 \pm 1	0.5 \pm 0.3	-	73 \pm 6	
P*E t0	61 \pm 5	39 \pm 5	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 6	
P*E t3	50 \pm 3	30 \pm 9	1.1 \pm 0.4	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	7.6 \pm 1.5	64 \pm 4	0.8 \pm 0.5	-	154 \pm 9	
P*E t18	61 \pm 14	25 \pm 5	1.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.6 \pm 0.2	2.6 \pm 0.7	0 \pm 0	2.2 \pm 1.7	-	93 \pm 12	
PE* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
PE* t3	0.1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	81 \pm 3	1.7 \pm 0.1	8.4 \pm 1.6	10 \pm 2	3.3 \pm 2.6	-	106 \pm 4	
PE* t18	1.3 \pm 0.3	3.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	66 \pm 4	3.3 \pm 0.3	6.7 \pm 0.5	2 \pm 2	3.4 \pm 2.2	-	87 \pm 5	
Soufre en %	Plantes			Vers de terre							Total
aérien	racines	rhizosphère	vers	turricules	galeries	bulk	eau	CO ₂			
P* t0	86 \pm 33	14 \pm 33	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 46	
P* t3	48 \pm 2	19 \pm 4	13.5 \pm 6.8	-	-	-	19 \pm 2	nd	-	100 \pm 9	
P* t18	47 \pm 5	28 \pm 5	8.3 \pm 3.9	-	-	-	16 \pm 11	nd	-	100 \pm 14	
E* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
E* t3	-	-	-	57 \pm 3	4.3 \pm 2.2	7 \pm 4	32 \pm 2	nd	-	100 \pm 6	
E* t18	-	-	-	45 \pm 3	16.8 \pm 9.3	22 \pm 6	17 \pm 11	nd	-	100 \pm 16	
P*E t0	86 \pm 33	14 \pm 33	-	-	-	-	-	-	-	100 \pm 46	
P*E t3	40 \pm 6	22 \pm 5	9.8 \pm 4.6	7.7 \pm 3.1	0.2 \pm 0.2	27 \pm 12	0 \pm 0	nd	-	100 \pm 16	
P*E t18	54 \pm 9	25 \pm 4	9.0 \pm 1.0	21.1 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	0 \pm 0	0 \pm 0	nd	-	100 \pm 10	
PE* t0	-	-	-	100 \pm 0	-	-	-	-	-	100 \pm 0	
PE* t3	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	5.6 \pm 4.7	55 \pm 2	6.3 \pm 3.0	20 \pm 10	12 \pm 12	nd	-	100 \pm 17	
PE* t18	0.5 \pm 0.5	1.7 \pm 0.5	0.6 \pm 0.2	42 \pm 5	5.1 \pm 1.3	29 \pm 8	21 \pm 9	nd	-	100 \pm 13	

2.3.4. Effet de la « source » de marquage sur les transferts C-N-S entre plantes et vers de terre

Les racines et la rhizosphère de plantes non marquées en contact de vers de terre marqués (PE*) ont des compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S qui augmentent respectivement de 1 et 4 $\delta^{13}\text{C}$ ‰, 680 et 115 $\delta^{15}\text{N}$ ‰, et 8 et 2 $\delta^{34}\text{S}$ ‰ entre t_0 et t_{18} (Figure 5). Pour les parties aériennes, seule la composition isotopique en ^{15}N augmente de 180 $\delta^{15}\text{N}$ ‰ entre t_0 et t_{18} . Ainsi, au cours des 18 premiers jours de contact, les transferts en C, N et S des vers de terre vers les racines sont de 4, 28 et 1 μg de C, N et S.g $^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour $^{-1}$ respectivement. Ils sont de 14, 5 et 1 μg de C, N et S.g $^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour $^{-1}$ pour la rhizosphère, et de 11 μg de N.g $^{-1}$ de ver de terre (masse fraîche).jour $^{-1}$ pour les parties aériennes.

Les vers de terre non marqués en contact de plantes marquées (P*E) ont des $\delta^{15}\text{N}$ qui diminuent de 6 ‰ et des $\delta^{34}\text{S}$ qui augmentent de 2 ‰ entre t_0 et t_{18} (Figure 5). Ainsi, au cours de 18 jours de contact, jusqu'à 21 % des quantités de S des plantes marquées (P*E) sont transférées dans les vers de terre (Tableau 4). Ce qui représente un transfert de 2 μg de S.g $^{-1}$ de plante (masse fraîche).jour $^{-1}$. La drilosphère des vers de terre non marqués a des compositions isotopiques en ^{13}C et ^{15}N qui augmentent de 0.5 et 1 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ et 12 et 13 $\delta^{15}\text{N}$ ‰ entre t_0 et $t_{3-t_{18}}$, respectivement pour les turricules et les galeries (Figure 5). Pour le S, seule la composition isotopique en ^{34}S des galeries augmente de 3 $\delta^{34}\text{S}$ ‰ entre t_0 et t_3 . Ainsi, au cours des 3 premiers jours de contact, les quantités en C, N et S des plantes retrouvées dans les galeries sont de 27, 74 et 37 μg de C, N et S.g $^{-1}$ de plante (masse fraîche).jour $^{-1}$ respectivement. Pour les turricules, ces quantités sont de 7 et 3 μg de C et N.g $^{-1}$ de plante (masse fraîche).jour $^{-1}$ respectivement.

Le rapport stœchiométrique C:N:S de la tourbe prélevée dans la rhizosphère (185:7:1 \pm 4:0:0), des turricules (186:7:1 \pm 2:0:0) et des galeries (182:7:1 \pm 2:0:0) montrent un enrichissement en C et N et un appauvrissement en S comparé au bulk (146:5:1 \pm 2:0:0). Le rapport stœchiométrique C:N:S de la rhizosphère montre un enrichissement en S quand la source de marquage est le ver de terre (P*E = 185:7:1 \pm 2:0:0 ; PE* = 166:6:1 \pm 10:0:0). Le rapport stœchiométrique C:N:S des galeries montre un enrichissement en C et un appauvrissement en S quand la source de marquage est la plante (P*E = 190:7:1 \pm 2:0:0 ; PE* = 150:6:1 \pm 2:0:0). Le rapport C:N:S calculé sur les transferts journaliers des vers de terre

(59:10:1 ± 0:5:0) montre un enrichissement en S comparé à celui des plantes (76:22:1 ± 2:1:0).

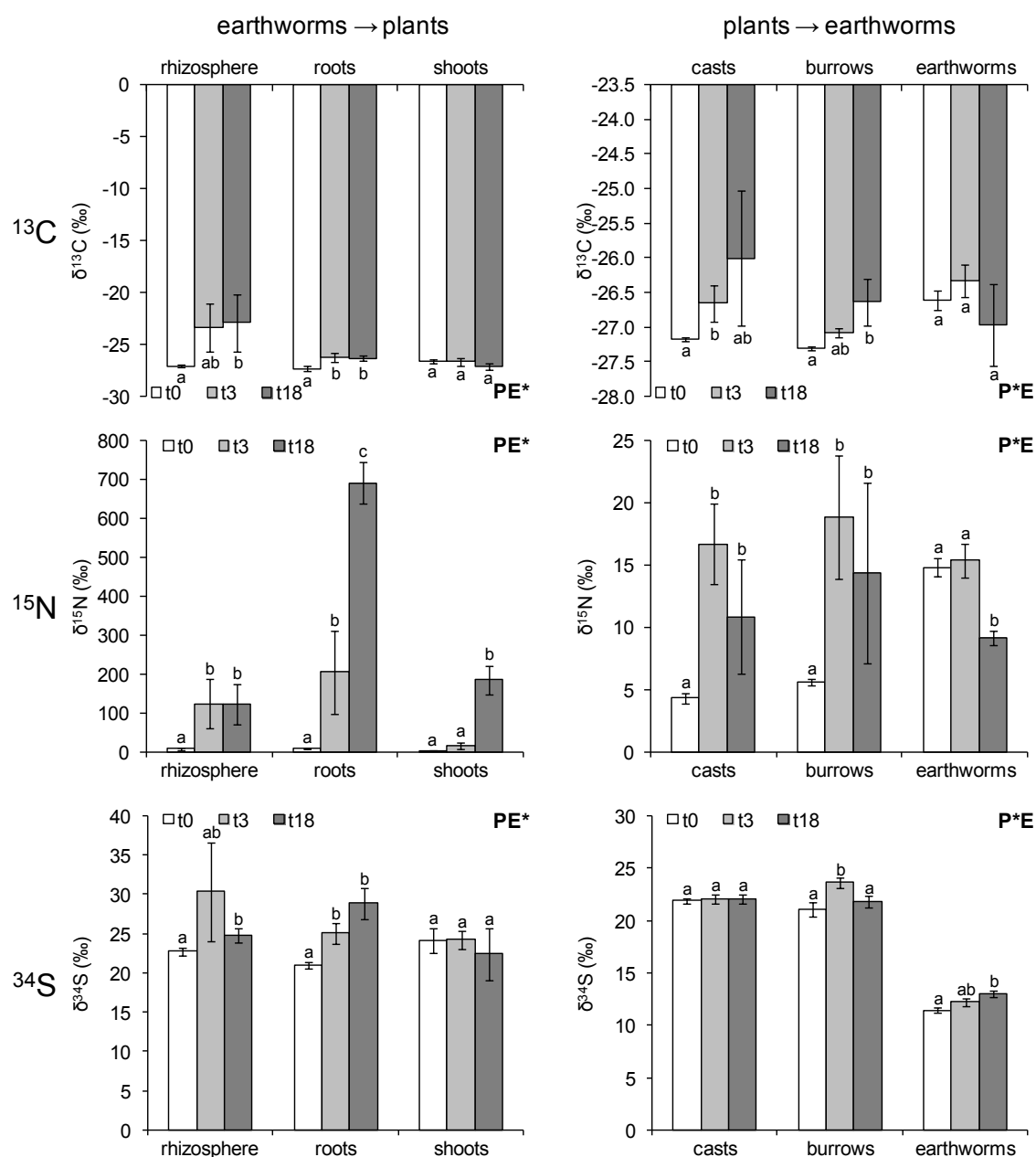


Figure 5. Compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S (δ ‰) des différents compartiments « récepteurs » plantes et vers de terre mis en contact respectivement avec des vers de terre marqués (PE*) ou plantes marquées (P*E) (Moyennes ± S.E. ; $n = 3$ ou 4). Les valeurs de la rhizosphère, turricules et galeries à t_0 correspondent à la moyenne des mêmes compartiments des traitements P, E et PE à t_{18} . Les petites lettres indiquent des différences significatives de δ (‰) entre dates (tests t avec $P < 0.05$)

2.4. Discussion

2.4.1. Fiabilité du dispositif

Les grandes différences de compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S obtenus entre les organismes marqués et non marqués confirment l'efficacité de la méthodologie de triple marquage. Les petits individus de *L. rubellus* s'enrichissent 50 % fois plus en C que les individus de grandes tailles, adultes, ayant terminé leur croissance et atteint une biomasse stable. Des différences similaires d'enrichissement en C et N liées à la biomasse des individus ont été observées chez les espèces endogées *A. tuberculata* (Whalen et Janzen 2002) et *A. caliginosa* (Dyckmans *et al.* 2005), ce qui démontre un trait écophysiological majeure des vers de terre particulièrement utile pour quantifier leur rôle à l'échelle de l'écosystème (structure en taille de la population). Il en est de même pour *E. angustifolium* qui présente des enrichissements en C et S de 2 à 5 fois plus élevés au niveau des racines qu'au niveau des parties aériennes. L'enrichissement en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S n'a pas eu d'effet sur la stœchiométrie C:N:S des organismes qui est restée stable au cours du triple marquage.

Les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des plantes et vers de terre ont faiblement évolué au cours des 18 jours d'expérimentations (- 2 à - 9 δ ‰). Cependant, ces fractionnements isotopiques sont négligeables compte tenu des forts enrichissements en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S mesurés dans les organismes marqués (+ 10 à + 4800 δ ‰). La diminution du δ ^{15}N du bulk au cours de l'expérimentation (- 6 à - 7 δ ‰) peut être liée des activités microbiennes sans que l'on puisse toutefois en préciser l'origine.

Les calculs de recouvrements montrent que les éléments initialement apportés via les plantes et les vers de terre sont globalement retrouvés dans les compartiments analysés aux deux dates de mesures 3 et 18 jours. Les défauts de bilans en C et N pour les mésocosmes avec les vers de terre marqués peuvent être liés à des pertes sous formes gazeuses de molécules carbonées et azotées. Les excréments d'N biogénique des lombriciens se font principalement sous forme minérale N-NH_4^+ et N-NO_3^- (Whalen *et al.* 2000). Or, il a récemment été démontré que des apports en NO_3^- pouvaient déclencher le processus de dénitrification en l'absence de couvert végétal dans des tourbières dégradées (Francez *et al.* 2011). Des analyses par GC-MS permettraient d'identifier et quantifier ces pertes de C et N. Le suivi de la respiration $^{13}\text{C-CO}_2$ montre que le système paraît plus stable à 4 jours qu'à 3 jours.

Au final, nous pouvons affirmer qu'au vu des résultats de marquage et des conditions expérimentales établies, les bases du principe de l'expérimentation sont fiables pour suivre de façon quantitative les transferts C-N-S dans des mésocosmes de tourbe soumis à bioturbation par *E. angustifolium* et *L. rubellus*.

2.4.2. Effet de *L. rubellus* sur la physiologie et les transferts de C, N et S d'*E. angustifolium* vers la tourbe

Des transferts biogéniques en C, N et S d'*E. angustifolium* s'effectuent dès 3 jours vers la tourbe. *E. angustifolium* transfère vers sa rhizosphère de 11 à 45, 11 à 17 et 14 à 19 μg de C, N et S.g^{-1} de plante (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement, ce qui représente respectivement jusqu'à 3, 4 et 41 % des pertes en C, N et S de la plante. Ce taux de rhizodéposition en C est nettement plus faible que les 10 à 40 % mesurés généralement chez les végétaux supérieurs (Grayston *et al.* 1997 ; Nguyen 2003). Ceci peut notamment être expliqué par une forte mobilité du C organique (exsudats racinaires comme les glucides ou les acides aminés) libéré par la plante : au bout de 3 jours une grande quantité du C transféré est retrouvé dans l'eau (DOC) (208 à 492 μg de C.g⁻¹ de plante (masse fraîche).jour⁻¹ = 16 à 24 % des transferts biogéniques). Une partie de ce C organique libéré par les plantes peut également être rapidement respiré par les microorganismes de la tourbe. Il a été montré par traçage avec du ¹³C que les bactéries de la rhizosphère en sol prairial, assimilent et respirent en quelques heures seulement (5 à 48 h) le C photosynthétisé par les plantes (Ostle *et al.* 2003). La respiration d'*E. angustifolium* représente des pertes de 613 à 1327 μg de C-CO₂.g⁻¹ de plante (masse fraîche).jour⁻¹.

Les turnovers en C, N et S journaliers d'*E. angustifolium* ont presque doublé avec la présence de *L. rubellus* (C 0.3 % vs. 0.5 % ; N 2.7 % vs. 4.6 % ; S 2.0 % vs 3.2 %). La présence du ver de terre permet donc d'accélérer le recyclage du C, de l'N et du S de la plante. L'effet de *L. rubellus* sur *E. angustifolium* est principalement indirect, comme le démontre les quantités de C, N et S des vers de terre retrouvés au niveau des parties aériennes (11 μg de N.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹) et racinaires (4, 28 et 1 μg de C, N et S.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹). Les racines d'*E. angustifolium*, qui se sont développées dans les galeries de *L. rubellus* pour s'accroître en longueur, ont pu prélever des molécules carbonées, azotées et soufrées déposées par le ver de terre sur leurs revêtements (mucus et déjections ; Brown *et al.* 2000) ou excrétées dans la tourbe sur une épaisseur

inférieure à 1 mm (Gicquel *et al.* 2012). Les quantités de C, N et S des vers de terre retrouvées au niveau de la rhizosphère (14, 5 et 1 μg de C, N et S.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹) peuvent donc être liées au contact intime des sphères fonctionnelles de ceux deux organismes.

Les rapports stœchiométriques C:N:S de la rhizosphère (185:7:1 \pm 4:0:0) conforte notre hypothèse selon laquelle *E. angustifolium* a un impact plus important sur la dynamique du C, mais également de l’N, comparé au S de la tourbe (146:5:1 \pm 2:0:0). Cet impact se traduit également au niveau des galeries de *L. rubellus*, où le rapport stœchiométrique C:N:S montre un enrichissement en C et un appauvrissement en S quand la source de marquage est la plante (P*E = 190:7:1 \pm 2:0:0 ; PE* = 150:6:1 \pm 2:0:0). Il s’agit là de l’expression d’un trait majeur d’*E. angustifolium* et plus largement des végétaux (Warembourg *et al.* 2003).

2.4.3. Effet d’*E. angustifolium* sur la physiologie et les transferts C-N-S de *L. rubellus* vers la tourbe

L. rubellus transfère dès 3 jours du C, de l’N et du S vers la tourbe. Les quantités transférées vers les galeries (1084 à 1264, 388 à 422 et 25 à 74 μg de C, N et S.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹) sont de 5 à 7 fois plus élevées que celles transférées vers les turricules (179 à 210, 85 à 87 et 16 à 24 μg de C, N et S.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹). Ces transferts représentent respectivement pour les galeries et les turricules, de 5 à 17 % et de 16 à 78 % des pertes en C, N et S du ver de terre. Si les excréments de N se font principalement sous forme N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ et urée (Edwards et Bohlen 1996 ; Whalen *et al.* 2000), le C excrété se présente majoritairement sous forme de polysaccharides (Scheu 1991 ; Zhang et Schrader 1993) et comme suggéré par Gicquel *et al.* (2012) pour le S, sous forme de mucoprotéines. Environ 10 % du C et 4 % du N excrété par *L. rubellus* est retrouvé dans l’eau (DOC et DON), ce qui représente des quantités supplémentaires de C et N (307 à 505 et 4 à 28 μg de C et N.g⁻¹ de ver de terre (masse fraîche).jour⁻¹) disponible pour les plantes vasculaires de tourbières, comme *E. angustifolium*, qui captent les éléments nutritifs dans la nappe d’eau (Li et Vitt 1997).

Les turnovers en N journaliers de *L. rubellus* ont doublé avec la présence d’*E. angustifolium* (0.5 % vs. 1.0 %). Ceci peut être expliqué par le lien intime qui existe entre les sphères fonctionnelles de ces deux organismes dans la tourbe : 1 % du C, 10 % du N et 52 % du S transféré par *E. angustifolium* est retrouvé dans les galeries de *L. rubellus*, ce qui

représente des quantités de 27, 74 et 37 μg de C, N et S. g^{-1} de plante (masse fraîche).jour⁻¹. Il est également intéressant de relever que 19 % de la quantité de S transférée par *E. angustifolium* est retrouvée dans *L. rubellus*, ce qui représente une quantité de 2 μg de S. g^{-1} de plante (masse fraîche).jour⁻¹. Les vers de terre ayant été mis préalablement à déféquer avant les analyses C-N-S, nous pouvons assurer que le S provenant d'*E. angustifolium* a été incorporé dans les tissus de *L. rubellus*. En effet, les vers de terre qui se développent à proximité des racines peuvent se nourrir de radicules ou de composés issus de la rhizodéposition comme le mucilage ou les exsudats racinaires (Doube et Brown 1998 ; Brown *et al.* 1999). Même si nous n'avons pas mesuré de transferts significatifs de C et d'N de la plante vers le ver de terre, des quantités de C et d'N de la plante sont retrouvées dans les turricules (7 et 3 μg de C et N. g^{-1} de plante (masse fraîche).jour⁻¹ respectivement). Ce qui confirme que des morceaux de racines et/ou des rhizodépôts de la plante ont transité par le tube digestif de *L. rubellus*. L'impact positif de la présence de la plante sur la composition isotopique en ¹³C du ver de terre ne s'explique pas par les turnovers en C journaliers de *L. rubellus* qui sont du même ordre avec ou sans la présence de *E. angustifolium* (respectivement 0.9 et 0.8 %). Pour *L. rubellus*, Le S est l'élément qui présente les turnovers journaliers les plus rapides comparé au C et au N (2.0 et 2.2 %).

En accord avec notre hypothèse de départ, les vers de terre ont un plus grand impact sur le S du milieu que les plantes comme l'atteste le rapport stœchiométrique C:N:S basé sur les transferts du ver de terre (59:10:1 \pm 0:5:0) et comparé à celui des plantes (76:22:1 \pm 2:1:0). Cet impact se traduit également au niveau de la rhizosphère d'*E. angustifolium*, où le rapport stœchiométrique C:N:S montre un enrichissement en S quand la source de marquage est le ver de terre (P*E = 185:7:1 \pm 2:0:0 ; PE* = 166:6:1 \pm 10:0:0). Il s'agit là d'un trait spécifique à *L. rubellus* qui mériterait d'être affiné par des travaux complémentaires sur des espèces lombriciennes de catégories écologiques différentes.

2.4.4. Impact d'*E. angustifolium* et *L. rubellus* sur la fonction de « puits » d'une tourbière en régénération

A partir des mesures de flux calculées à l'échelle de l'individu plante et ver de terre, il nous est possible d'estimer, connaissant la densité en individus dans la tourbière de Baupte, les quantités de C, N et S d'origines biogénique transférées dans la tourbe à l'échelle de l'écosystème. Les transferts ainsi estimés sont de 16.7 ± 1.0 g de C. $\text{m}^{-2}.\text{an}^{-1}$, 10.2 ± 3.2 g de

$\text{N.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ et $1.2 \pm 0.1 \text{ g de S.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ (à raison de $10.5 \text{ L. rubellus.m}^{-2}$, $15 \text{ E.angustifolium.m}^{-2}$, d'une activité lombricienne moyenne de $250 \text{ jours.an}^{-1}$ et d'une longueur de saison de végétation de $180 \text{ jours par an}^{-1}$).

Les transferts de C, d'N et de S entre les plantes et les vers de terre ont un impact important sur le fonctionnement de l'écosystème tourbière. En effet, nous démontrons pour la première fois, à notre connaissance, que la présence conjointe de ces deux organismes ingénieurs permet d'améliorer leurs turnovers en C, N et S. Les vers de terre sont des organismes importants pour le fonctionnement des tourbières anciennement exploitées car ils fournissent à la tourbe des apports en nutriments carbonés, azotés et soufrés, essentiels au soutien des cycles biogéochimiques microbiens et à la productivité de ces écosystèmes généralement pauvres en nutriments. En retour, *E. angustifolium* améliore le turnover en N de *L. rubellus*. Ainsi, notre étude conforte l'hypothèse selon laquelle les vers de terre constituent des relais à la recolonisation végétale et au processus de retour à un fonctionnement « puits » des tourbières anciennement exploitées.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par le programme ECCO-PNBC financé par l'INSU-CNRS et le programme ANR-VMC PEATWARM financé par l'Agence Nationale de la Recherche. Il a également été soutenu par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Français à A. Gicquel.

Références

- Bardgett RD, Freeman C, Ostle NJ (2008) Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME J* 2:805-814
- Bazot S, Blum H, Robin C (2007) Nitrogen rhizodeposition assessed by a $^{15}\text{NH}_3$ shoot pulse-labelling of *Lolium perenne* L. grown on soil exposed to 9 years of CO_2 enrichment. *Environ Exp Bot* 63:410-415
- Binet F, Curmi P (1992) Structural effects of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on the soil-organic matter system: Micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol Biochem* 24:1519-1523
- Binet F, Tréhen P (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biol Biochem* 24:1501-1506
- Binet F, Fayolle L, Pussard M (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biol Fertil Soils* 27:79-84
- Binet F, Kersanté A, Munier-Lamy C, Le Bayon RC, Belgy MJ, Shipitalo MJ (2006) Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol Biochem* 38:1255-1263

- Bohlen PJ, Parmelee RW, Blair JM (2004) Integrating the effects of earthworms on nutrient cycling across spatial and temporal scales. In: Edwards CA (ed) *Earthworm Ecology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 161-180
- Brown GG, Pashanasi B, Gilot C, Patrón JC, Senapati BK, Giri S, Barois I, Lavelle P, Blanchart E, Blakemore RJ, Spain AV, Boyer J (1999) Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: Lavelle P, Brussaard L, Hendrix PF (eds), *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*, CAB International, Wallingford, UK, 1999, pp 87–147
- Brown GG, Barois I, Lavelle P (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol* 36:177–198
- Clymo RS (1983) Peat. In: Gore AJ (ed), *Mires: swamp, bog, fen and moor. Ecosystems of the world*, 4A, Elsevier Scientific Publishing, USA, New York, pp 159-224
- Curry JP, Byrne D, Boyle KE (1995) The earthworm population of a winter cereal field and its effects on soil and nitrogen turnover. *Biol Fert Soils* 19:166-172
- Curry JP, Schmidt O (2006) Long-term establishment of earthworm populations in grassland on reclaimed industrial cutaway peatland in Ireland. *Suo* 57:65-70
- Dise NB, Verry ES (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry* 53:143-160
- Doube BM, Brown GG (1998) Life in a complex community: Functional interactions between earthworms, organic matter, microorganisms and plants. In: Edwards CA (ed), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA, pp 179–211
- Dyckmans J, Scrimgeour CM, Schmidt O (2005) A simple and rapid method for labelling earthworms with ¹⁵N and ¹³C. *Soil Biol Biochem* 37:989-993
- Edwards WM, Shipitalo MJ, Dick WA, Owens LB (1989) Water and nitrate movement in earthworm burrows within long-term no-tillage cornfields. *J Soil Water Conserv* 44:240-243
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) *Biology and ecology of earthworms*. 3rd edn. Chapman and Hall, London
- Edwards WM, Shipitalo MJ (1998) Consequences of earthworms in agricultural soils: Aggregation and porosity. In: Edwards CA (ed), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA, pp 147-161
- Francez AJ, Loiseau P (1999) Devenir de l'azote minéral dans une tourbière à *Sphagnum fallax* Klinggr. et *Carex rostrata* Stokes du Massif central (France). *Can J Bot* 77:1136-1143
- Francez AJ, Gogo S, Josselin N (2000) Distribution of potential CO₂ and CH₄ productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany (France). *Eur J Soil Biol* 36:161-168
- Francez AJ, Pinay G, Josselin N, Williams BL (2011) Denitrification triggered by nitrogen addition in *Sphagnum magellanicum* peat. *Biogeochemistry* 106:435-441
- Garnier E, et al. (2007) Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: a standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Ann Bot-London* 99:967–985

- Gicquel A, Francez AJ, Delhaye T, Gruau G, Hallaire V, Binet F (2012) Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Biogeochemistry* doi:10.1007/s10533-012-9714-3
- Grayston SJ, Vaughan D, Jones D (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol* 5:29-56
- Hooper DU, Chapin FS III, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 75:3-35
- Jégou D, Cluzeau D, Hallaire V, Balesdent J, Tréhen P (2000) Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *Eur J Soil Biol* 36:27-34
- Joergensen RG (2000) Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biol Biochem* 32:647-652
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69:373-386
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1997) Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78:1946-1957
- Kattge J, et al. (2011) TRY – a global database of plant traits. *Glob Change Biol* 17:2905-2935
- Komulainen VM, Tuittila ES, Vasander H, Laine J (1999) Restoration of drained peatlands in southern Finland: initial effects on vegetation change and CO₂ balance. *J Appl Ecol* 36:634–648
- Lavelle P (1988) Earthworm activities and the soil system. *Biol Fert Soils* 6:237-251
- Li YH, Vitt DH (1997) Patterns of retention and utilization of aerially deposited nitrogen in boreal peatlands. *Ecoscience* 4:106-116
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1-10
- Makulec G (1993) Abundance and biomass of earthworms (Lumbricidae) in hydrogenous soils under various degree of mucking. *Z Probl Postępów Nauk Rol* 406:119-127
- Mariotti A (1991) Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur de la dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *Cahiers ORSTOM, série Pédologie* 26:299-313
- Moore T, Blodau C, Turunen J, Roulet N, Richard PJH (2005) Patterns of nitrogen and sulfur accumulation and retention in ombrotrophic bogs, eastern Canada. *Glob Change Biol* 11:356-367
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23:375-396
- Ostle N, Whiteley AS, Bailey MJ, Sleep D, Ineson P, Manefield M (2003) Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a ¹³CO₂ spike. *Soil Biol Biochem* 35:877-885
- Petrone RM, Waddington JM, Price JS (2001) Ecosystem scale evapotranspiration and net CO₂ exchange from a restored peatland. *Hydrol Process* 15:2839-2845
- Powlson DS, Barraclough D (1993) Mineralization and assimilation in soil-plant systems, in: Knowles R, Blackburn TH (Eds.), *Nitrogen isotope techniques*. Academic Press Inc., San Diego, Calif. pp. 209–242
- Scheu S (1991) Mucus excretion and carbon turnover of endogeic earthworms. *Biol Fert Soils* 12:217-220
- Waddington JM, Warner KD, Kennedy GW (2002) Cutover peatlands: a persistent source of atmospheric CO₂. *Global Biogeochem Cy* 16: 367-375

- Waddington JM, Strack M, Greenwood MJ (2010) Toward restoring the net carbon sink function of degraded peatlands: Short-term response in CO₂ exchange to ecosystem-scale restoration. *J Geophys Res* 115, G01008, doi:10.1029/2009JG001090
- Warembourg FR, Roumet C, Lafont F (2003) Differences in rhizosphere carbon-partitioning among plant species of different families. *Soil Biol Biochem* 256:347-357
- Whalen JK, Parmelee RW, McCartney DA, Vanarsdale JL (1999) Movement of N from decomposing earthworm tissue to soil, microbial and plant N pools. *Soil Biol Biochem* 31:487-492
- Whalen JK, Parmelee RW, Subler S (2000) Quantification of nitrogen excretion rates for three lumbricid earthworms using ¹⁵N. *Biol Fertil Soils* 32:347-352
- Whalen JK, Janzen HH (2002) Labeling earthworms uniformly with ¹³C and ¹⁵N: implications for monitoring nutrient fluxes. *Soil Biol Biochem* 34:1913-1918
- Zhang H, Schrader S (1993) Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates. *Biol Fertil Soils* 15:229-234

CHAPITRE V

Le changement climatique affecte le fonctionnement des tourbières à Sphaignes : réponses à l'échelle des communautés et de l'écosystème

1. Synopsis

L'augmentation attendue de 2 à 8 °C des températures de l'air d'ici 2100 dans l'hémisphère boréal, est susceptible de déstabiliser gravement le fonctionnement « puits » de C des tourbières en libérant dans l'atmosphère de grandes quantités de C initialement stockées dans la tourbe. La réponse des tourbières tempérées au changement climatique dépendra en particulier du niveau d'altération des composantes biotiques (micro-mésosofaune et plantes) et des modifications de flux d'éléments qui en résulteront. En effet, le glissement d'une fonction « puits » à une fonction « source » des tourbières peut être accéléré ou ralenti par l'activité de l'un et/ou de l'autre de ces organismes qui régulent les voies privilégiées de décomposition ou d'accumulation du C à l'échelle de l'écosystème. De ce fait, nous avons privilégié deux niveaux d'organisation dans notre étude, celui de la communauté en examinant la réponse des communautés microbiennes impliqués dans le cycle du C et celui de l'écosystème, en considérant simultanément les flux C-N-S traversant les compartiments majeurs (plantes, mésosofaune, microorganismes et tourbe) de la tourbière. Le but ultime est de déterminer dans quelle mesure l'augmentation modérée de la température altère la fonction de « puits » de la tourbière.

Le premier article (article 4) intitulé « Climatic changes reduce the microbial-C incorporation and C-cycling in a temperate *Sphagnum*-dominated peatland », a pour objectif, d'une part, d'évaluer par traçage isotopique ^{13}C l'impact d'un réchauffement climatique expérimental sur la biomasse, la structure et les flux de C des communautés microbiennes d'une tourbière à Sphaignes et, d'autre part de comparer la réponse des communautés microbiennes à ce réchauffement dans deux stades dynamiques de la tourbière, le fen (bas-marais) et le bog (haut-marais). Le réchauffement climatique a été provoqué en utilisant des « Open Top Chambers » (OTCs). Cette étude a permis de démontrer qu'une augmentation modérée de la température de 1 °C d'une durée de deux ans diminuait significativement les flux de C traversant le compartiment microbien. A l'échelle des communautés, l'activité des bactéries anaérobies, des champignons et des protozoaires (estimée par SIP ^{13}C -PLFAs) est significativement ralentie. Le bog est l'habitat qui est le plus affecté par le changement climatique : les flux totaux de C incorporé dans les PLFAs du pool microbien actif sont en moyenne 18 fois plus faibles en conditions de réchauffement (OTCs). Ceci peut être expliqué par une augmentation du stress hydrique des communautés microbiennes indirectement induit par l'augmentation de température.

La deuxième partie de ce chapitre (article 5) traite de l'impact du changement climatique sur les flux C-N-S dans le fen et le bog. Nos résultats démontrent que les habitats fen et bog des tourbières ne répondent pas d'une manière similaire aux forçages climatiques, notamment vis-à-vis des biomasses microbiennes C, N et S qui sont positivement influencées par le réchauffement climatique en fen ($\approx \times 2$). L'augmentation modérée de 1°C simulée par OTCs diminue significativement les flux de C à l'échelle de l'écosystème, la production primaire des sphaignes étant la plus affectée en bog et fen ($\times - 2$ à $- 8$). La diminution de productivité de ce compartiment peut être favorable au glissement vers une fonction « source » de C des tourbières car les sphaignes régulent la croissance des végétaux vasculaires et les activités de minéralisation de la tourbe par la production de composés inhibiteur (phénols et acides sphagniques).

2. Climatic changes reduce the microbial-C incorporation and C-cycling in a temperate *Sphagnum*-dominated peatland (article 4)

Aurélien Gicquel^{1,4}, Laurent Grasset^{2,4}, Françoise Binet^{1,4}, Claude Le Milbeau^{3,4}
et André-Jean Francez^{1,4}

¹UMR CNRS 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

²UMR CNRS 6514 SRSN, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022 Poitiers, France

³UMR CNRS 6113 ISTO, Université d'Orléans, 1A rue de la Férollerie, F-45071 Orléans Cedex 2, France

⁴Projet ANR PEATWARM “Effects of experimental warming on carbon sink function of a temperate *Sphagnum*-peatland” <http://peatwarm.cnrs-orleans.fr/>

Abstract

Sphagnum-dominated peatlands are ecosystems that accumulate organic matter and function as a carbon (C) sink. In the perspective of a climatic change, one of the short-term scenarios (2100) is the increase of organic matter decomposition and microbial activity. In this way, peatland functioning could shift from a C-sink to a source of C to the atmosphere. The aim of our study was to quantify the effect of a moderate increase of temperature in the atmosphere (+ 1 °C approximately) on the structure and activity of microbial communities along a narrow fen-bog gradient using an open top chamber system (OTC). The structure of microbial communities and activity were analyzed using a SIP ¹³C-PLFAs in order to quantify ¹³C-incorporation in the main groups of microorganisms (aerobic and anaerobic bacteria, fungi and protozoa) and their heterotrophic C-activity. Peat cores have been sampled in a narrow fen-bog gradient in plots submitted (+ 1 °C) or not to climatic change (OTC device) after 27 months following the start of the experiment (Frasne peatland, France). Peat mesocosms were labelled with ¹³C-glucose and incorporation in PLFAs measured after 24 and 144 h. Microbial C-biomass significantly increased with increase of temperature in the fen ($\times 1.7$) but stoichiometric ratios (C:N and C:S) were not impacted by climate warming. Heterotrophic activity is significantly smaller in the fen compared to the bog, whatever the treatment. The C-incorporation in the different microbial pools significantly decreased in the bog and total heterotrophic activity decreased from 1996 ± 103 (control) to 111 ± 4 ng C.g⁻¹ dry peat day⁻¹ (OTC treatment). There were not significant changes in the fen (57 ± 23 and 71 ± 6 ng C.g⁻¹ dry peat day⁻¹ (with and without OTC respectively)). The consequences of microbial structure and activity changes on the C-sink functioning are discussed.

Keywords: fen, bog, open-top chambers, SIP ¹³C-PLFA, bacteria, fungi, protozoa, microbial biomass, microbial C-flux

2.1. Introduction

Peatlands only cover 3 % of continental areas of the Earth but store 455 Pg C that represents approximately 30 % of the carbon (C) pool sequestered in the soils (Gorham 1991). The C-sink functioning of *Sphagnum*-dominated peatlands results from low temperature, water excess, anaerobiosis and oligotrophy acting in synergy to slow down the decomposition of organic matter (Clymo 1983; Laiho 2006). The increase of temperature at a global scale, from 2 to 8 °C in the boreal hemisphere by 2100 (IPCC 2007) are susceptible to strongly disturbed the functioning of the ecosystems, especially wetlands and peatlands (Strack *et al.* 2008). The main effects that are predicted are the acceleration of organic matter decomposition and mineralisation and a potential shift from a C-sink to a C-source functioning of *Sphagnum*-dominated peatland and the release of C in the atmosphere and available nutrients in the peat for plants and microorganisms (Rustad *et al.* 2001). The shift from a C-sink to a C-source functioning in boreal peatlands should depend on the availability of nutrients such as nitrogen (N) (Turunen *et al.* 2004; Limpens *et al.* 2011) or sulphur (S) (Dise and Verry 2001). The increase of nutrient availability might enhance the microbial activity and C-losses by respiration (Updegraff *et al.* 2001). The functional changes might be accelerated or decreased, depending on the coupled responses of microbial and plant communities. Climatic warming could have a positive effect on height increment and biomass of *Sphagnum* decreasing bulk densities of mosses (Breeuwer *et al.* 2008) while vascular plant differ in their responses to elevated temperatures, depending on life-forms and species characteristics of fen and bog communities (Weltzin *et al.* 2000).

Microbial communities and activities of *Sphagnum*-dominated peatlands are known to be very sensitive to small changes (Francez *et al.* 2011) and they constitute good indicators of functioning change in the peatlands as the microbial loop is disturbed with the decreasing of bacterial predation by Thecamoeba (Gilbert *et al.* 1998; Mitchell *et al.* 2003). Studies on the effect of climatic warming on microbial activity and community structure are scarce and the responses seem quite different from one group to each other. For instance, the temperature increase and the concomitant changes of peat humidity leads to changes in the physiology and growth of certain soil bacteria (Panikov 1999; Avrahami *et al.* 2003) while Fungi seem to be more tolerant to hydric stress (Holland and Coleman 1987). Recently, Jassey *et al.* (2011a) also reported a 2 time increase in the biomass of *Sphagnum* Thecamoeba following a 10 °C temperature increase in a laboratory experiment.

In the world regions without permafrost, the main categories of *Sphagnum*-dominated peatlands are based on the fen-bog distinction (Rydin and Jeglum 2006). These two kinds of habitats differ in their hydrology, plant communities and nutrient availability (Wheeler and Proctor 2000; Bridgham *et al.* 2001). That is the reason why it can be expected differences in their responses to climatic changes (Weltzin *et al.* 2000; Weltzin *et al.* 2003). Then, it is of crucial importance to take into account these differences to study the climatic change consequences on the functional microbial diversity in *Sphagnum*-dominated peatlands and to assess the durability of peatland ecosystems to store C in the future.

The aim of this study was to assess the impact of a 27 months-moderate warming in the field, using an “open top chamber” (OTC) design, on the microbial pools, the heterotrophic activities and C-incorporation in the main functional microbial groups, i.e. aerobic and anaerobic Bacteria, methanotrophic Bacteria, Fungi, and Protozoa (Gilbert *et al.* 1998; Jassey *et al.* 2011ab). Our hypotheses were: i) the microbial biomass increased with warming; ii) the climate warming impacts the structure of microbial communities; iii) the microbial specific activities are differently affected in the fen compared to the bog and, consequently, iv) climatic warming modifies the C-cycling at the ecosystem level. In order to establish the role of the most important microbial groups implied in the C-cycling in *Sphagnum*-dominated peatlands we used a SIP ^{13}C -PLFA that allow to reveal the different rates of C-incorporation in the main functional microbial groups (Boschker and Middelburg 2002).

2.2. Materials and methods

2.2.1. Main characteristics of the study site

The *Sphagnum*-dominated peatland of Frasné is located in the French Jura mountains (46° 49' 35" N; 6° 10' 20" E) at an altitude of 840m above sea level. The climate is semi-continental with a mean January temperature of $-1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a mean July temperature of $14.6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mean annual air temperature during the field-experiment (2008-2010) was $6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and precipitations reached 1200 mm.

Sphagnum fallax lawns with *Carex rostrata* and *Andromeda polifolia* are the main dominated plants of the fen while bog is characterized by *Sphagnum magellanicum* and *S. capillifolium* hummocks mixed with *Eriophorum vaginatum* and *Vaccinium oxycoccos*.

2.2.2. Experimental device and simulated OTC climate change

The experimental device of the PEATWARM project consisted of 3 replicates \times climatic treatment (control vs. OTC) in a narrow fen-bog gradient, i.e. 12 plots (see Jassey *et al.* 2011b for more details) installed since May 2008 for a long term design.

The 3-years results of climatic change induced by the presence of OTCs showed a moderate increase of air-temperature i.e. + 1 °C at 10 cm above vegetation (Delarue *et al.* 2011; Jassey *et al.* 2011b).

2.2.3. Mesocosm sampling and ^{13}C labelling

August 2010, the peat/plant cores (10 cm diameter \times 25 cm high) were excavated from *Sphagnum fallax* lawns in the fen and *Sphagnum magellanicum* hummocks in the bog plots. Each peat/plant mesocosm consisted of a peat core placed in a 5 L container filled with a poor nutrient water source (Mont-Dore, $[\text{HCO}_3^-] = 25.8 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{SO}_4^{2-}] = 1.1 \text{ mg.L}^{-1}$; $[\text{NO}_3^-] = 0.8 \text{ mg.L}^{-1}$). The water table level in each container was adjusted to 10 cm deep under the *Sphagnum capitula* layer using the same water as described above. The peat/plant mesocosms were placed in a climatic chamber (Convicon GR96, with a 16 h photoperiod; light conditions = 10 to 150 μmol ; temperature = 10°C-night and 15°C-day; humidity = 70 \pm 5%)

Peat mesocosms were labelled with 0.26 g of ^{13}C -glucose (D-glucose, U- $^{13}\text{C}_6$ at 99 Atom %; Euriso-top, C.E. Saclay, Gif-sur-Yvette, France) mixed to the water in each 5 L container (t_0). The study was conducted as a nested randomized block design with 4 treatments in three replicated blocks. Three “bog” and three “fen” cores were sampled at $t = 24 \text{ h}$ ($t_{24\text{h}}$) and $t = 144 \text{ h}$ ($t_{144\text{h}}$) following the beginning of incubation in the climatic chamber. Microbial variables have been analyzed in the peat under the living *Sphagnum* layer, between 7.5 and 12.5 depth, corresponding approximately to the interface between acro- and catotelm (constant anaerobic layer).

2.2.4. Microbial biomass

Microbial C, N and S contents were estimated for bog and fen on all samples with the fumigation-extraction method, using a peat-modified protocol for C and N (Williams and Silcock. 1997; Francez *et al.* 2000) and following these of Wu *et al.* (1994) for microbial

biomass-S. Soluble C and N were extracted in a 0.5M K₂SO₄ solution and soluble S in a 0.01 M CaCl₂ solution. C content in the extracts was determined using a TOC Bioritech analyser (1010 OI Analytical). N soluble was oxidized using a persulfate solution at 120°C during half an hour and then nitrates in the extracts were measured after reduction on a copper-cadmium column with a AA3-Bran + Luebb analytical chain. S concentrations in the extracts were measured using an ICP-AES analyser (Jobin-Yvon 238, Horiba) at the INRA-laboratory of Soil Analyses (Arras, France). The microbial biomass C, N and S results from the difference between fumigated and non-fumigated samples, corrected with the k_C , k_N and k_S values of 0.45 (Sparling *et al.* 1990), 0.54 (Brookes *et al.* 1985) and 0.35 (Wu *et al.* 1994), respectively. C-N-S pools in the biomass were used to estimate C:N and C:S that give some information on the structure of the microbial communities.

2.2.5. Structure of microbial communities - PLFAs

Phospholipids-fatty acids (PLFAs) were extracted on freeze-dried peat samples using the Bligh and Dyer method (1959), in accordance to modified protocol for peat (Andersen *et al.* 2010). Briefly, peat samples (250 mg) were shaken during one hour in a phosphate-buffer (0.1M; pH 7):CHCl₃:MeOH (0.9:1:2 v/v/v) solution. Then, equal volumes of phosphate buffer and chloroform are added and the 2 phases separated during 24 h in the dark. The CHCl₃-lipidphase is then split into neutral, glyco- and phospholipid in a silicic acid column by eluting chloroform, acetone and methanol respectively. Phospholipids were transesterified into fatty acid methyl esters (FAMES) after a 20 min incubation time at 40 °C in a MeOH:toluene:KOH (4:1:1 v/v/v) solution. FAMES were analysed by means of GC-MS and quantified using a GC apparatus (Trace GC, Thermo Finnigan) equipped with a Supelco Equity 5-fused silica column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness) coupled to a mass spectrometer (Quadrupole DSQ II, Thermo Finnigan). Helium was employed as the carrier gas at a constant flow rate. Methyl nonadecanoate (C₁₉O₂Me) was used as internal standard. Strict location of double bounds was realized by derivatization of FAMES into picolinyl esters on representative samples (Wretensjö *et al.* 1990).

Values of $\delta^{13}\text{C}$ in each FAME were determined by GC-C-IRMS using a HP5860-GC (Hewlett Packard) equipped with a BPX 5 column (60 m length, 0.32 mm internal diameter, 0.25 µm film thickness) coupled to a Micromass Optima, Fisons/VG/Micromass -IRMS via a combustion interface Isochron III, heated to 850°C. Helium was employed as the carrier gas.

Ultra pure ^{13}C -dioxide was injected at known concentration 3 times before and after each analysis. All values (‰) were reported to the standard Pee Dee Belemnite (PDB). Natural $\delta^{13}\text{C}$ -abundances have also been estimated for each FAME on un-labelled peat samples ($n = 6$).

We used the PLFAs i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 and a17:0 as markers of G+ Bacteria (Frostegård and Bååth 1996); 16:1 ω 7c and cy17:0 as markers of G- Bacteria (Wilkinson 1988; Zelles 1999), 18:2 ω 6,9 as marker of Fungi (Bardgett *et al.* 1996; Frostegård and Bååth 1996; Zelles 1999), 18:1 ω 8c as marker of methanotrophic Bacteria (Ringelberg *et al.* 1989) as well as 20:4 ω 6,9,12,15 as marker of Protozoa (Ringelberg *et al.* 1997). Other PLFAs detected in the samples were not specific to one particular functional group. Therefore, they were not used in the comparisons. We calculated Fungi:Bacteria (F:B) (Bardgett *et al.* 1996), anaerobic:aerobic Bacteria (cy17:0 : 16:1 ω 7c; Kieft *et al.* 1997) and G+:G- Bacteria ratios, as they are important features of the microbial community structure (Bossio and Scow 1998). PLFA concentrations are expressed as $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat.

2.2.6. C-CO₂ and ^{13}C -CO₂ analyses

Respiration was assayed using the static core chamber method and samples incubated in closed jars during one hour at t_0 , $t_{24\text{h}}$ and $t_{144\text{h}}$ ($n = 3$ replicates). Aliquots (12 ml) of the jar atmosphere were sampled via a septum with a syringe and stored in vacutainers (VC309, Labco Limited) prior to analysis by gas chromatography. ^{13}C -CO₂ was analysed by GC-IRMS (Hydra 20-20 IRMS, Europa Scientific, Iso-Analytical Limited - UK). Results are expressed as $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat day⁻¹.

2.2.7. Data analyses

$\delta^{13}\text{C}$ -PLFA values were corrected in each PLFA because of the addition of C-methanol used for transesterification ($\delta^{13}\text{C} = -45.85$ ‰) according to Butler *et al.* (2003):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} = [(C_{\text{PLFA}} + 1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}] / C_{\text{PLFA}} [1]$$

where C_{PLFA} corresponds to the C-number of the considered PLFA.

^{13}C incorporation into a PLFA (ng of $^{13}\text{C}\cdot\text{g}^{-1}$ dry peat) was calculated using the following equation (Moore-Kucera and Dick 2008):

$$^{13}\text{C}_{\text{incorp}} = (F_{\text{tx}} - F_{\text{t0}}) \times [\text{PLFA}_i]_{\text{tx}} \times 1000 \quad [2]$$

where $[\text{PLFA}_i]_{\text{tx}}$ represents the C-concentration ($\mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}$ dry peat) at the end of incubation and F the difference of ^{13}C -concentration between t_0 and the end of incubation t_x , according to:

$$F = ^{13}\text{C} / (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}) = R / (R + 1) \quad [3]$$

with:

$$R = [(\delta^{13}\text{C}_{\text{PLFA}} / 1000) + 1] \times R_{\text{PDB}} \quad [4]$$

and standard PDB, $R_{\text{PDB}} = 0.0112$.

Statistical analyses were carried out using the *R* software (2.12.0 version, *R* Development Core Team) and statistical significance was assigned for P -value < 0.05 for all analyses. ANOVAs were performed using the GLM procedure in order to examine for the main effect of climate (OTCs vs. control) or “habitat” (bog vs. fen) and for corresponding interactions. If necessary, data were log-transformed to homogenize variance prior to running ANOVAs.

2.3. Results

2.3.1. Microbial biomass-C and respiration

Microbial biomass-C ($\times 1.4$) and respiration ($\times 1.3$) were higher in the bog compared to the fen (Figure 1a and Table 1). Climatic warming significantly enhanced microbial biomass in the fen ($\times 1.7$), corresponding to an increase of about 3 to 4 mg $\text{C}\cdot\text{g}^{-1}$ dry peat compared to the control (Figure 1a and Table 1). There were not significant effect of climate warming and habitat on the C:N and C:S ratios of the microbial biomass (Figures 1b-c and Table 1).

Respiration rates decreased with incubation time ($\times 1.4$), whatever the site (Figure 1d and Table 1).

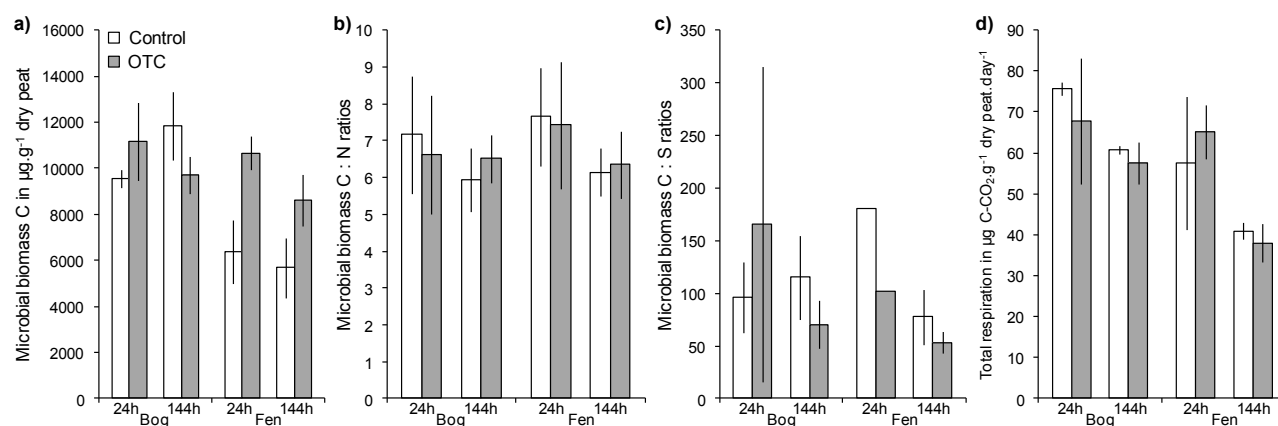


Figure 1. Microbial biomass-C (a), C:N (b) and C:S (c) ratios in the microbial biomass and total C-CO₂ release (d) in the fen and the bog under (grey) or not (white) climatic changes (mean \pm S.E.; $n = 2$ or 3)

Table 1. Significance values of ANOVAs analyses

	MB C	MB C:N	MB C:S	C- CO ₂	[PLFA] F:B	[PLFA] G+:G-	[PLFA] Anaer:Aer	¹³ C _{incorp} F:B	¹³ C _{incorp} G+:G-	¹³ C _{incorp} Anaer:Aer	¹³ C- CO ₂
Bog (vs. Fen)	*** +	ns	ns	** +	ns	ns	*** +	nd	ns	ns	*** +
OTC (vs. Control)	* +	ns	ns	ns	ns	ns	ns	nd	ns	ns	ns
t144h (vs. t24h)	ns	ns	ns	*** -	ns	* +	*** +	nd	ns	ns	ns
[PLFA]	i15:0	a15:0	i16:0	i17:0	a17:0	16:1 ω 7	cy17:0	18:2 ω 6	18:1 ω 8	20:4 ω 6	
Bog (vs. Fen)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
OTC (vs. Control)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
t144h (vs. t24h)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	** -	ns	
¹³ C _{incorp} PLFA	i15:0	a15:0	i16:0	i17:0	a17:0	16:1 ω 7	cy17:0	18:2 ω 6	18:1 ω 8	20:4 ω 6	
Bog (vs. Fen)	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	ns	nd	
OTC (vs. Control)	** -	nd	nd	nd	nd	*** -	nd	nd	* -	nd	
t144h (vs. t24h)	ns	nd	nd	nd	nd	** +	nd	nd	* +	nd	

The sample sizes were 2 or 3. + and – represent positive and negative effects of habitat (Bog), climate (OTC) and incubation time (t144h) on the variables: Microbial biomass-C (MB C), microbial biomass C:N (MB C:N) and C:S (MB C:S) ratios, total C-CO₂ respiration (C-CO₂), Fungi:Bacteria ratio (F:B), G+:G- Bacteria ratio (G+:G-), anaerobic:aerobic Bacteria ratio (Anaer:Aer), ¹³C-CO₂ respiration (¹³C-CO₂), PLFA concentrations ([PLFA]) and ¹³C incorporation into PLFAs (¹³C_{incorp} PLFA). nd = non defined, ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

2.3.2. Structure of microbial communities – PLFA profiles

Whatever the considered PLFA, there was not any significant effect of site (bog vs. fen) and climate warming (OTCs vs. control) on PLFA concentration (Figure 2 and Table 1). Methanotrophs (18:1 ω 8) decreased ($\times - 1.7$) between t_{24h} and t_{144h} (Figure 2 and Table 1). The

16:1 ω 7 (G- Bacteria, 3 up to 8 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat), 18:2 ω 6 (Fungi, 4 up to 16 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat) and 18:1 ω 8 (methanotrophs, 5 up to 13 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat) dominated the microbial communities while i16:0, i17:0 and a17:0 (G+ Bacteria, < 2 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat) and 20:4 ω 6 (Protozoa, < 1 $\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat) were less dominant. Total PLFAs was not affected by climatic change, whatever the site (Table 2).

We did not observe any impact of climatic change on the F:B, G+:G- and anaerobic:aerobic Bacteria ratios (Figure 3 and Table 1). Anaerobic:aerobic Bacteria ratio was higher in the bog compared to the fen. ($\times 1.2$, see Figure 3C1 and Table 1) while F:B ratio was highly variable and did not enable us to use this ratio as an indicator of change (Figure 3A1 and Table 1).

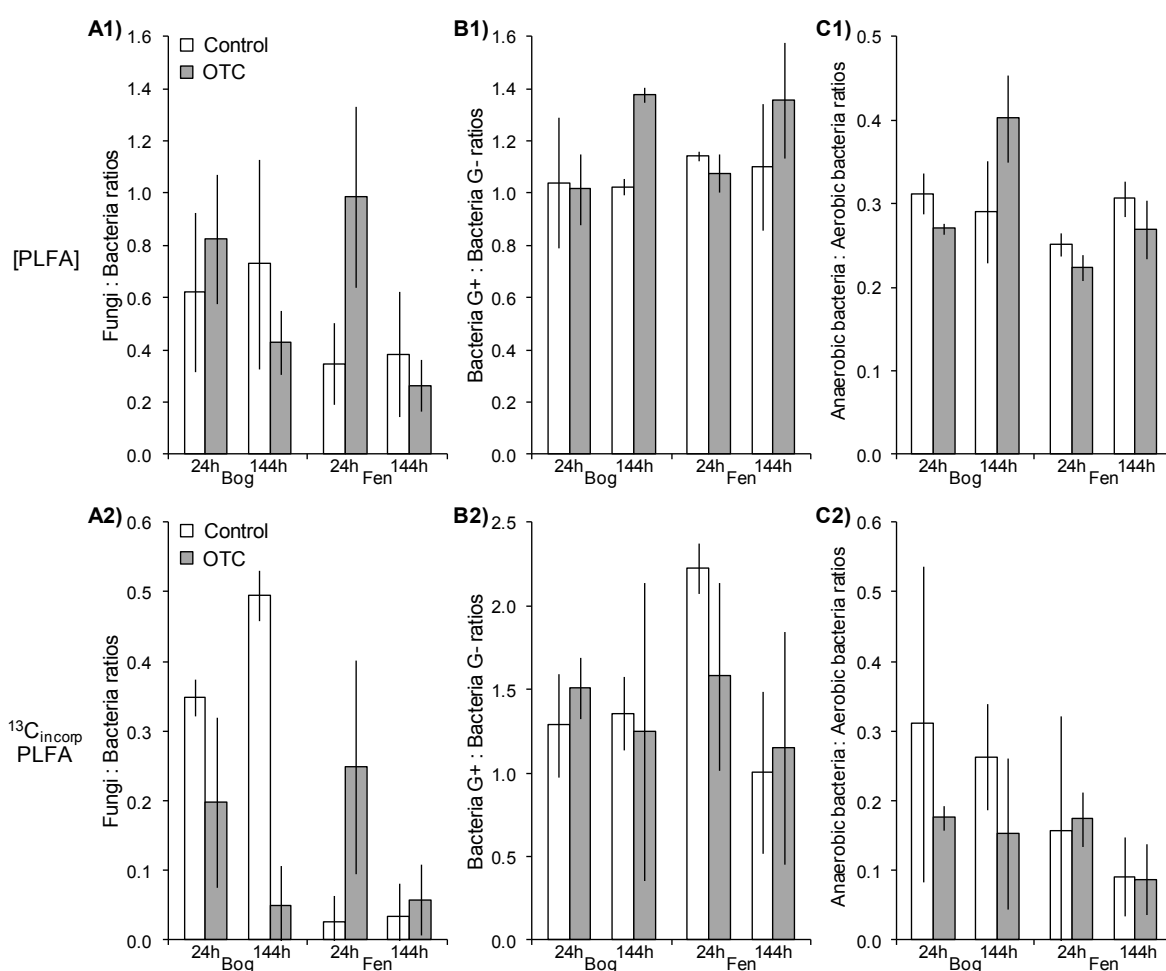


Figure 3. Fungi:Bacteria (A), G+:G- Bacteria (B) and anaerobic:aerobic Bacteria (C) ratios using PLFAs calculation from total PLFAs concentrations (1) and from amounts of ^{13}C -recovered in the different pools of PLFAs (2) in the bog and the fen submitted to a climate warming (OTC = grey) or not (control = white) (mean \pm S.E.; $n = 2$ or 3)

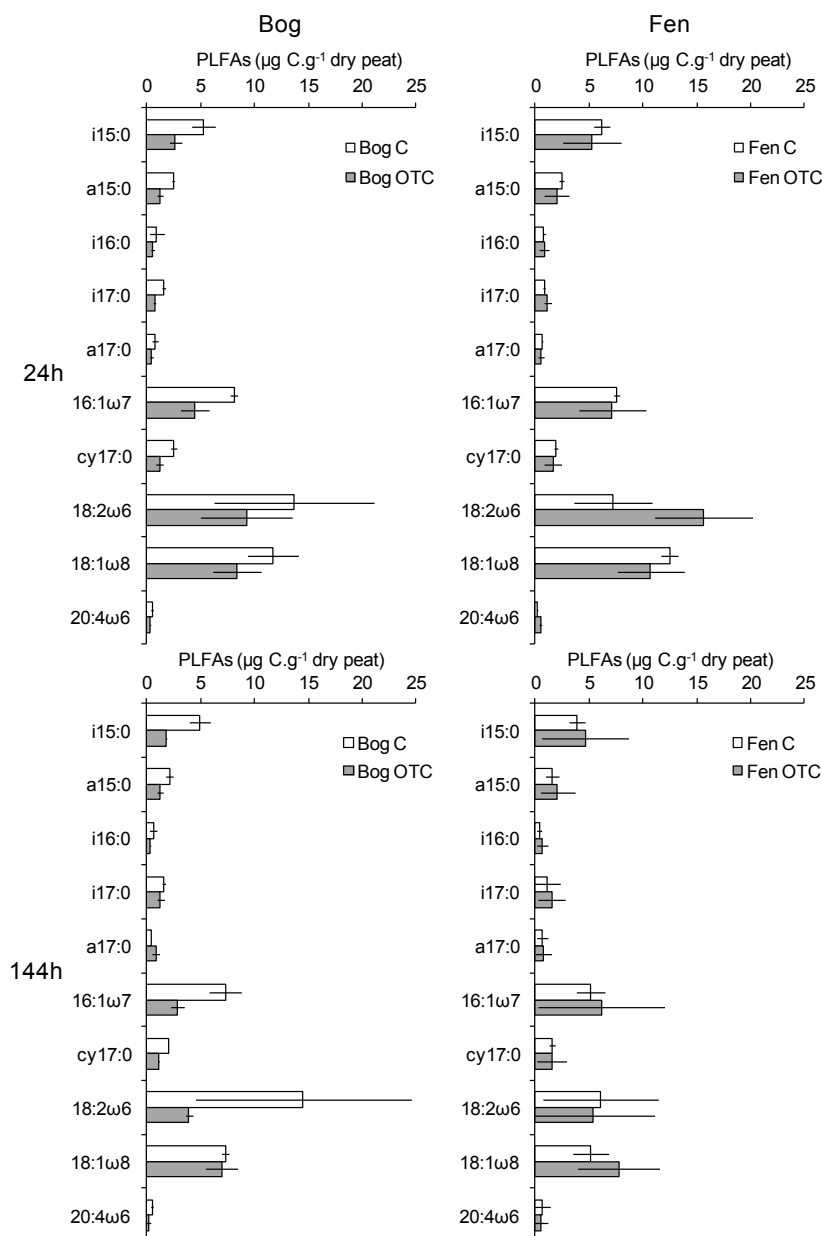


Figure 2. Characterization of microbial community structure: PLFA profiles in the bog and the fen, submitted or not to climate warming (mean \pm S.E.; $n = 2$ or 3)

Table 2. Total PLFAs concentrations and total ^{13}C incorporation into PLFAs in bog and fen under or not climatic change

	Bog				Fen				Statistic significance
	Control		OTC		Control		OTC		
	24 h	144 h	24 h	144 h	24 h	144 h	24 h	144 h	
Total PLFAs ($\mu\text{g C.g}^{-1}$ dry peat)	47 \pm 11	41 \pm 13	29 \pm 9	20 \pm 3	40 \pm 4	26 \pm 13	45 \pm 14	31 \pm 26	
Total incorp. PLFAs ($\text{ng } ^{13}\text{C.g}^{-1}$ dry peat)	19 \pm 5	126 \pm 49	3 \pm 1	9 \pm 6	16 \pm 18	20 \pm 1	19 \pm 13	22 \pm 16	OTC**, D*

The sample sizes were 2 or 3 (mean \pm S.E.). Significance values are indicated for the effects of habitat (H), climate warming (OTC) and incubation time (D). ANOVAs were performed using the GLM procedure, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

2.3.3. ^{13}C -CO₂ release and ^{13}C -incorporation into microbial PLFAs

As mentioned above, respiration was significantly higher in the bog, which was also verified with ^{13}C -CO₂ measurements ($\times 1.5$, see Figure 4 and Table 1). There was not any effect of climatic change (OTCs vs. control) on ^{13}C -CO₂ released (Table 1).

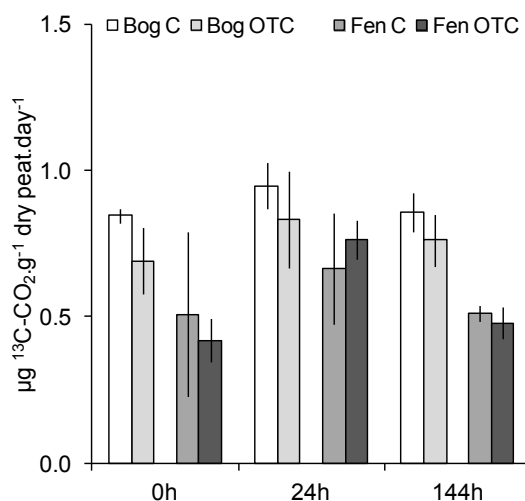


Figure 4. ^{13}C -CO₂ release (0, 24 and 144 h) in the bog and the fen (C= control; OTC = climate warming) (mean \pm S.E.; $n = 3$)

Climatic change significantly affected microbial activity as demonstrated by the decrease of total ^{13}C -incorporation in all the microbial PLFAs in the bog (up to $\times - 14$; Table 2). Total ^{13}C incorporation rate did not show any significant difference between bog and fen while inside the community some differences were observed.

When considered separately, ^{13}C -incorporation in PLFAs differed from one to each other, showing different levels of climatic change impact on microbial communities. Main decreases (up to $\times - 24$ with OTCs) were observed for i15:0 (G+ Bacteria), 16:1 ω 7 (G-Bacteria) and 18:1 ω 8 (methanotrophic Bacteria) (Figure 5 and Table 1).

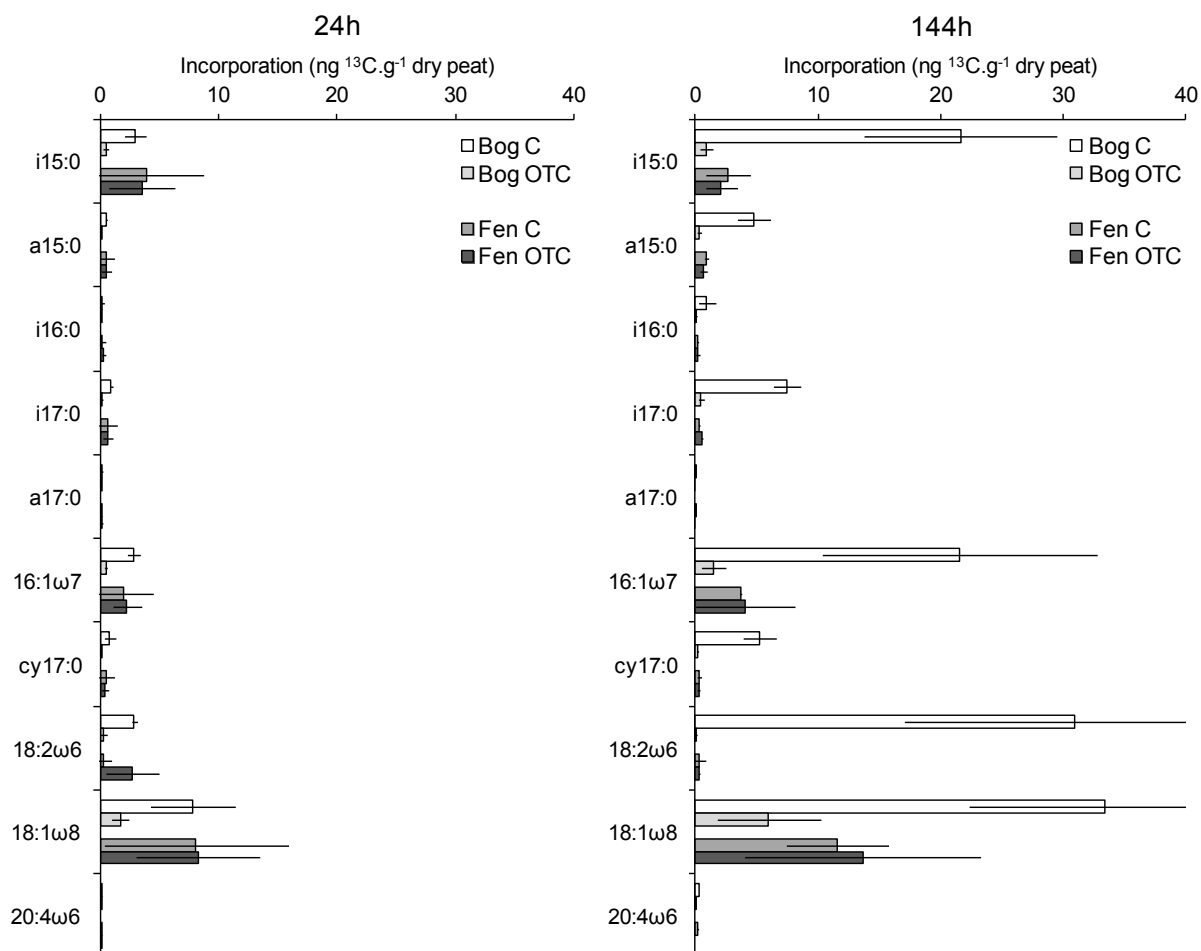


Figure 5. ^{13}C incorporation into PLFAs (24 and 144 h) in the bog and the fen, submitted or not to climate warming (mean \pm S.E.; $n = 2$ or 3)

2.4. Discussion

2.4.1. Climate effect on respiration, microbial biomass-C and community structure

Microbial biomass-C and respiration were higher in the bog compared to the fen, that is in agreement with a lower water table level and better conditions (aerobiosis) for microbial activity (Blodau *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2006). Our values were higher ($\times 2$ -4) than those reported for natural or disturbed *Sphagnum*-dominated peatlands (Francez *et al.* 2000; Blodau *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2006; Basiliko *et al.* 2007), maximum values reaching to 12 mg C.g^{-1} dry peat.

According to our hypothesis, 27 months of climate warming, via the OTCs setup, seriously impacted microbial activity measured as C-CO₂ release and C-cycling. But the

microbial biomass-C only increased in the fen. Then, it can be assumed that climatic warming affected differently microbial-C of the fen compared to the bog. Climatic change induced by OTCs setup showed different impacts depending on the studied ecosystems. For instance, Li *et al.* (2011) reported an increase of microbial biomass (up to $\times 1.7$) in the soil under OTCs ($\approx + 2$ °C air temperature during 2 years) of two Tibetan meadows while, in the contrary, no significant effect was observed in tallgrass prairie of the U.S.A. (increase of air temperature of $\approx + 1$ °C, using IR system, Zhang *et al.* 2005) or in heathlands and meadows in Swedish Laponia, using OTCs (increase of air temperature of $\approx + 1-2$ °C, Ruess *et al.* 1999).

C:N and C:S of microbial biomass did not change during our experiment. The climate warming did not affect stoichiometry of the microbial communities, both in the fen and the bog. Then, any imbalance between C and nutrients uptake appeared after 27 months of experiment at the community level.

Our second hypothesis expected changes in the composition and structure of microbial communities using PLFAs profiles. The structure of microbial communities, studied via the PLFAs, was comparable between the fen and the bog. We found approximately the same profiles of PLFAs and the ratios (F:B, G+:G-, anaerobic:aerobic Bacteria) used as indicators of possible differences or changes did allow to significantly separate the communities under climate warming. The F:B ratio (≤ 1) clearly showed the communities were mainly Bacteria-dominated, that is in accordance with a rather low C:N ratio (≤ 6) (Wallander *et al.* 2003) for *Sphagnum*-dominated peatlands (Andersen *et al.* 2010). We did not observe significant change in the structure of PLFAs, comparing results from OTCs and control plots, whatever the site (bog vs. fen).

2.4.2. Climate effect on microbial ^{13}C incorporation and C-cycling

We hypothesized that climatic changes induced by OTCs will change the microbial activity, both in the bog and the fen. Our results clearly show that microbial activity is modified, in the bog, following two years of climate warming. Then, despite the fact that climate warming did not significantly changed the structure of microbial communities, their activities and, consequently, C-cycling in the peat are negatively affected. All the main groups of the microbial communities (Bacteria, Fungi and Protozoa) significantly decreased their C-incorporation. Bacteria were strongly affected with a decrease, ranging from $\times - 5$ to $- 24$ under OTCs, depending on the PLFAs (i15:0 and 16:1 ω 7). We also registered a decrease of

the activity of methanotrophs (18:108) that is not in accordance with Krumholz *et al.* (1995). In their experiment, these authors showed that the activity of methanotrophs positively correlated to a temperature increase (up to 30 °C). In our experiment, OTCs modified the air atmosphere ($\approx + 1^\circ\text{C}$) but also the humidity of peat. A decrease of water content in the *Sphagnum* layer and the underlying peat could explain the differences between the two kinds of responses to climatic changes ($T^\circ\text{C}$ vs. $T^\circ\text{C} + \text{Humidity}$). In the fen, initially more waterlogged than the bog, the microclimatic conditions also changed but evapotranspiration reduced the temperature increase, with loss of heat to the atmosphere and a decrease of the thermal peat conductivity (Dabros *et al.* 2010; Jassey *et al.* 2011b). This phenomenon could explain the marginal effect of OTCs in the fen, compared to the bog.

Protozoa are well represented in *Sphagnum* layers. Ciliata and Thecamoeba play a key role in the microbial loop as predators and are very sensitive to change in peatlands (Gilbert *et al.* 1998; Jassey *et al.* 2011a). The presence of PLFAs such as 20:406,9,12,15 (Ringelberg *et al.* 1997) did not allow to distinguish the different groups. Nevertheless, the results of ^{13}C -incorporation in the 20:406,9,12,15 illustrated a significant decrease in activity of Protozoa with climate warming. We can argue that, concomitantly with the decrease of bacterial activity, Protozoa are less active and that could be related to the decrease of species number and biomass of Thecamoeba (Jassey *et al.* 2011a). That is of crucial importance for the functioning of the microbial loop and C-recycling in the ecosystem.

The global C-flux through the total PLFAs depicted in the bog, following a 27-months OTC incubation in our field-experiment decreased ($\times - 18$) from 1996 ± 103 to 111 ± 4 ng C.g^{-1} dry peat.day $^{-1}$ (control vs. OTCs). There were not significant changes in the fen: 57 ± 23 and 71 ± 6 ng C.g^{-1} dry peat day $^{-1}$ (with and without OTC respectively). *Sphagnum*-C fixation is also affected by the presence of OTCs (see Chapter IV-3). Primary production of this important compartment in the functioning of peatland ecosystems was depleted, both in the fen ($\times - 8$, i.e. from 8 ± 3 to 1 ± 1 mg $\text{C.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$) and in the bog ($\times - 2.5$, i.e. from 12 ± 4 to 5 ± 2 mg $\text{C.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$). As N assimilation by these plants was not significantly modified, *Sphagnum*-C:N ratio will tend to decrease, affecting in the short-term the chemical quality of substrate furnished to the microbes. Then, the two mains compartments in the dynamics of *Sphagnum*-dominated peatlands, from fen to bog, acting to peat accumulation process are disturbed with climatic changes. These short-term changes question the durability of the current “C-sink” functioning of peatlands.

2.5. Conclusion

This study allowed us to answer the crucial question of how microbial communities of *Sphagnum*-dominated peatlands respond to climatic changes. We demonstrated that despite minor changes in the structure, activities of the main groups of microorganisms and, especially those implied in the microbial loop were strongly depleted. We also showed that the bog and the fen were not equally affected, in relation to the degree of water-logging, the fen a young state in the dynamics of *Sphagnum*-peatlands being less modified than the bog, more subjected to low temperature increase. At the same time, we demonstrated (see Chapter V-3) that *Sphagnum*-primary production also decreased with climatic change induced by the OTCs, whatever the site (bog or fen). That means this compartment (*Sphagnum* + microorganisms living in them), the “engineer” of the peatland ecosystem leading to peat accumulation, is the most destabilized face to global change.

Regarding the strong destabilisation and dysfunctioning of ecosystems driven by anthropogenic activities at local and global scales, we need to develop models integrating all the changes and disturbances observed at different level of organization. In this way, our data are going to serve in a C-N model for peatland dynamics and the impact of climatic warming on its functioning (Go *et al.* in preparation).

Acknowledgements

This work was part of the “PEATWARM” programme (“Effects of experimental warming on carbon sink function of a temperate *Sphagnum*-peatland”), founded by the ANR-VMC (Agence Nationale de la Recherche- Vulnérabilité-Milieus-Climat/07-VUL-010). Aurélien Gicquel got a grant for his PhD thesis from the French Ministry of Education and Research. We would also thank Nathalie Le Bris-Josselin and Marie-Paule Briand for technical assistance.

References

- Andersen R, Francez AJ, Rochefort L (2006) The physiochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. *Soil Biol Biochem* 38:1375-1387
- Andersen R, Grasset L, Thormann MN, Rochefort L, Francez AJ (2010) Changes in microbial community structure and function following *Sphagnum* peatland restoration. *Soil Biol Biochem* 42:291-301

- Avrahami S, Liesack W, Conrad R (2003) Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ Microbiol* 5:691-705
- Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegård Å (1996) Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fert Soils* 22:261-264
- Basiliko N, Blodau C, Roehm C, Bengtson P, Moore TR (2007) Regulation of decomposition and methane dynamics across natural, commercially mined, and restored northern peatlands. *Ecosystems* 10:1148-1165
- Bligh EG, Dyer WG (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Blodau C, Basiliko N, Moore TR (2004) Carbon turnover in peatland mesocosms exposed to different water table levels. *Biogeochemistry* 67:331-351
- Boschker HTS, Middelburg JJ (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 40:85-95
- Bossio DA, Scow KM (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35:265-278
- Breeuwer A, Heijmans MMPD, Robroek BJM, Berendse F (2008) The effect of temperature on growth and competition between *Sphagnum* species. *Oecologia* 156:155-167
- Bridgham SD, Updegraff K, Pastor J (2001) A comparison of nutrient availability indices along an ombrotrophic-minerotrophic gradient in Minnesota wetlands. *Soil Sci Soc Am J* 65:259-269
- Brookes PC, Landman A, Pruden G, Jenkinson DS (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol Biochem* 17:837-842
- Butler JL, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD (2003) Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Appl Environ Microb* 69:6793-6800
- Clymo RS (1983) Peat. In: Gore AJ (ed), *Mires: swamp, bog, fen and moor*. *Ecosystems of the world*, 4A, Elsevier Scientific Publishing, USA, New York, pp 159-224
- Dabros A, Fyles JW, Strachan IB (2010) Effects of open-top chambers on physical properties of air and soil at post-disturbance sites in northwestern Quebec. *Plant Soil* 333:203-218
- Delarue F, Laggoun-Défarge F, Buttler A, Gogo S, Jassey VEJ, Disnar JR (2011) Effects of short-term ecosystem experimental warming on water-extractable organic matter in an ombrotrophic *Sphagnum* peatland (Le Forbonnet, France). *Org Geochem* 42:1016-1024
- Dise NB, Verry ES (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry* 53:143-160
- Francez AJ, Gogo S, Josselin N (2000) Distribution of potential CO₂ and CH₄ productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany (France). *Eur J Soil Biol* 36:161-168
- Francez AJ, Pinay G, Josselin N, Williams BL (2011) Denitrification triggered by nitrogen addition in *Sphagnum magellanicum* peat. *Biogeochemistry* 106:435-441
- Frostegård Å, Bååth E (1996) The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* 22:59-65

- Gilbert D, Amblard C, Bourdier G, Francez AJ (1998) The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function, and impact of nutrient input. *Microb Ecol* 35:83-93
- Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol Appl* 1:182-195
- Holland EA, Coleman DC (1987) Litter placement effects on microbial and organic-matter dynamics in an agroecosystem. *Ecology* 68:425-433
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.996
- Jassey VEJ, Gilbert D, Binet P, Toussaint ML, Chiapusio G (2011a) Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions. *Can J Microbiol* 57:226-235
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Buttler A, Toussaint ML, Binet P (2011b) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. *Glob Change Biol* 17:2945-2957
- Kieft TL, Wilch E, O'Connor K, Ringelberg DB, White DC (1997) Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl Environ Microb* 63:1531-1542
- Krumholz LR, Hollenback JL, Roskes SJ, Ringelberg DB (1995) Methanogenesis and methanotrophy within a *Sphagnum* peatland. *FEMS Microbiol Ecol* 18:215-224
- Laiho R (2006) Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. *Soil Biol Biochem* 38:2011-2024
- Li N, Wang GX, Gao YH, Wang JF (2011) Warming effects on plant growth, soil nutrients, microbial biomass and soil enzymes activities of two alpine meadows in Tibetan Plateau. *Pol J Ecol* 59:25-35
- Limpens J, et al. (2011) Climatic modifiers of the response to nitrogen deposition in peat-forming *Sphagnum* mosses: a meta-analysis. *New Phytol* 191:496-507
- Mitchell EAD, Gilbert D, Buttler A, Amblard C, Grosvernier P, Gobat JM (2003) Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microb Ecol* 46:187-199
- Moore-Kucera J, Dick RP (2008) Application of ¹³C-labeled litter and root materials for *in situ* decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biol Biochem* 40:2485-2493
- Panikov NS (1999) Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change. *Appl Soil Ecol* 11:161-176
- Ringelberg DB, Davis JD, Smith GA, Pfiffner SM, Nichols PD, Nickels JS, Henson JM, Wilson JT, Yates M, Kampbell DH, Read HW, Stocksdales TT, White DC (1989) Validation of signature polarlipid fatty acid biomarkers for alkane-utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials. *FEMS Microbiol Lett* 62:39-50
- Ringelberg DB, Stair JO, Almeida J, Norby RJ, O'Neil EG, White DC (1997) Consequences of rising atmospheric carbon dioxide levels for the belowground microbiota associated with white oak. *J Env Qual* 26:495-503

- Ruess L, Michelsen A, Schmidt IK, Jonasson S (1999) Simulated climate change affecting microorganisms, nematode density and biodiversity in subarctic soils. *Plant Soil* 212:63-73
- Rustad LE, Campbell JL, Marion GM, Norby RJ, Mitchell MJ, Hartley AE, Cornelissen JHC, Gurevitch J (2001) A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia* 126:543-562
- Rydin H, Jeglum JK (2006) *The Biology of Peatlands*. Oxford University Press, Oxford, pp 360
- Sparling GP, Feltham CW, Reynolds J, West AW, Singleton P (1990) Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the k_{ec} -factor. *Soil Biol Biochem* 22:301-307
- Strack M, Waddington JM, Turetsky M, Roulet NT, Byrne KA (2008) Northern peatlands, greenhouse gas exchange and climate change. In: Strack M (ed) *Peatlands and climate change*, International Peat Society, Jyväskylä, Finland, pp 44-69
- Turunen J, Roulet NT, Moore TR (2004) Nitrogen deposition and increased carbon accumulation in ombrotrophic peatlands in eastern Canada. *Global Biogeochem Cy* 18:GB3002
- Updegraff K, Bridgham SD, Pastor J, Weishampel P, Harth C (2001) Response of CO₂ and CH₄ emissions from peatlands to warming and water table manipulation. *Ecol Appl* 11:311-326
- Wallander H, Nilsson LO, Hagerberg D, Rosengren U (2003) Direct estimates of C:N ratios of ectomycorrhizal mycelia collected from Norway spruce forest soils. *Soil Biol Biochem* 35:997-999
- Weltzin JF, Pastor J, Harth C, Bridgham SD, Updegraff K, Chapin CT (2000) Response of bog and fen plant communities to warming and water-table manipulations. *Ecology* 81:3464-3478
- Weltzin JF, Bridgham SD, Pastor J, Chen JQ, Harth C (2003) Potential effects of warming and drying on peatland community composition. *Glob Change Biol* 9:141-151
- Wheeler BD, Proctor MCF (2000) Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J Ecol* 88:187-203
- Wilkinson SC (1988) Gram-negative bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SC (eds) *Microbial lipids*, vol 1. Academic, London, pp 299-488
- Williams BL, Silcock DJ (1997) Nutrient and microbial changes in the peat profile beneath *Sphagnum magellanicum* in response to additions of ammonium nitrate. *J Appl Ecol* 34:961-970
- Wretensjö I, Svensson L, Christie WW (1990) Gas chromatographic-mass spectrometric identification of the fatty acids in borage oil using the picolinyl ester derivatives. *J Chromatogr* 521:89-97
- Wu J, O'Donnell AG, He ZL, Syers JK (1994) Fumigation-extraction method for the measurement of soil microbial biomass-S. *Soil Biol Biochem* 26:117-125
- Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fert Soils* 29:111-129
- Zhang W, Parker KM, Luo Y, Wan S, Wallace LL, Hu S (2005) Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Glob Change Biol* 11:266-277

3. Impact du changement climatique sur le fonctionnement et les flux C-N-S à l'échelle de l'écosystème tourbière à Sphaignes (article 5)

Aurélien Gicquel^{1,3}, Françoise Binet^{1,3}, Fatima Laggoun-Défarge^{2,3},
Nathalie Le Bris-Josselin^{1,3}, Marie-Paule Briand^{1,3} et André-Jean Francez^{1,3}

¹UMR CNRS 6553 ECOBIO, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes Cedex, France

²UMR CNRS 6113 ISTO, Université d'Orléans, 1A rue de la Férollerie, F-45071 Orléans Cedex 2, France

³Projet ANR PEATWARM “Effects of experimental warming on carbon sink function of a temperate *Sphagnum*-peatland” <http://peatwarm.cnrs-orleans.fr/>

3.1. Introduction

Bien que ne couvrant que 3 % des surfaces continentales, les tourbières à sphaignes renferment environ 30 % du stock de carbone (C) des sols mondiaux (455 Pg C) (Gorham 1991). La fonction de « puits » de C des tourbières est principalement le résultat de l'interaction de plusieurs facteurs comme le bilan hydrique excédentaire, l'anoxie, l'acidité et les faibles températures, qui limitent la décomposition de la matière organique (Laiho 2006). Or, dans la perspective d'un changement climatique mondial, leur fonction de « puits » de C risque d'être fortement altérée. En effet, l'augmentation de la température pourrait provoquer une accélération de la décomposition des stocks de matière organique induisant ainsi une augmentation des émissions de CO₂ dans l'atmosphère (Strack *et al.* 2008). Ceci est d'autant plus vrai que 90 % des tourbières à sphaignes se trouvent dans les hautes latitudes de l'hémisphère boréal (O'Neill 2000), là où le réchauffement le plus important (2 à 8 °C) est attendu pour les décennies à venir (IPCC 2007). Toutefois, cette altération de la fonction de « puits » de C des tourbières de l'hémisphère boréal est notamment dépendante de la disponibilité en nutriments comme l'azote (N ; Turunen *et al.* 2004 ; Limpens *et al.* 2011) ou le soufre (S ; Dise et Verry 2001).

Le passage à un fonctionnement « source » est conditionné par la réponse des organismes impliqués dans les voies privilégiées de fixation (végétation) et de décomposition (microorganismes) dont le bilan déterminera l'orientation du fonctionnement à l'échelle de l'écosystème. La végétation des tourbières boréales est souvent dominée par différentes espèces de *Sphagnum* (Breeuwer *et al.* 2008). Ce sont des organismes ingénieurs à l'origine de l'édification des tourbières (Francez 2000). Elles fournissent une litière pauvre en éléments nutritifs, limitant l'activité microbienne de minéralisation et la croissance des végétaux vasculaires (Malmer *et al.* 1994 ; Dorrepaal *et al.* 2006). Ainsi, toute modification de ce compartiment est susceptible d'altérer le fonctionnement « puits » de la tourbière et l'accumulation de matière organique à l'échelle de l'écosystème. Il a été démontré que le réchauffement climatique en tourbière boréale pouvait avoir un impact positif sur la biomasse des sphaignes (Breeuwer *et al.* 2008) et des végétaux vasculaires (Weltzin *et al.* 2000). Cependant, Dorrepaal *et al.* (2004) évoquent également le fait que le réchauffement climatique à long terme pourrait affecter négativement la productivité des sphaignes. Le compartiment microbien, à l'origine des processus de minéralisation de la matière organique, peut également être fortement influencé par le réchauffement climatique comme il a

récemment été démontré par une étude sur des sols prairiaux (Li *et al.* 2011). En tourbière, l'augmentation de la température accélère la minéralisation du C sous réserve d'une disponibilité en nutriments suffisante pour les microorganismes (Laiho 2006), qui s'accompagne à court terme d'une modification de la structure des communautés (Jassey *et al.* 2011a). Les enchytréides (Oligochaeta) représentent la majorité de la mésofaune des tourbières à Sphaignes (Coulson et Whittaker 1978). Le rôle de ces organismes détritvovres dans le relargage de carbone organique dissous (DOC) peut notamment être positivement influencé par le réchauffement climatique (Cole *et al.* 2002). Les interactions entre ces compartiments peuvent également jouer sur la réponse des tourbières au changement climatique. Face à cette diversité de réponses, l'enjeu est maintenant de comprendre comment le réchauffement climatique modifie le fonctionnement des tourbières en termes de flux de C, N et S, et d'évaluer la capacité de celles-ci à continuer de stocker du C.

Dans les régions sans permafrost, la distinction principale entre les types de tourbières est effectuée entre bog et fen (Rydin et Jeglum 2006). Ces deux types d'habitats se caractérisent principalement par des différences d'hydrologie, de communautés végétales et de disponibilité en nutriments (Wheeler et Proctor 2000 ; Bridgham *et al.* 2001). En raison de ces différences biotiques et abiotiques, le bog et le fen sont susceptibles d'avoir des réponses différentes vis-à-vis du réchauffement climatique (Weltzin *et al.* 2000 ; Weltzin *et al.* 2003). Il paraît donc indispensable d'intégrer la diversité des habitats et des conditions écologiques *bog-fen*, afin de comprendre l'effet du réchauffement climatique sur les flux de C, N et S des tourbières à sphaignes.

Le but de cette étude est d'évaluer l'impact d'un réchauffement climatique expérimental sur les flux de C, N et S circulant à travers les grands compartiments biotiques d'une tourbière tempérée (sphaignes, végétaux vasculaires, enchytréides et microorganismes), et sur les grands types d'interactions susceptibles d'être modifiées, en contexte de bog et de fen. Nous faisons les hypothèses que le réchauffement climatique i) a un impact positif sur les stocks C-N-S des sphaignes, des végétaux vasculaires et des microorganismes, et ii) modifie l'incorporation en C, N et S des différents compartiments biotiques, et par conséquent les flux à l'échelle de l'écosystème. Nous émettons l'hypothèse que ces réponses sont dépendantes du contexte écologique *bog-fen*. Afin de répondre à ces hypothèses, nous avons provoqué un réchauffement climatique *in situ* à l'aide d'open top chambers pendant 27 mois et nous avons procédé à un triple traçage ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S avec des mesures à trois dates d'incubation (24 h, 48 h et 144 h) pour estimer les flux nets de C, N et S. Les dates à 24 h et 48 h ont été choisies pour

mettre en évidence des processus à turnovers rapides comme les activités microbiennes. La date à 144 h a elle été choisie pour mettre en évidence des processus à turnovers plus lents comme l'activité des enchytréides. Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude permettant d'évaluer l'effet d'un changement climatique sur les flux de trois éléments majeurs C, N et S, et qui plus est, sur l'ensemble des grands compartiments biologiques de l'écosystème tourbière.

3.2. Matériels et méthodes

Le protocole expérimental est détaillé dans le chapitre II « Sites d'études, protocoles et stratégies d'investigation à différents niveaux d'organisation ». Brièvement, 24 h, 48 h et 144 h après l'ajout des traceurs ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S dans l'eau des bacs des mésocosmes, les colonnes ($n = 3$ réplicats) ont été sacrifiées pour effectuer des analyses isotopiques des différents compartiments biotiques (sphaignes, végétaux vasculaires et enchytréides) et la tourbe à deux profondeurs (7.5-12.5 cm et 12.5-17.5 cm). Des mesures de respiration et des analyses isotopiques de l'eau ont également été effectuées à ces dates et à t+6 h. Les analyses de biomasses microbiennes C, N et S (BMC, BMN et BMS respectivement) ont été effectuées à 24 h, 48 h et 144 h aux deux profondeurs. Les sphaignes *S. fallax* et *S. magellanicum* ont été échantillonné sans faire de distinction d'espèces. Il en est de même pour les deux espèces de végétaux vasculaires *E. vaginatum* et *A. polifolia*, présents dans les mésocosmes des deux habitats bog et fen. Compte tenu de leur faible abondance, les enchytréides des trois réplicats de chaque traitement ont été regroupés pour effectuer les analyses de compositions isotopiques (masse sèche.mésocosme⁻¹ < 10 mg).

Les flux nets d'éléments exprimés en mg ou en μg de C, N ou S.m⁻².jour⁻¹ ont été calculés à partir des mesures de recouvrement effectuées à 48 h et 144 h. Pour la tourbe, les flux ont été calculés sur la base des deux profondeurs et rapportés à la hauteur du mésocosme, soit 25 cm. Les flux estimés sont fonctions de deux facteurs i) les enrichissements en éléments évalués par les traceurs isotopiques et ii) les stocks de C, N et S des compartiments.

Des analyses de variance (ANOVAs à l'aide de la procédure GLM) ont été effectuées pour tester l'effet des facteurs « changement climatique » (OTC vs. contrôle), « habitat » (bog vs. fen) et durée d'incubation (24 h vs. 48 h vs. 144 h) sur les stocks, les compositions isotopiques et les flux de C, N et S des différents compartiments, et d'éventuelles interactions « climat × habitat », « climat × durée » et « habitat × durée ».

3.3. Résultats

3.3.1. Enrichissements ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S de l'eau

Les Atom % excess (APE) en ^{13}C de l'eau ont doublé entre 6 h et 144 h d'incubation alors que les APE en ^{15}N ont diminué de 4 fois environ pendant la même durée (Figure 1 ; Tableau 1). Les mesures isotopiques en ^{34}S de l'eau n'ont pas pu être réalisées compte tenu des trop faibles concentrations (1.3 mg.L^{-1}). Les facteurs habitat et changement climatique n'ont pas eu d'effet sur les enrichissements en ^{13}C et ^{15}N de l'eau (Tableau 1).

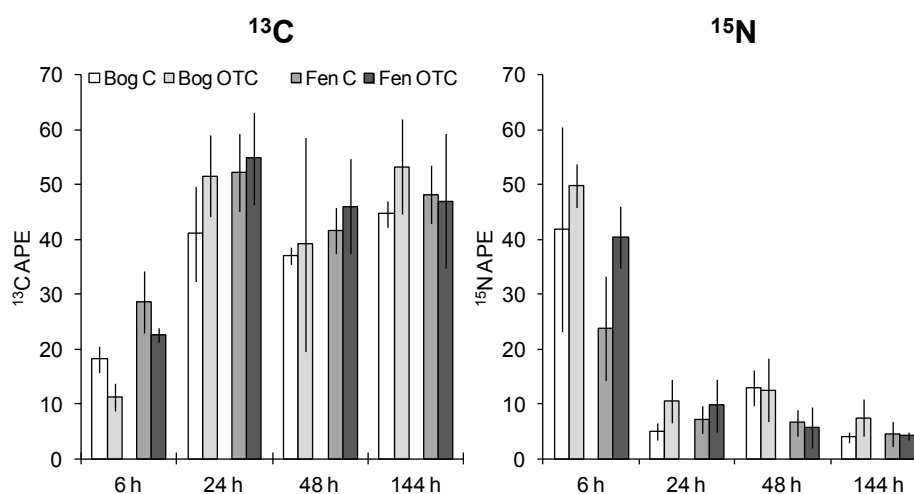


Figure 1. Evolution pendant 144 heures des Atom % excess en ^{13}C et ^{15}N de l'eau extérieure des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois (moyennes \pm S.E. ; $n = 3$)

3.3.2. Stocks C-N-S et biomasses microbiennes C-N-S

Les stocks de C, N et S des végétaux (sphaignes et végétaux vasculaires) n'ont pas varié au cours de l'expérimentation (Tableau 1). En accord avec notre hypothèse de départ, le changement climatique a positivement impacté les stocks de C, N et S des sphaignes des deux habitats qui ont augmenté de 25 % en moyenne sous les OTCs (Figure 2 ; Tableau 1). En revanche, et contrairement à notre hypothèse de départ, le changement climatique n'a pas eu d'effet significatif sur les stocks de C, N et S des végétaux vasculaires. Il n'a pas été observé d'effet de l'habitat sur les stocks de C, N et S des sphaignes. Seul l'N pour les végétaux vasculaires présente des stocks plus élevés en bog qu'en fen ($\times 1.2$).

Le changement climatique n'a pas eu d'effet sur les stocks C, N et S de la tourbe (Figure 2 ; Tableau 1). Cette dernière en bog présente des stocks de C, N et S de 1.1 à 1.7 fois plus élevés que celle du fen.

Tableau 1. Niveaux de significativité des ANOVAs réalisées à l'aide de la procédure GLM

	¹³ C-eau		¹⁵ N-eau		¹³ C-CO ₂		BMC		BMN		BMS	
	C	N	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C
Bog-Fen	0.089	0.061	***	***	0.893	***	***	***	***	***	***	0.893
OTC	0.588	0.109	0.722	*	0.078	*	**	**	**	**	**	0.078
Durée	***	***	***	***	0.224	0.243	0.404	0.224	0.224	0.224	0.224	0.224
Profondeur	nd	nd	nd	nd	0.357	***	***	0.357	0.357	0.357	0.357	0.357
Bog-Fen×OTC	0.584	0.561	0.126	*	0.190	***	*	0.190	0.190	0.190	0.190	0.190
Bog-Fen×Durée	0.614	0.289	0.984	0.117	0.223	0.117	0.071	0.223	0.223	0.223	0.223	0.223
OTC×Durée	0.530	0.421	0.815	*	0.833	*	0.099	0.833	0.833	0.833	0.833	0.833
	sphaignes						tourbe (7.5 – 17.5 cm)					
	vasculaires			vasculaires			tourbe (7.5 – 12.5 cm)			tourbe (12.5 – 17.5 cm)		
	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C	N	S
Bog-Fen	0.817	0.769	0.920	0.189	*	0.736	*	***	***	0.560	0.969	0.440
OTC	***	***	***	0.774	0.708	0.432	0.432	0.432	0.432	0.560	0.969	0.440
Durée	0.575	0.742	0.980	0.432	0.337	0.412	0.412	0.412	0.412	0.995	0.727	0.916
Bog-Fen×OTC	0.870	0.952	0.903	0.729	0.869	0.388	0.388	0.388	0.388	0.312	0.806	0.878
Bog-Fen×Durée	0.464	0.394	0.560	0.338	0.151	0.750	0.750	0.750	0.750	0.222	0.304	0.466
OTC×Durée	0.266	0.732	0.783	0.214	0.146	*	*	*	*	0.948	0.970	0.856
	sphaignes						tourbe (7.5 – 17.5 cm)					
	vasculaires			vasculaires			tourbe (7.5 – 12.5 cm)			tourbe (12.5 – 17.5 cm)		
	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C	N	S
Bog-Fen	0.311	0.731	0.349	*	0.080	*	0.521	0.909	*	0.750	0.668	*
OTC	***	0.072	0.388	0.167	0.052	0.901	*	0.088	0.349	0.340	0.144	0.318
Durée	**	0.343	0.487	**	***	0.291	**	**	0.394	*	0.065	0.074
Bog-Fen×OTC	0.555	0.762	0.564	0.398	0.625	0.626	0.192	0.443	0.092	0.111	0.092	0.704
Bog-Fen×Durée	0.908	0.638	0.217	0.266	0.137	0.405	0.419	0.492	0.459	0.240	0.141	0.613
OTC×Durée	***	0.142	0.397	0.525	0.710	0.369	0.069	0.137	0.333	0.673	0.546	0.489
	sphaignes						tourbe (7.5 – 17.5 cm)					
	vasculaires			vasculaires			tourbe (7.5 – 12.5 cm)			tourbe (12.5 – 17.5 cm)		
	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C	N	S
Bog-Fen	*	0.904	0.766	***	**	*	0.073	*	0.122	***	***	***
OTC	***	0.368	0.603	0.850	0.331	0.399	0.435	0.210	0.825	0.935	0.935	0.935
Bog-Fen×OTC	0.276	0.617	0.774	0.672	0.466	0.851	0.371	0.851	0.351	0.599	0.599	0.599

Le nombre de réplicats est de 2 ou 3 pour chaque variable. Biomasses microbiennes carbone (BMC), biomasses microbiennes azote (BMN) et biomasses microbiennes soufre (BMS). nd non défini, . $P < 0.1$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$

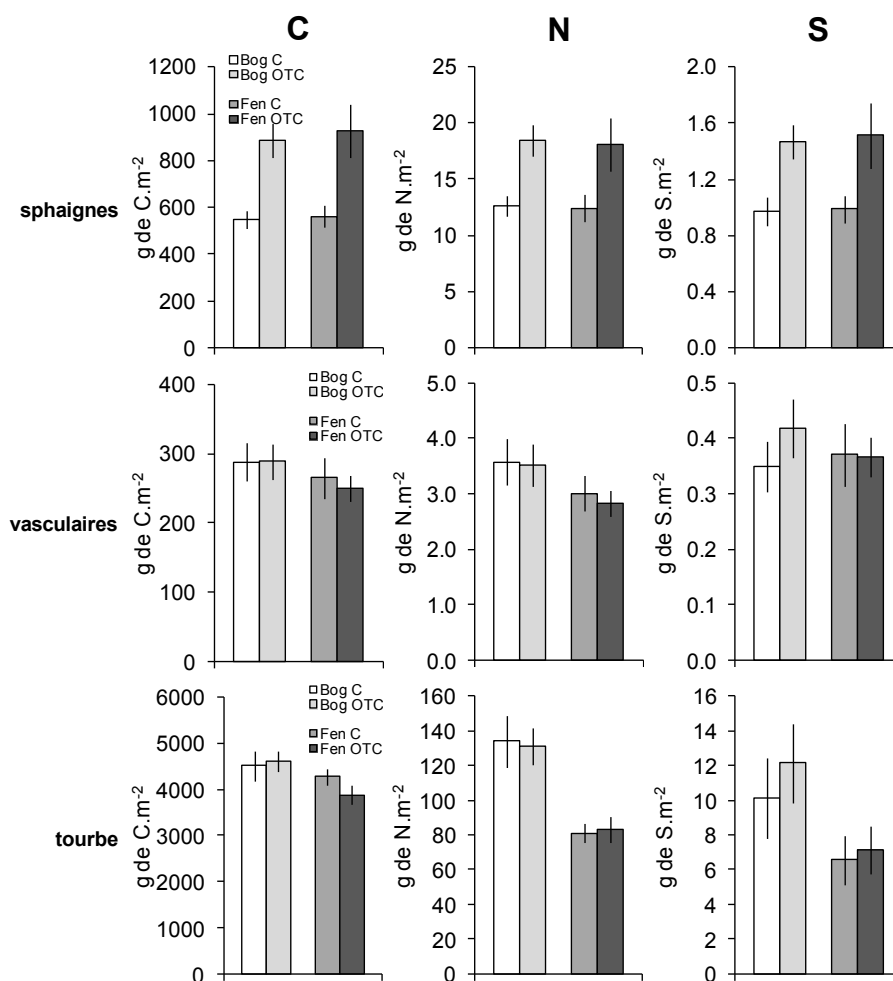


Figure 2. Stocks de C, N et S en g dans les sphaignes vivantes, les végétaux vasculaires et la tourbe des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois (moyennes \pm S.E. ; $n = 8$ ou 9)

Les BMC et les BMN dans la tourbe sont respectivement 1.6 et 1.4 fois plus élevées en surface qu'en profondeur (Figure 3 ; Tableau 1). La profondeur n'a pas d'effet sur la BMS. En accord avec notre hypothèse de départ, le changement climatique impacte positivement les BMC et les BMN qui ont presque doublées en fen. On peut relever une tendance pour la BMS en fen avec des valeurs plus élevées avec les OTCs que pour les contrôles. Les BMC et les BMN sont respectivement 1.4 et 1.6 fois plus élevées dans le bog que dans le fen. Pour le S, il n'a pas été observé de différences de biomasses microbiennes selon l'habitat.

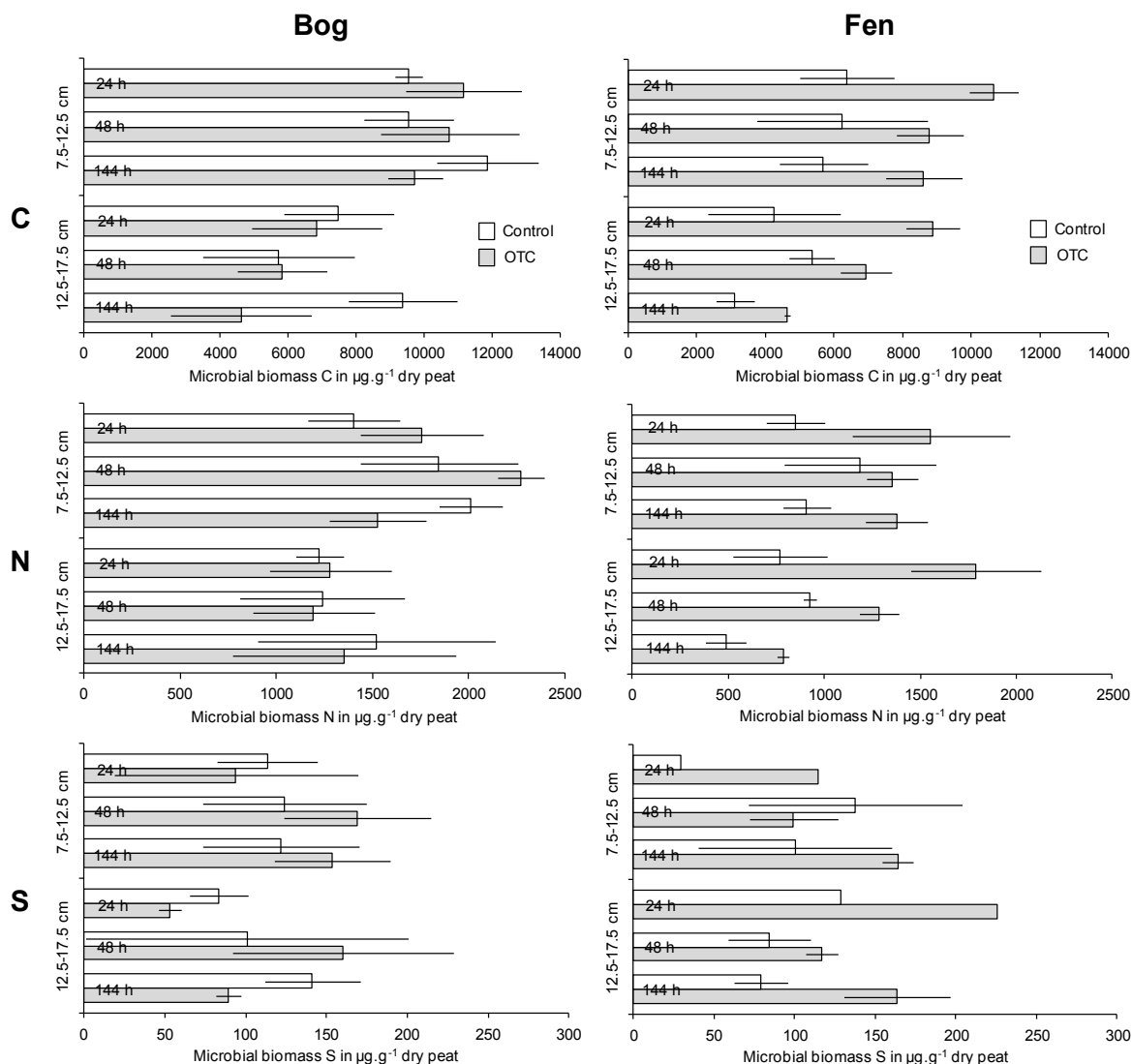


Figure 3. Biomasses microbiennes C, N et S de la tourbe échantillonnée entre 7.5-12.5 cm et 12.5-17.5 cm des colonnes bog et fen qui ont été soumises ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois, à 24 h, 48 h et 144 h après incubation avec du ^{13}C -glucose, du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et du $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (moyennes \pm S.E. ; $n = 1$ à 3)

3.3.3. Incorporations ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S et dynamiques C-N-S dans la tourbière

3.3.3.1. Respiration ^{13}C - CO_2

Les quantités cumulées de C respiré après 144 h d'incubation sont 1.3 fois plus élevées dans le bog que dans le fen (Figure 4 ; Tableau 1). Ces respirations représentent en moyenne $750 \text{ mg C-CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour le bog et $510 \text{ mg C-CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour le fen (Figure 9). La signature isotopique du C respiré diffère également entre les deux habitats : les $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ en

bog sont significativement plus élevés que ceux en fen (Tableau 1). Il n'a pas été observé d'effet du changement climatique sur les quantités et la signature isotopique du C respiré.

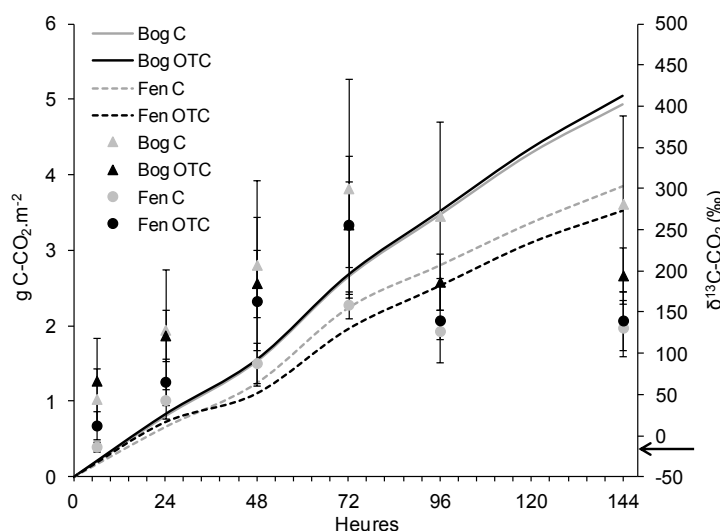


Figure 4. Respiration cumulée en g de C-CO₂ par m² et signature isotopique de la respiration en δ¹³C-CO₂ en ‰ des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois après incubation avec du ¹³C-glucose (moyennes ± S.E. ; n = 2 ou 3). La flèche sur l'axe des ordonnées représente l'abondance naturelle en ¹³C-CO₂

3.3.3.2. Sphaignes et végétaux vasculaires

Pour les sphaignes, l'N est l'élément qui présente les plus fortes incorporations avec des gains de l'ordre de 10 à 40 δ¹⁵N ‰ (Figure 5). Des incorporations en ¹³C avec des gains de 1 à 6 δ¹³C ‰ ont également été observées au cours de l'expérimentation. Pour les végétaux vasculaires, le C et le S sont les éléments les moins réactifs en termes d'immobilisation avec des gains variant respectivement de 1 à 9 δ¹³C ‰ et de 1 à 8 δ³⁴S ‰ (Figure 6). L'N présente des gains variant de 10 à 120 δ¹⁵N ‰, soient jusqu'à 3 fois plus élevés que pour les sphaignes.

Le changement climatique en bog et en fen a un impact négatif (1.1 à 1.3 fois inférieures avec OTCs) sur les compositions isotopiques en ¹³C des sphaignes (Figure 5 ; Tableau 1). On peut également relever une tendance avec l'N où les compositions isotopiques en ¹⁵N sont plus élevées dans les contrôles que dans les OTCs. Pour les végétaux vasculaires, le changement climatique n'a pas d'effet significatif sur les compositions isotopiques en ¹³C et ³⁴S des végétaux vasculaires (Figure 6 ; Tableau 1). On peut relever une tendance pour l'N dans les deux habitats où les compositions isotopiques en ¹⁵N sont plus élevées pour les OTCs que pour les contrôles. Les flux de C montrent que la production primaire des sphaignes

diminue significativement avec l'effet OTC ($\times -2$ à -8 ; Figure 9 ; Tableau 1). En revanche, il n'a pas été observé d'effet du changement climatique sur les flux de C, N et S des végétaux vasculaires.

Il n'a pas été observé d'effet de l'habitat sur les compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des sphaignes (Figure 5 ; Tableau 1) mais les flux de C des sphaignes en bog (mixte *S. fallax* et *S. magellanicum*) démontrent une production primaire de 1.5 à 5 fois plus élevée que les sphaignes en fen (*S. fallax*) (Figure 9 ; Tableau 1). Pour les végétaux vasculaires, les flux de C, N et S sont de 3 à 8 fois plus élevés dans le bog (majorité d'*A. polifolia*) que dans le fen (majorité d'*E. vaginatum*).

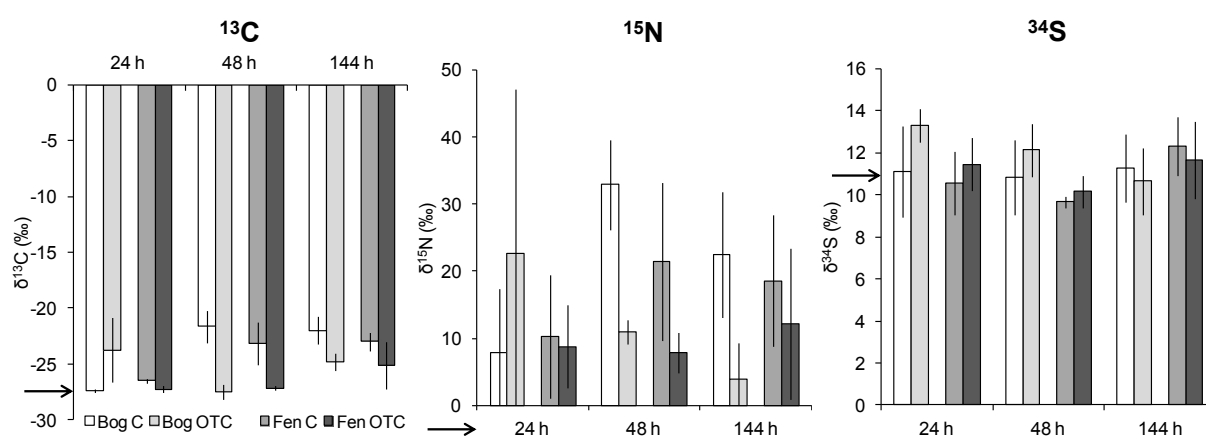


Figure 5. $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S en ‰ des sphaignes des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois, à 24 h, 48 h et 144 h après incubation avec du ^{13}C -glucose, du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et du $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (moyennes \pm S.E. ; $n = 3$). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des sphaignes

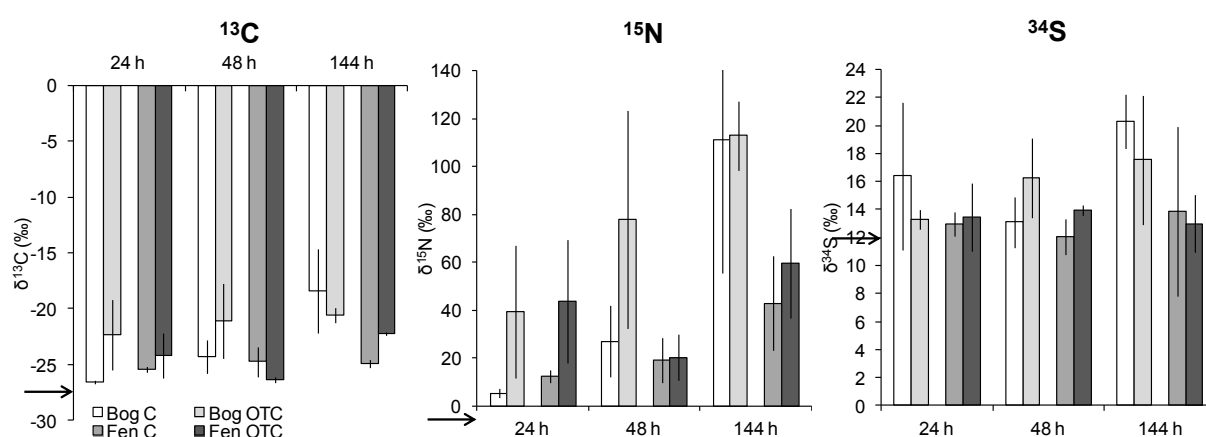


Figure 6. $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S en ‰ des végétaux vasculaires des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois, à 24 h, 48 h et 144 h après incubation avec du ^{13}C -glucose, du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et du $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (moyennes \pm S.E. ; $n = 3$). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des végétaux vasculaires

3.3.3.3. Enchytréides

Le C et le N sont les éléments qui présentent les plus fortes incorporations avec des gains variant respectivement de 5 à 55 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ et de 4 à 50 $\delta^{15}\text{N}$ ‰ (Figure 7). Seul le bog contrôle à 144 h présente une incorporation en ^{34}S avec un gain d'environ 3 $\delta^{34}\text{S}$ ‰.

Il n'est pas possible d'évaluer statistiquement l'effet du changement climatique sur les compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des enchytréides. Cependant, nous remarquons que les compositions isotopiques les plus élevées à 144 h sont systématiquement retrouvées pour le bog contrôle (Figure 7). De plus, les flux de C, N et S en bog et en fen sont de 1.1 à 3.0 fois faibles pour les OTCs que pour les contrôles (Figure 9). Les flux de C, N et S traversant le compartiment enchytréide sont de 2 à 3 fois plus élevés dans le bog que dans le fen.

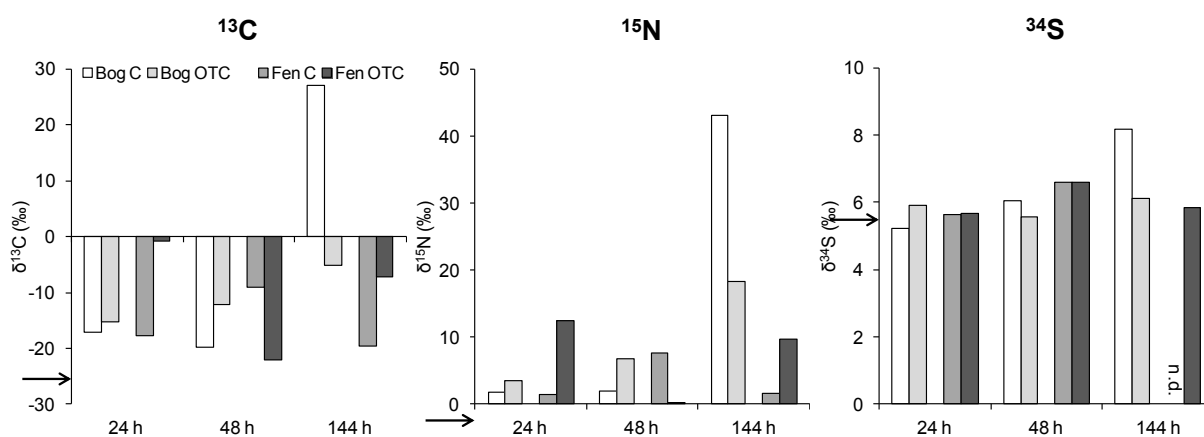


Figure 7. $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S en ‰ des enchytréides des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois, à 24 h, 48 h et 144 h après incubation avec du ^{13}C -glucose, du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et du $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (une valeur par échantillon). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des enchytréides

3.3.3.4. Tourbe

Le C et le N sont les éléments de la tourbe qui présentent les plus forts enrichissements avec des gains variant respectivement de 5 à 40 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ et de 10 à 170 $\delta^{15}\text{N}$ ‰, toutes profondeurs confondues (Figure 8). Les gains en ^{34}S ne dépassent pas 8 $\delta^{34}\text{S}$ ‰.

Les compositions isotopiques en ^{13}C et ^{34}S en surface sont plus élevées que celles mesurées en profondeur (ANOVAs : ^{13}C $P < 0.05$; ^{15}N $P = 0.897$; ^{34}S $P < 0.001$) (Figure 8).

Aucun effet du changement climatique n'a été observé sur les flux de C, N et de S traversant le compartiment tourbe (Figure 9 ; Tableau 1). Les flux de C et N traversant la tourbe sont de 1.3 à 2.1 fois plus élevés dans le bog que dans le fen.

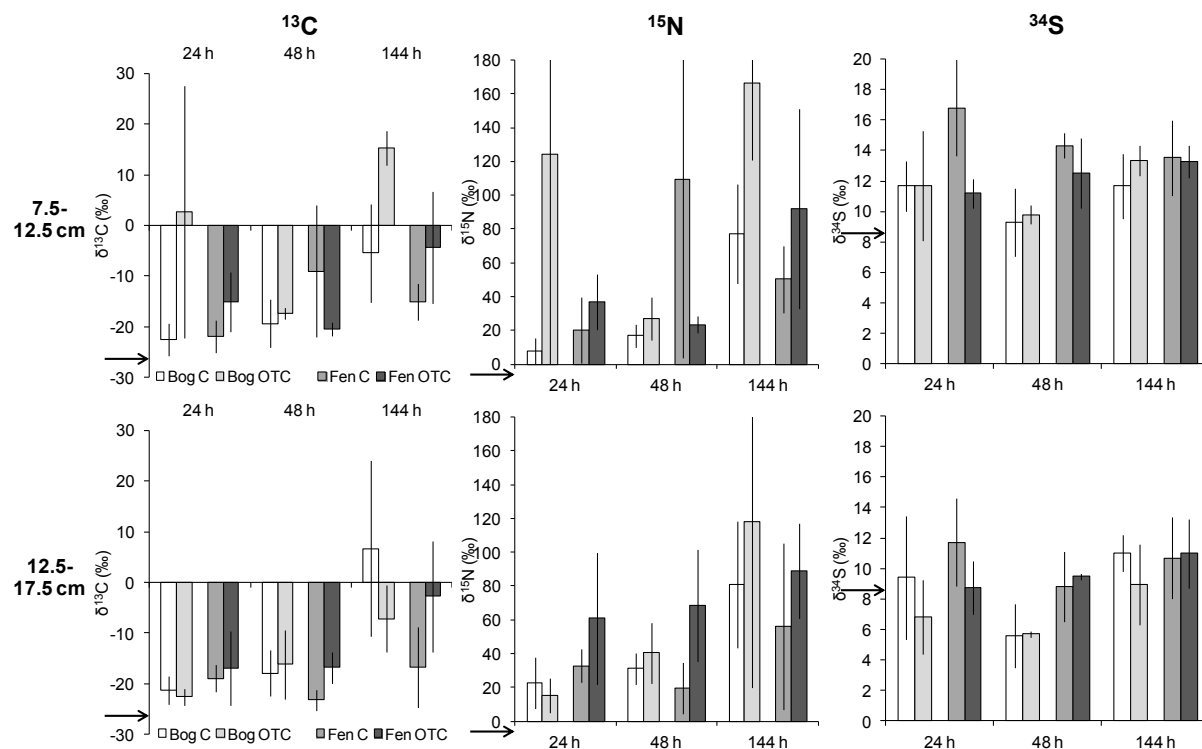


Figure 8. $\delta^{13}\text{C}$, ^{15}N et ^{34}S en ‰ de la tourbe échantillonnée entre 7.5-12.5 cm et 12.5-17.5 cm des colonnes bog et fen qui ont été soumis ou non à un changement climatique (contrôle C vs. OTC) pendant 27 mois, à 24 h, 48 h et 144 h après incubation avec du ^{13}C -glucose, du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et du $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (moyennes \pm S.E. ; $n = 3$). Les flèches sur l'axe des ordonnées représentent les abondances naturelles en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S de la tourbe

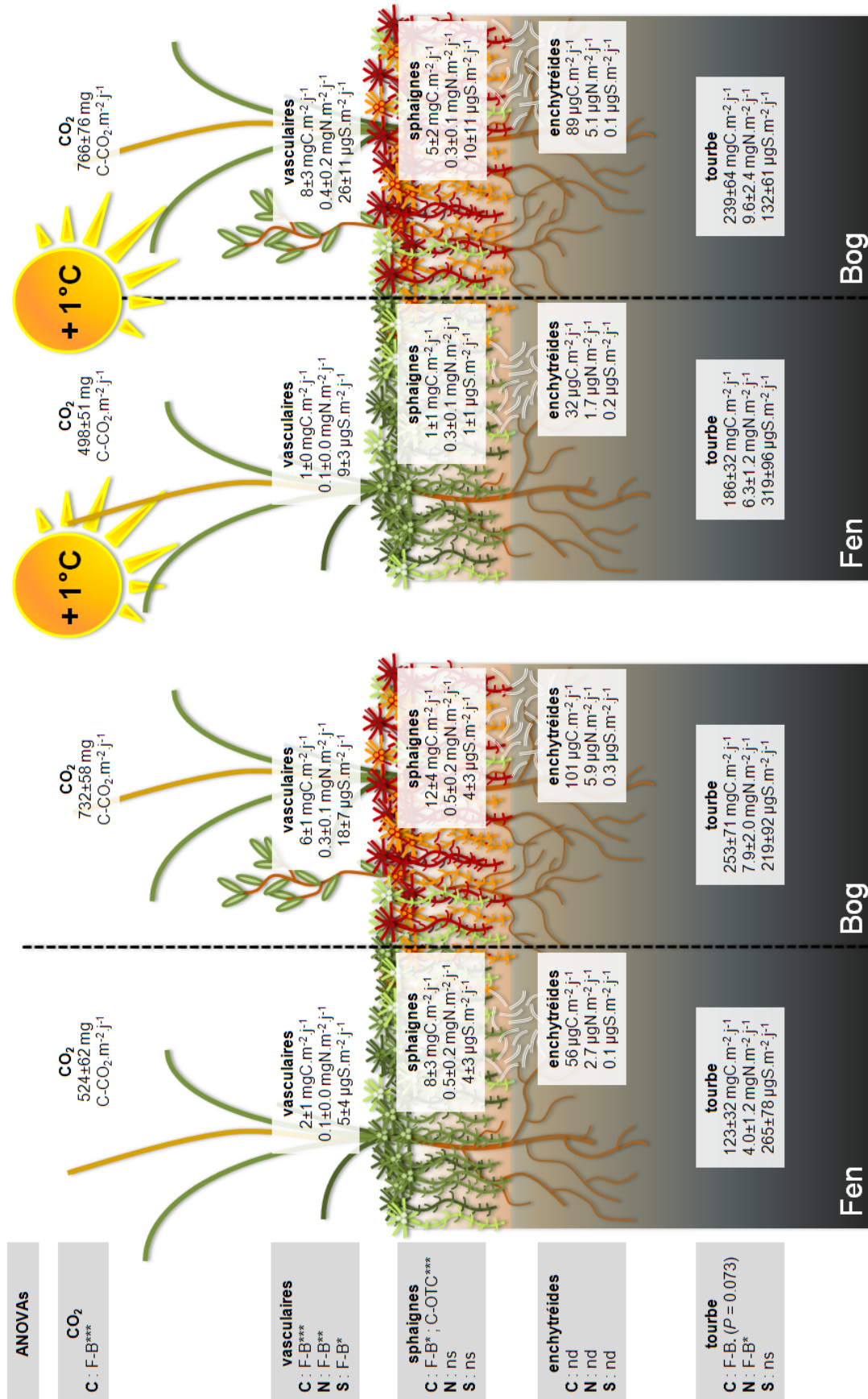


Figure 9 : Flux nets de C, N et S par m² et par jour des différents compartiments des colonnes fen et bog qui ont été soumis ou non à un changement climatique pendant 27 mois (moyennes ± S.E.; n = 3). Les niveaux de significativité sont indiqués pour les effets des facteurs habitat (F-B) et changement climatique (C-OTC) analysés par ANOVAs à l'aide de la procédure GLM : ns non significatif, . P < 0.1 * P < 0.05, ** P < 0.01 et *** P < 0.001

3.4. Discussion

La diminution au cours du temps des APE en ^{15}N de l'eau peut être expliquée par une utilisation de ce N par les différents compartiments biotiques constituant les mésocosmes. L'évolution des APE en ^{13}C peut elle être la conséquence d'une utilisation rapide (< 6 h) du ^{13}C -glucose par les microorganismes, mise en évidence par une augmentation du $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ dans les 6 premières heures de l'expérimentation et suivi d'une remise à disposition vers le milieu de composés carbonés riches en ^{13}C (DOC).

L'ajout des traceurs n'a pas eu d'effet fertilisant sur les sphaignes et les végétaux vasculaires dont les stocks de C, N et S sont restés stables au cours de l'expérimentation. Nos résultats obtenus avec *S. fallax* et *S. magellanicum* confirment ceux de Dorrepaal *et al.* (2004) obtenus avec *S. fuscum* dont la biomasse a augmenté de 15 à 50 % après un réchauffement climatique de 1°C simulé *in situ* avec des OTCs pendant 3 ans. Nos résultats confirment que les sphaignes « capturent » très fortement l'N des précipitations (Francez et Loiseau 1999). Notre système à nappe d'eau assez haute (10 cm en dessous des capitula de sphaignes) permet à ces Bryophytes de récupérer une partie de l'N apporté par capillarité. Les végétaux vasculaires ne sont pas aussi compétitifs que les sphaignes pour capter les nutriments des précipitations. En revanche, ils compensent par leurs systèmes racinaires pour prélever plus efficacement l'N présent dans la nappe d'eau (Li et Vitt 1997), N provenant de la minéralisation de la tourbe (Francez et Loiseau 1999).

L'augmentation de la température de l'air par les OTCs a induit une augmentation du processus d'évapotranspiration qui s'est traduit par une plus faible teneur en humidité des sphaignes (Jassey *et al.* 2011b). Or, Titus *et al.* (1983) et Silvola et Aaltonen (1984) ont démontré que la photosynthèse des sphaignes était très sensible à la diminution de l'humidité, et lié à la biologie de ces organismes (absence de vaisseaux et de racines). Nos résultats étayent et approuvent les travaux réalisés par Dorrepaal *et al.* (2004) et Breeuwer *et al.* (2006) qui ont démontré que la hausse de la température engendrait une diminution de la densité des sphaignes ($\times -1.2$ à -1.8), laissant supposer à terme à une baisse de la productivité de ces organismes. Nous n'avons pas observé d'effet du changement climatique sur la productivité des végétaux vasculaires *A. polifolia* et *E. vaginatum*. Dorrepaal *et al.* (2006) ont également démontré que les productivités en N d'*Empetrum nigrum* (camarine noire), de *Rubus chamaemorus* (plaquebrière) et de *Calamagrostis lapponica* (calamagrostide de Laponie)

n'étaient pas affectées par le changement climatique, contrairement à l'espèce *Betula nana* (bouleau nain).

Les productivités des sphaignes, de 1.5 à 5 fois plus élevées en bog qu'en fen, peuvent être expliquées par des différences de compétitivité entre les deux espèces *S. fallax* et *S. magellanicum* car nous n'avons pas observé de différences de stocks C, N et S entre les deux habitats. Pour les végétaux vasculaires, les productivités sont plus élevées en bog (majorité d'*A. polifolia*) qu'en fen (majorité d'*E. vaginatum*). Le bog se caractérise par l'accumulation de réserves dans les parties souterraines alors que le fen, stade plus jeune, fonctionne plutôt comme un système ouvert avec des pertes d'éléments plus importantes et un recyclage interne aux plantes moins efficace (Francez 1992 ; Francez 1995).

Les flux de C, N et S traversant le compartiment enchytréide sont systématiquement plus élevés pour le bog qui n'a pas subi de dessèchement de la tourbe. La répartition des enchytréides est dépendante de la disponibilité en eau du substrat (Abrahamsen 1971 ; Sulkava *et al.* 1996) et plusieurs études de terrain ont rapporté que ces organismes sont extrêmement vulnérables au dessèchement du milieu (Abrahamsen 1972 ; Lundkvist 1982 ; Maraldo *et al.* 2008). Nos résultats ne confirment pas l'hypothèse de Cole *et al.* (2002) qui suggèrent que le changement climatique en tourbière (+ 2.5 °C) pourrait augmenter de 43 % l'abondance des enchytréides et de 11 % les transferts de C (DOC) induit par ces organismes. Les flux de C, N et S traversant le compartiment enchytréide sont de 2 à 3 fois plus élevés dans le bog que dans le fen, ils peuvent être expliqués par les différences d'abondance dans les deux habitats : 31 ± 5 et $21 \pm 5 \times 10^3$ individus.m⁻² respectivement. Ces abondances sont tout à fait comparables à celles obtenues par Cole *et al.* (2002) dans un bog en Angleterre.

Les respirations plus élevées en bog qu'en fen sont certainement liées à la respiration hétérotrophe (microbes et enchytréides plus importants en bog qu'en fen) car nous n'avons pas observé de différences de stocks en éléments des végétaux entre les deux habitats. Le bog a un niveau de nappe plus bas et une densité de la tourbe plus faible que le fen, ce qui explique des biomasses microbiennes plus élevées (Blodau *et al.* 2004 ; Andersen *et al.* 2006). Les différences de compositions isotopiques en ¹³C et ³⁴S entre la surface et la profondeur de la tourbe sont la résultante des processus liés au compartiment microbien. En effet, les BMC et les BMN dans la tourbe sont respectivement 1.6 et 1.4 fois plus élevées en surface qu'en profondeur. Ceci est lié à une différence de groupes fonctionnels microbiens due à l'interface avec la nappe d'eau (aérobie vs. anaérobie) (Francez *et al.* 2000).

3.5. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de démontrer qu'une augmentation modérée de la température de 1°C pendant deux ans avait un impact négatif sur les flux de C des sphaignes. Les réponses au réchauffement climatique des deux habitats étudiés indiquent que la variabilité spatiale de l'humidité est primordiale pour la compréhension de l'impact d'un réchauffement global sur le devenir du cycle du C, N et S des tourbières. Le dessèchement de surface généré par le réchauffement climatique peut avoir, à long terme, un effet négatif sur la capacité de rétention en eau des sphaignes (Dorrepaal *et al.* 2004), et donc influencer l'activité des microorganismes qu'elles abritent. Nos résultats montrent l'importance de l'habitat *bog-fen* sur les flux de C, N et S des différents compartiments biotiques. Ils démontrent également que les biomasses microbiennes C, N et S en bog et en fen ne répondent pas d'une manière similaire aux forçages climatiques.

En termes de perspective, il reste maintenant à évaluer les flux nets C-N-S du compartiment microbien. Des analyses sont actuellement en cours afin d'évaluer les compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des extraits fumigés et non fumigés de tourbe. Des analyses supplémentaires sur les enchytréides seraient également nécessaires pour apporter la réponse à notre question sur l'effet du réchauffement climatique sur ce compartiment.

Références

- Abrahamsen G (1971) The influence of temperature and soil moisture on the population density of *Cognettia sphagnetorum* (Oligochaeta: Enchytraeidae) in cultures with homogenized raw humus. *Pedobiologia* 11:417-424
- Abrahamsen G (1972) Ecological study of Enchytraeidae (Oligochaeta) in Norwegian coniferous forest soils. *Pedobiologia* 12:26-82
- Andersen R, Francez AJ, Rochefort L (2006) The physiochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. *Soil Biol Biochem* 38:1375-1387
- Blodau C, Basiliko N, Moore TR (2004) Carbon turnover in peatland mesocosms exposed to different water table levels. *Biogeochemistry* 67:331-351
- Breeuwer A, Heijmans MMPD, Robroek BJM, Berendse F (2008) The effect of temperature on growth and competition between *Sphagnum* species. *Oecologia* 156:155-167
- Bridgham SD, Updegraff K, Pastor J (2001) A comparison of nutrient availability indices along an ombrotrophic-minerotrophic gradient in Minnesota wetlands. *Soil Sci Soc Am J* 65:259-269
- Calvet R (2003) *Le Sol : Propriétés et fonctions*. Tome 1 : Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Éditions La France Agricole, Dunod, pp 458

- Cole L, Bardgett RD, Ineson P, Adamson JK (2002) Relationships between enchytraeid worms (Oligochaeta), climate change, and the release of dissolved organic carbon from blanket peat in northern England. *Soil Biol Biochem* 34:599-607
- Coulson JC, Whittaker JB (1978) Ecology of moorland animals. In: Heal OW, Perkins DF (eds) *Production Ecology of British Moors and Montane Grasslands*, Ecological Studies 27. Springer Verlag, Berlin, pp 52-93
- Dise NB, Verry ES (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry* 53:143-160
- Dorrepaal E, Aerts R, Cornelissen JHC, Callaghan TV, Van Longtestijn RSP (2004) Summer warming and increased winter snow cover affect *Sphagnum fuscum* growth, structure and production in a sub-arctic bog. *Glob Change Biol* 10:93-104
- Dorrepaal E, Aerts R, Cornelissen JHC, Van Longtestijn RSP, Callaghan TV (2006) *Sphagnum* modifies climate-change impacts on subarctic vascular bog plants. *Funct Ecol* 20:31-41
- Francez AJ (1992) Structure et fonctionnement de l'écosystème tourbière. Production primaire et flux d'azote dans une tourbière à sphaignes de France centrale. *Ann Bot Fenn* 29:197-211
- Francez AJ (1995) Dynamique du carbone et de l'azote chez le *Carex rostrata*, l'*Eriophorum vaginatum* et le *Calluna vulgaris* dans une tourbière à sphaignes des monts du Forez (France). *Can J Bot* 73:121-129
- Francez AJ, Loiseau P (1999) Devenir de l'azote minéral dans une tourbière à *Sphagnum fallax* Klinggr. Et *Carex rostrata* Stokes du Massif central (France). *Can J Bot* 77:1136-1143
- Francez AJ (2000) La dynamique du carbone dans les tourbières à *Sphagnum*, de la sphaigne à l'effet de serre. *Année Biol* 39:205-270
- Francez AJ, Gogo S, Josselin N (2000) Distribution of potential CO₂ and CH₄ productions, denitrification and microbial biomass C and N in the profile of a restored peatland in Brittany (France). *Eur J Soil Biol* 36:161-168
- Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol Appl* 1:182-195
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp.996
- Jassey VEJ, Gilbert D, Binet P, Toussaint ML, Chiapusio G (2011a) Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions. *Can J Microbiol* 57:226-235
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Buttler A, Toussaint ML, Binet P (2011b) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. *Glob Change Biol* 17:2945-2957
- Laiho R (2006) Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. *Soil Biol Biochem* 38:2011-2024
- Li YH, Vitt DH (1997) Patterns of retention and utilization of aerially deposited nitrogen in boreal peatlands. *Ecoscience* 4:106-116

- Li N, Wang GX, Gao YH, Wang JF (2011) Warming effects on plant growth, soil nutrients, microbial biomass and soil enzymes activities of two alpine meadows in Tibetan Plateau. *Pol J Ecol* 59:25-35
- Limpens J, et al. (2011) Climatic modifiers of the response to nitrogen deposition in peat-forming *Sphagnum* mosses: a meta-analysis. *New Phytol* 191:496-507
- Lundkvist H (1982) Population dynamics of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in a Scots pine forest soil in central Sweden. *Pedobiologia* 23:21-41
- Malmer N, Svensson BM, Wallen B (1994) Interactions between *Sphagnum* mosses and field layer vascular plants in the development of peat-forming systems. *Folia Geobot Phytotax* 29:483-496
- Maraldo K, Schmidt IK, Beier C, Holmstrup M (2008) Can field populations of the enchytraeid, *Cognettia sphagnetorum*, adapt to increased drought stress? *Soil Biol Biochem* 40:1765-1771
- O'Neill KP (2000) Role of bryophyte-dominated ecosystems in the global carbon budget. In : Shaw AJ, Goffinet B (eds), *Bryophyte Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 344-368
- Rydin H, Jeglum JK (2006) *The Biology of Peatlands*. Oxford University Press, Oxford, pp 360
- Silvola J, Aaltonen H (1984) Water content and photosynthesis in the peat mosses *Sphagnum fuscum* and *S. angustifolium*. *Ann Bot Fenn* 21:1-6
- Strack M, Waddington JM, Turetsky M, Roulet NT, Byrne KA (2008) Northern peatlands, greenhouse gas exchange and climate change. In: Strack M (ed) *Peatlands and climate change*, International Peat Society, Jyväskylä, Finland, pp 44-69
- Sulkava P, Huhta V, Laakso J (1996) Impact of soil faunal structure on decomposition and N-mineralisation in relation to temperature and moisture in forest soil. *Pedobiologia* 40:505-513
- Titus JE, Wagner DJ, Stephens MD (1983) Contrasting water relations of photosynthesis for two *Sphagnum* mosses. *Ecology* 64:1109-1115
- Turunen J, Roulet NT, Moore TR (2004) Nitrogen deposition and increased carbon accumulation in ombrotrophic peatlands in eastern Canada. *Global Biogeochem Cy* 18:GB3002
- Weltzin JF, Pastor J, Harth C, Bridgham SD, Updegraff K, Chapin CT (2000) Response of bog and fen plant communities to warming and water-table manipulations. *Ecology* 81:3464-3478
- Weltzin JF, Bridgham SD, Pastor J, Chen JQ, Harth C (2003) Potential effects of warming and drying on peatland community composition. *Glob Change Biol* 9:141-151
- Wheeler BD, Proctor MCF (2000) Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J Ecol* 88:187-203

CHAPITRE VI

Les tourbières tempérées et les changements globaux : synthèse générale et perspectives

1. Introduction

La compréhension de la réponse des tourbières aux changements globaux est complexe car elle est tributaire de nombreux facteurs biotiques et abiotiques ainsi que de leurs interactions (Limpens *et al.* 2008). Cette réponse dépend en particulier du niveau d'altération des composantes biotiques (micro-méso-macrofaune et plantes) et des modifications de flux d'éléments qui en résultent. En effet, le glissement d'une fonction « puits » à une fonction « source » des tourbières peut être accéléré ou ralenti par l'activité de l'un et/ou de l'autre de ces organismes qui régulent les voies privilégiées de décomposition ou d'accumulation du carbone (C) à l'échelle de l'écosystème. Si l'augmentation de la production primaire, liée au réchauffement climatique, compense les pertes dues à la minéralisation de la matière organique (MO) alors la tourbière pourra continuer de fonctionner comme un système « puits » pour le C. En revanche, si l'augmentation des pertes de C-CO₂ liées à la minéralisation de la MO n'est pas compensée par une fixation supplémentaire de C par la végétation, alors la tourbière fonctionnera comme une « source » de C pour l'atmosphère, pouvant contribuer significativement à l'effet de serre.

Ainsi, dans ce contexte, nous avons voulu i) déterminer comment les changements globaux altéraient les composantes biotiques à différents niveaux d'organisation, de l'échelle de l'individu à celle de l'écosystème, et ii) quantifier les impacts sur le fonctionnement des tourbières et leurs capacités à continuer de stocker du C. A ces différentes échelles, les questions argumentées sont :

i) Dans quelle mesure les traits fonctionnels exprimés à l'échelle d'un organisme ingénieur d'écosystème, le ver de terre *Lumbricus rubellus* colonisant une tourbière restaurée après exploitation, se traduisent-ils dans l'efficacité du recyclage des nutriments C, N et S, à l'échelle de l'écosystème ? Cet organisme hétérotrophe contribue-t-il significativement à la régénération de la fonction de « puits » des tourbières anciennement exploitées en accélérant la remise à disposition de nutriments C, N et S pour les producteurs primaires de ces écosystèmes ?

ii) Comment l'activité d'organismes, aux traits fonctionnels spécifiques (plante et ver de terre), et leurs interactions respectives se traduisent-elles sur les flux d'éléments à l'échelle d'une tourbière restaurée ? Des organismes ingénieurs comme *Eriophorum angustifolium* et *Lumbricus rubellus*, par leur activité de bioturbation et leurs

interactions avec les microorganismes, favorisent-ils significativement, en modifiant les turnovers C-N-S, le retour à un fonctionnement « puits » de C ?

iii) Le changement climatique altère-t-il les communautés microbiennes d'une tourbière à Sphaignes soumise à un réchauffement modéré ? Quel est l'impact des modifications de température et d'humidité sur la structure (ratio champignons:bactéries par exemple) et les flux de C traversant ce compartiment (notamment via la boucle microbienne), à l'origine des processus de décomposition et de minéralisation de la MO ?

iv) Quel est l'impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement biogéochimique C-N-S de l'écosystème tourbière à *Sphagnum* ? L'augmentation de la température modifie-t-elle la production primaire des végétaux et en particulier celle des sphaignes, Bryophytes édificatrices de la tourbière ? Si tel est le cas comment cette transformation fonctionnelle se traduit-elle sur les autres compartiments majeurs (tourbe, microorganismes et mésofaune) ? En d'autres termes, est-ce qu'un réchauffement modéré peut favoriser à court terme, un glissement de la fonction « puits » à une fonction « source » de C à l'échelle de l'écosystème tourbière ?

La réponse à ces questions a nécessité le développement et l'utilisation de méthodes et d'outils permettant de quantifier les stocks et les flux d'éléments circulant entre les organismes et la « boîte noire » que constitue la tourbe. Ainsi, l'utilisation combinée des traceurs isotopiques ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S avec des outils puissants et d'introduction récente comme la NanoSIMS ou le SIP-PLFA s'est révélée être un choix pertinent. Grâce à ces approches, nos résultats confirment et avancent de nouvelles notions concernant les interactions biotiques majeures (micro-méso-macrofaune et plantes) et leurs impacts sur le fonctionnement biogéochimique C-N-S des tourbières.

2. Synthèse générale : les avancées fondamentales acquises

2.1. Les vers de terre constituent un relais à la recolonisation végétale et à la régénération du fonctionnement « puits » des tourbières anciennement exploitées

Les vers de terre ne constituent pas une part importante de la biomasse animale des tourbières à Sphaignes, majoritairement dominée par les enchytréides et les larves d'insectes (Limoniidae et Tipulidae). Par conséquent, la présence de tels macroorganismes, comme l'épi-anécique *Lumbricus rubellus*, colonisant dans des tourbières décapées en phase de recolonisation végétale suscite un intérêt particulier en termes de fonctionnement écologique. Ce sont des ingénieurs d'écosystèmes reconnus pour modifier efficacement les formes et la disponibilité des nutriments C, N et P dans le sol par bioturbation (Tiunov et Scheu 1999 ; Binet et Tréhen 1992 ; Le Bayon et Binet 2006). Cet impact se traduit notamment par la création d'« hot-spots » d'activité microbienne au niveau des biostructures qu'ils créent, les galeries et les turricules (Binet *et al.* 1998 ; Brown *et al.* 2000). Ces organismes constituent donc un maillon clé dans le fonctionnement des tourbières ré-humidifiées après abandon de l'exploitation, de par leur aptitude à soutenir les cycles biogéochimiques microbiens (minéralisation accrue de la MO : fonction « source » de C) et la productivité de l'écosystème (disponibilité accrue des nutriments nécessaires à la plante : fonction « puits » de C).

2.1.1. Les vers de terre accélèrent la remise à disposition des éléments C-N-S de la tourbe

Nous avons montré que *L. rubellus* joue un rôle positif dans le recyclage de la matière organique en fournissant indirectement des éléments (C > N > S) disponibles pour les plantes et les microorganismes (Figure 1). Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude quantifiant les flux de S d'un ver de terre, et plus généralement d'un organisme hétérotrophe. Ceci est un résultat d'autant plus important que le S est l'élément qui présente les turnovers les plus rapides comparés au C et au N. Nous avons également relié traits fonctionnels de *L. rubellus* et efficacité du recyclage des éléments C, N et S dans l'écosystème. Ainsi, ce ver de terre épi-anécique, physiologiquement adapté à la stochasticité environnementale caractéristique de la couche supérieure de la tourbe, possède des capacités de régulation métabolique plus élevées et plus rapides qu'une espèce anécique ou endogée. Nos résultats

permettent d'étayer les travaux sur les traits des organismes hétérotrophes, relativement peu nombreux comparé à ceux effectués sur les plantes.

2.1.2. Les communautés microbiennes de la tourbe ré-humidifiée après exploitation sont spatialement influencées par les transferts biogéniques N et S des vers de terre

Les pores du sol d'origine biotique comme les galeries de vers de terre représentent des interfaces biophysiques où la relation entre la localisation spatiale des microorganismes actifs et la structure physique du sol a une influence majeure sur les processus de transformations biogéochimiques (Herrmann *et al.* 2007). Les récents progrès en termes de technique d'imagerie, comme le développement des sondes ioniques NanoSIMS, permettent de lever le verrou technique nécessaire à l'observation de ces processus à l'échelle bactérienne. Ainsi, nous avons pu pour la première fois, à notre connaissance, imager et quantifier, par couplage du marquage isotopique et de la NanoSIMS, les transferts biogéniques en N et S au sein d'une interface biophysique non déstructurée, la paroi de galerie de ver de terre. Les enrichissements isotopiques montrent que les transferts biogéniques de *L. rubellus* ne se font pas au-delà d'1 mm de la paroi de galerie (Figure 1), ce qui constitue un trait fonctionnel important de ce ver de terre dans le soutien aux cycles biogéochimiques en tourbière. Un des résultats majeurs apporté par cette étude est l'« anticorrélation » spatiale observée entre les spots enrichis en ^{15}N et en ^{34}S . Ainsi, l'activité des communautés microbiennes impliquées dans les cycles du N et du S pourrait être spatialement influencée par ces ingénieurs d'écosystèmes.

2.1.3. Les vers de terre fournissent des nutriments C-N-S essentiels au soutien de la productivité primaire des tourbières en régénération

A l'échelle de l'écosystème, nous avons montré que les transferts en C, N et S du ver de terre vers la tourbe sont rapidement utilisés par *Eriophorum angustifolium* (Figure 1). Ainsi, la présence de *L. rubellus* permet d'améliorer les turnovers en C, N et S de la plante. Nous avons également démontré que du C, N et S de ces deux organismes était retrouvé dans la sphère fonctionnelle de l'autre organisme (drilosphère pour le ver de terre et rhizosphère pour la plante). Ceci démontre que ces sphères fonctionnelles sont intimement liées dans la tourbe : i)

les racines d'*E. angustifolium* se développent dans les galeries de *L. rubellus* et ii) le ver de terre vient se nourrir dans et/ou à proximité de la rhizosphère.

En définitive, nous pouvons donc affirmer que les vers de terre sont en mesure de favoriser un retour plus rapide à la fonction de « puits » des tourbières anciennement exploitées en accélérant la remise à disposition de nutriments C, N et S pour les producteurs primaires de ces écosystèmes.

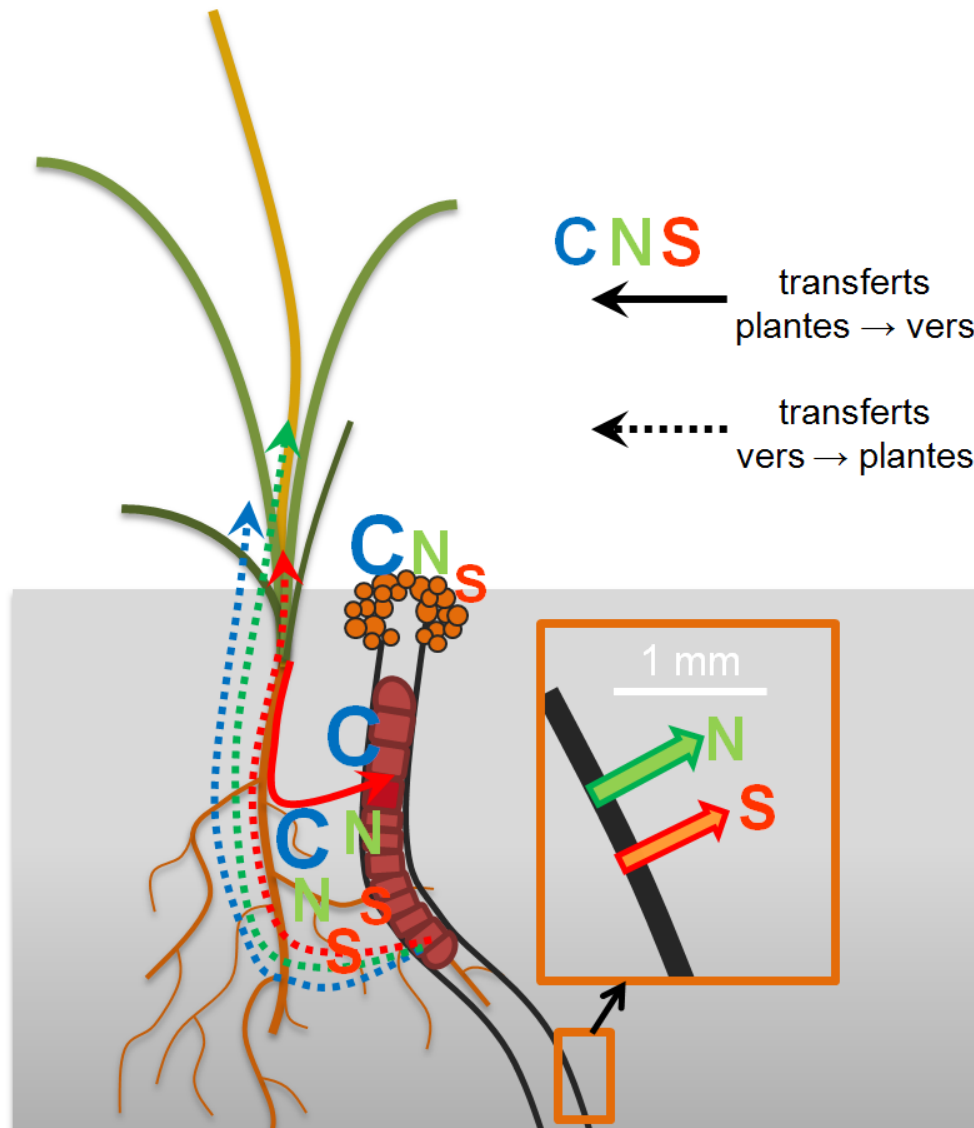


Figure 1. Représentation schématique des transferts de C, N et S des vers de terre vers la drilosphère (*turricules* [179-210, 85-87 et 16-24 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (mf).jour $^{-1}$] et *galeries* [1084-1264, 388-422 et 25-74 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (mf).jour $^{-1}$ (galerie)]), des plantes vers la *rhizosphère* [11-45, 11-17 et 14-19 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de plante (mf).jour $^{-1}$], et entre organismes (interactions biotiques *ver de terre* \rightarrow *plante* [4, 39 et 1 μg de C, N et $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de ver de terre (mf).jour $^{-1}$] et *plante* \rightarrow *ver de terre* [2 μg de $\text{S}\cdot\text{g}^{-1}$ de plante (mf).jour $^{-1}$]). La taille des lettres est proportionnelle aux quantités transférées pour chaque compartiment ciblé

2.2. Le changement climatique affecte le fonctionnement biogéochimique C-N-S des tourbières à Sphaignes

2.2.1. Le changement climatique réduit les flux de C des communautés microbiennes

Les microorganismes des sphaignes sont connus comme indicateurs précoces de perturbations environnementales (Gilbert *et al.* 1998 ; Mitchell *et al.* 2003). Or, peu d'études ont évalué la réponse fonctionnelle de cette composante à un réchauffement climatique simulée *in situ*. Nous avons choisi l'approche SIP ^{13}C -PLFAs pour quantifier les flux de C traversant les différentes composantes (bactéries, champignons, protozoaires, ...) du compartiment microbien actif. L'utilisation des biomarqueurs PLFAs permet d'analyser la structure des communautés microbiennes et le marquage ^{13}C d'en estimer l'activité (incorporation du C), l'objectif étant d'évaluer la réponse de l'ensemble de cette communauté au réchauffement climatique en termes de structure.

Ainsi, ce travail a permis de démontrer qu'un réchauffement climatique modéré de + 1 °C pendant 27 mois par « Open Top Chamber » (OTC) :

- i) Ne modifie pas la structure des communautés microbiennes des tourbières à *Sphagnum*, que ce soit dans le fen ou dans le bog.
- ii) En revanche, ralentit significativement l'activité des différents groupes fonctionnels microbiens. Nos résultats démontrent de plus que les communautés microbiennes du fen (bas-marais) ne répondent pas de la même façon que celles du bog (haut-marais, globalement plus aéré en surface). En effet, le bog est l'habitat qui est le plus affecté par le réchauffement climatique : les flux totaux de C qui traversent le compartiment microbien sont 18 fois plus faibles avec les OTCs comparé aux contrôles. Cette réponse négative au réchauffement climatique peut être expliquée par une augmentation du stress hydrique des communautés microbiennes indirectement induit par l'augmentation de température. En effet, et plus particulièrement en bog, le réchauffement climatique pendant l'été a entraîné une augmentation du processus d'évapotranspiration qui s'est traduit par une amplification de la dessiccation de surface des sphaignes. En milieu très humide comme le fen, le processus d'évapotranspiration peut provoquer une diminution de la température du sol via des pertes de chaleur vers l'atmosphère et une diminution de la conductivité thermique du sol (Dabros *et al.* 2010). Ce phénomène peut expliquer l'effet marginal des

OTCs sur la température de la tourbe de fen, et donc sur les activités des communautés microbiennes.

iii) Affecte la boucle microbienne, réduisant les transferts de C vers les Protozoaires. Ceci est d'autant plus important que cette réduction d'activité, dommageable au fonctionnement du cycle du C, se traduit par une baisse de la diversité des Thécamoebiens (Jassey *et al.* 2011).

2.2.2. Le changement climatique affecte l'écosystème tourbière à *Sphagnum* : glissement vers un fonctionnement « source » de C ?

Le devenir des quantités de C stocké dans la tourbe a depuis de nombreuses années retenu l'attention de la communauté scientifique mondiale (Gorham 1991 ; Moore *et al.* 1998 ; Moore 2002). Cependant, l'impact du changement climatique sur la dynamique du cycle du C dans les tourbières à Sphaignes, n'a pas jusqu'à présent été élucidé, la réponse à l'augmentation des températures de l'atmosphère dépendant également de nombreux facteurs comme le niveau de nappe (Updegraff *et al.* 2001) ou l'augmentation des dépôts atmosphériques (Francez *et al.* 2011 ; Limpens *et al.* 2011).

Nos résultats soutiennent les hypothèses des auteurs précédemment cités. L'augmentation attendue de 2 à 8 °C des températures dans l'hémisphère boréal pour les prochaines décennies va gravement déstabiliser le fonctionnement biogéochimique C-N-S des tourbières tempérées.

Nos résultats indiquent que les réponses au changement climatique ne sont pas identiques dans le fen et dans le bog. Ainsi dans le fen, les modifications en termes de structure et de fonctionnement sont plus nuancées que dans le bog, confirmant les travaux d'Updegraff *et al.* (2001) sur l'importance du facteur hydrique et hydrologique.

Nos résultats démontrent que ce sont les sphaignes, espèces ingénieuses à l'origine du processus de tourbification, qui sont les plus affectées par le changement climatique, aussi bien dans le fen que dans le bog, avec une réduction de la production primaire C. Mais parallèlement, la productivité des végétaux vasculaires pourrait être également modifiée, nos résultats soulignent cette tendance mais ne la confirment pas. Les flux de C et de S dans les végétaux vasculaires augmenteraient dans le bog, mais dans le fen, seul le flux de C diminuerait. Les flux d'N ne seraient pas altérés, au moins à court terme (27 mois d'expérimentation). Ces résultats démontrent l'importance de la prise en compte, non

seulement du C mais également des nutriments comme l’N ou le S, dans la perspective d’une approche stœchiométrique certainement plus proche de la réalité des processus de transferts d’éléments dans l’écosystème. Ainsi, la réponse du compartiment végétation est susceptible d’altérer le fonctionnement « puits » de la tourbière et l’accumulation de MO à l’échelle de l’écosystème mais la dynamique du C dans la tourbière n’est pas uniquement tributaire de la fixation de C par la végétation. En effet, la modification du bilan de C, en faveur d’un piégeage de C dans la tourbe ou d’une augmentation des émissions dans l’atmosphère dépend de l’impact du réchauffement sur les transformateurs de la MO, décomposeurs et enchytréides (détritivores).

Les flux de C du compartiment microbien sont clairement perturbés, bien que nous n’ayons pas mis en évidence de changement significatif de structure dans les profils PLFAs (*cf. supra*). Tous les principaux groupes (bactéries, champignons, protozoaires, ...) voient leur activité diminuée. La diminution du flux de C à travers les protozoaires révèle un dysfonctionnement dans le fonctionnement de la boucle microbienne, la prédation de ces microorganismes jouant un rôle prépondérant dans le recyclage du C.

L’abondance et l’activité des enchytréides est régi par la température et l’humidité du sol, cette dernière constituant le facteur principal régulant leur répartition et leur comportement (Abrahamsen 1971 ; Sulkava *et al.* 1996). Le réchauffement climatique ayant des conséquences fortes sur ces deux variables, il était important de s’intéresser à ce groupe de détritivores, bien représentés dans les tourbières à Sphaignes. Selon Cole *et al.* (2002), les enchytréides, favorisés par une hausse de température, seraient des acteurs importants de pertes de DOC en conditions de réchauffement climatique. Nos résultats montrent que le changement climatique entraînerait une baisse des flux de C traversant le compartiment enchytréide aussi bien en fen qu’en bog (seul le flux d’N diminuerait dans le fen). En conséquence, dans la tourbière étudiée, les enchytréides ne pourraient être impliqués dans l’augmentation des pertes de DOC à l’échelle de l’écosystème.

3. Perspectives de recherche

D'ores et déjà, différentes perspectives de recherche sont identifiées et, pour certaines d'entre elles, rapidement réalisables pour approfondir les connaissances acquises durant ce travail. Sont détaillés ci-dessous, selon les différents niveaux d'organisation de l'individu à l'écosystème, les perspectives de ce travail de recherche qui mériteraient d'être développées.

3.1. A l'échelle de l'individu *Lumbricus rubellus*

Le S est un élément majeur dans le fonctionnement de l'écosystème tourbière, de par les quantités importantes séquestrées dans la tourbe, son contrôle sur les flux de C comme l'émission de CH₄ (Dise et Verry 2001) ou sa dynamique couplée à l'N (Moore *et al.* 2005). Cependant, à notre connaissance seule une étude s'est intéressée à évaluer l'impact du régime alimentaire des vers de terre sur le S du sol (S total et $\delta^{34}\text{S}$; Grethe *et al.* 1996). C'est en partie ce manque d'informations qui a motivé nos études. Ainsi, nous avons pu quantifier les turnovers en S et les transferts biogéniques de *L. rubellus* qui selon nous se présenteraient sous la forme de mucoprotéines sécrétées par la surface du corps du ver de terre. Des analyses en RAMAN (ou spectroscopie RAMAN) de parois de galeries indurées dans de la résine n'ont pas permis d'obtenir de spectres de raies nécessaires à la détermination de la forme de ce S labile (spéciation). L'extraction de ce S suivie d'analyses par HPLC-IRMS (chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse à ratio isotopique) permettrait de déterminer la forme de ces molécules riches en S.

3.2. A l'échelle des communautés microbiennes

Des blocs de tourbe (4 × 4 × 4 cm) ont été prélevés à chaque date de mesure à l'interface entre le niveau de nappe et les sphaignes vivantes des mésocosmes de Frasne, puis immédiatement fixés avec du glutaraldéhyde à 2 % dans un tampon PBS 0.1×. Les analyses par NanoSIMS de ces blocs permettront de mesurer les enrichissements en ¹⁵N et ³⁴S des différents groupes fonctionnels microbiens (bactéries, amibes à thèques, rotifères, ...) préalablement identifiés par microscopie électronique à balayage. L'évolution des enrichissements en ¹⁵N et ³⁴S de ces organismes à chaque date de mesure permettra d'observer indirectement les transferts de

matière s'opérant dans la boucle microbienne. Il serait également intéressant de coupler la NanoSIMS avec des sondes bactériennes FISH (fluorescence in situ hybridization) pour analyser les communautés syntrophiques impliquées dans les cycles du N et du S de la tourbe.

L'approche SIP ^{13}C -PLFAs nous a permis de déterminer la structure et quantifier les flux de C traversant la communauté microbienne de la tourbière de Frasne. Les méthanogènes (*Archaea*) sont un autre groupe microbien important que l'on retrouve dans les tourbières à Sphaignes (Kotsyurbenko *et al.* 2004). Leur activité et leur impact sur les flux de C sont également susceptibles de varier en réaction au changement climatique, mais ce groupe fonctionnel est impossible à identifier à l'aide de simples extractions PLFAs (Gattinger *et al.* 2003 ; Huguet *et al.* 2010). L'analyse des éthers phospholipidiques (PLELs) de ces *Archaea* couplée à un traçage ^{13}C (SIP ^{13}C -PLELs) permettrait de quantifier les flux de C traversant ce compartiment et d'évaluer sa réponse aux changements climatiques.

3.3. A l'échelle de l'écosystème

Les analyses de compositions isotopiques en ^{13}C , ^{15}N et ^{34}S des extraits fumigés et non fumigés de tourbe nous permettront de boucler les bilans d'éléments sur l'ensemble des grands compartiments biotiques de la tourbière à Sphaignes, et d'estimer les flux nets C, N et S du compartiment microbien. Il serait également intéressant de calculer les flux bruts d'immobilisation/minéralisation C-N-S du compartiment microbien, la connaissance des flux nets n'étant pas suffisante pour caractériser l'ensemble de la réalité des transferts d'éléments. Ces calculs sont possibles avec les équations de Kirkham et Bartholomew (1954) en utilisant les valeurs de biomasses microbiennes C, N et S et les stocks de C, N et S de la tourbe entre deux dates de mesures. Cette approche est d'autant plus intéressante qu'elle n'a jamais été utilisée en tourbière et permettrait d'évaluer l'effet du changement climatique sur l'immobilisation dans la biomasse microbienne des différents éléments C-N-S.

Nous ne pouvons pas exclure l'absence de pertes sous formes gazeuses, autre que sous forme de CO_2 , de nos systèmes (microcosmes et mésocosmes). Les pertes sous forme N_2O et N_2 (dénitrification) ou H_2S (sulfato-réduction) sont ainsi possibles sous réserves d'apports suffisants en NO_3^- et SO_4^{2-} , et de conditions anoxiques du milieu. Ces pertes restent facilement mesurables par chromatographie en phase gazeuse contrairement aux composés organiques volatils (COVs). Ces derniers sont des composés carbonés produits par les plantes et les microorganismes pouvant représenter jusqu'à 5 % du « total net carbon exchange »

d'une tourbière boréale (hors émission de CH₄ ; Bäckstrand *et al.* 2008). L'isoprène (C₅H₈) est produit en majorité par les Bacillus et Actinomycètes et représente en moyenne 44 % des COVs (Guenther *et al.* 1995). Outre le fait qu'ils peuvent contribuer de façon non négligeable aux bilans de C de l'écosystème, ce sont également pour certains d'entre eux des GES, ce qui rend leur suivi doublement intéressant pour évaluer les rétroactions attribuées aux tourbières face aux changements climatiques.

Enfin, les données de flux et de stocks acquis dans notre travail de thèse vont permettre d'alimenter un modèle C-N de prédiction de l'évolution à moyen terme (10-20 ans) du fonctionnement de la tourbière en conditions de réchauffement climatique, intégrant trois sous-modèles (C, N et hydrologie). Le travail devrait permettre d'évaluer la dynamique de la fonction de « puits » de C en relation avec les scénarios d'émissions en GES du GIEC. L'ensemble des compartiments sphaignes, végétaux vasculaires, enchytréides, bactéries, champignons et protozoaires est pris en compte (Go 2011), le modèle intégrant des processus biogéochimiques multi-compartiments du cycle du C couplé à l'N.

Références

- Abrahamsen G (1971) The influence of temperature and soil moisture on the population density of *Cognettia sphagnetorum* (Oligochaeta: Enchytraeidae) in cultures with homogenized raw humus. *Pedobiologia* 11:417-424
- Bäckstrand K, Crill PM, Mastepanov M, Christensen TR, Bastviken D (2008) Non-methane volatile organic compound flux from a subarctic mire in Northern Sweden. *Tellus* 60B:226-237
- Binet F, Tréhen P (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biol Biochem* 24:1501-1506
- Binet F, Fayolle L, Pussard M (1998) Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biol Fertil Soils* 27:79-84
- Brown GG, Barois I, Lavelle P (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur J Soil Biol* 36:177-198
- Cole L, Bardgett RD, Ineson P, Adamson JK (2002) Relationships between enchytraeid worms (Oligochaeta), climate change, and the release of dissolved organic carbon from blanket peat in northern England. *Soil Biol Biochem* 34:599-607
- Dabros A, Fyles JW, Strachan IB (2010) Effects of open-top chambers on physical properties of air and soil at post-disturbance sites in northwestern Quebec. *Plant Soil* 333:203-218
- Dise NB, Verry ES (2001) Suppression of peatland methane emission by cumulative sulfate deposition in simulated acid rain. *Biogeochemistry* 53:143-160

- Francez AJ, Pinay G, Josselin N, Williams BL (2011) Denitrification triggered by nitrogen addition in *Sphagnum magellanicum* peat. *Biogeochemistry* 106:435-441
- Gattinger A, Günthner A, Schlöter M, Munch JC (2003) Characterisation of *Archaea* in soils by polar lipid analysis. *Acta Biotechnol* 23:21-28
- Gilbert D, Amblard C, Bourdier G, Francez AJ (1998) The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function, and impact of nutrient input. *Microb Ecol* 35:83-93
- Go N (2011) Modélisation de la fonction “puits de carbone” des tourbières à Sphaignes en contexte de changement climatique. Rapport de stage M2, Université de Rennes 1, pp 32
- Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol Appl* 1:182-195
- Grethe S, Schrader S, Gieseemann A, Larink O, Weigel HJ (1996) Influence of earthworms on the sulfur turnover in the soil. *Isot Environ Health S* 32:211-217
- Guenther A, *et al.* (1995) A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res* 100D5:8873-8892
- Huguet A, Fosse C, Laggoun-Défarge F, Toussaint ML, Derenne S (2010) Occurrence and distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraethers in a French peat bog. *Org Geochem* 41:559-572
- Jassey VEJ, Gilbert D, Binet P, Toussaint ML, Chiapusio G (2011) Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions. *Can J Microbiol* 57:226-235
- Kotsyurbenko OR, Chin KJ, Glagolev MV, Stubner S, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Conrad R (2004) Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environ Microbiol* 6:1159-1173
- Herrmann AM, Clode PL, Fletcher IR, Nunan N, Clode PL, Stockdale EA, O'Donnell AG, Murphy DV (2007) A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 21:29-34
- Kirkham D, Bartholomew WV (1954) Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data. *Soil Science Society of America Proceedings* 18:33-34
- Le Bayon RC, Binet F (2006) Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biol Biochem* 38:235-246
- Limpens J, Berendse F, Blodau C, Canadell JG, Freeman C, Holden J, Roulet N, Rydin H, Schaepman-Strub G (2008) Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications – a synthesis. *Biogeosciences Discuss* 5:1379-1419
- Limpens J, *et al.* (2011) Climatic modifiers of the response to nitrogen deposition in peat-forming *Sphagnum* mosses: a meta-analysis. *New Phytol* 191:496-507
- Mitchell EAD, Gilbert D, Buttler A, Amblard C, Grosvernier P, Gobat JM (2003) Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microb Ecol* 46:187-199
- Moore TR, Roulet NT, Waddington JM (1998) Uncertainty in predicting the effect of climatic change on the carbon cycling of Canadian peatlands. *Climatic Change* 40:229-245
- Moore PD (2002) The future of cool temperate bogs. *Environ Conserv* 29:3-20

- Moore T, Blodau C, Turunen J, Roulet N, Richard PJH (2005) Patterns of nitrogen and sulfur accumulation and retention in ombrotrophic bogs, eastern Canada. *Glob Change Biol* 11:356-367
- Sulkava P, Huhta V, Laakso J (1996) Impact of soil faunal structure on decomposition and N-mineralisation in relation to temperature and moisture in forest soil. *Pedobiologia* 40:505-513
- Updegraff K, Bridgham SD, Pastor J, Weishampel P, Harth C (2001) Response of CO₂ and CH₄ emissions from peatlands to warming and water table manipulation. *Ecol Appl* 11:311-326
- Tiunov AV, Scheu S (1999) Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol Biochem* 31:2039-2048

ANNEXES

 ANNEXE I : Biomasses des lombriciens et des plantes utilisés dans les mésocosmes et microcosmes de tourbe

	<i>L. rubellus</i> mésocosmes	<i>L. rubellus</i> microcosmes	<i>E. angustifolium</i> mésocosmes
Biomasses en g	a = 0.85 ± 0.01 (n = 39)	a = 0.46 ± 0.01 (n = 38)	5.26 ± 0.23 (n = 68)
moyenne ± S.E. en masse fraîche	b = 1.03 ± 0.01 (n = 39)	b = 0.54 ± 0.01 (n = 38)	
(≠ classes de taille	c = 1.20 ± 0.01 (n = 39)	c = 0.62 ± 0.00 (n = 19)	
pour <i>L. rubellus</i>)		d = 0.69 ± 0.01 (n = 19)	
		e = 0.76 ± 0.01 (n = 19)	
		f = 0.88 ± 0.01 (n = 19)	

ANNEXE II : Protocole d'extraction des acides gras phospholipidiques (PLFAs) de la tourbe (méthode de Bligh et Dyer (1959) modifiée par Andersen *et al.* (2010))

Step 1. Prepare soil: In TPS vials.

Freeze soil after collection. Freeze-dry as soon as possible: soil can be stored indefinitely freeze-dried, in a freezer. Grind soil with scissors and mix it.

Step 2. Extract fatty acids from whole soil

1. Weigh out 250 mg of freeze-dried sample.
2. Add 3.6 ml P-Buffer, 4ml CHCl₃ and 8 ml MeOH bidistilled **in that order**.
(P-Buffer: Phosphate-Buffer; 0.1M & pH 7: 39 ml 1M K₂HPO₄ + 61 ml 1M KH₂PO₄ for one liter)
3. Shake for 1 h.
4. Add 3.6 ml P-buffer and 4 ml CHCl₃.
5. Shake the glass tube for 1 minute.
6. Let stand overnight (or 2 h) for separation in the dark (cover in aluminum foil).
7. Filtrate on paper (vacuum flask).
8. Let stand few minutes for separate phases by decantation.
9. Aspirate the bottom layer off of the tubes (**CHCl₃ layer**).
10. Pass it through MgSO₄ column (to remove residual water) (water molecules will attack fatty-acid double bonds). Add CHCl₃ to fill MgSO₄ column.
11. Evaporate the CHCl₃ layer off with N₂ but do not exceed 30°C.

Step 3. Solid Phase Extraction (SPE) disposable cartridge: separate the lipid classes

12. Set-up SPE cartridges in a rack suspended over glass tubes (approx. 15 ml) for mixed solvent waste.
13. Add 3 ml CHCl₃ to condition the column (approx. volume, to 1/2 fill SPE cartridge).
14. Transfer lipids from the glass tube to the cartridge with CHCl₃ (1× 1ml and 2× 0.5 ml).
15. Add approximately 5 ml CHCl₃ to the cartridge unit (almost fill the cartridge). Allow to drain by gravity → **basic lipids** ↓
16. Add approximately 10 ml acetone (2 aliquots of 5 ml each) completely drain column → **glycolipids** ↓
17. Clean-off the bottom of cartridge tips with a clean paper (and MeOH if necessary).
18. Switch collection tubes to sample set. **Next fraction is what you keep.**
19. Add 5 ml MeOH to cartridge (almost fill cartridge). **Save this elutant** and evaporate the MeOH with N₂ but do not exceed 30°C.

Step 4. Make Methyl-Esters (Transesterification)

20. Add 6 ml MeOH and transfer 2 mL in an other glass tube (for picolinyl esters analyses).
21. On the remaining 4 mL MeOH, add 1 ml of Toluene and 1 ml *methanolic* KOH (~ 1M) and vortex briefly to mix the two phases (make methanolic KOH fresh each day) (Make a small quantity of 1M KOH in methanol. This must be made fresh every time you use it, to keep water out of it. Weigh ~ 5.6 g of KOH and add it in ~ 100 ml of MeOH)
22. Incubate at 40°C for at least 20 minutes
23. Let samples cool to room temperature
24. Add 4 ml petrol ether and 1ml CHCl₃, mix it.
25. Neutralize sample with ~ 3 ml of ~ 1M acetic acid.
(for ~ 1M acetic acid: ~ 58ml Glacial Acetic Acid / 1L water)
26. Add ~ 6 ml distillated water, then vortex for 30 seconds.
27. Separate phases by decantation.
28. Remove upper layer (ether petrol) to a new tube (pass it through MgSO₄ column before).
29. Dry with N₂ but do not exceed 30°C.

Step 5. Transfer to GC vials with glass inserts

30. Suspend the dried lipids in ~ 100 µl of petrol ether, and transfer it in GC vial. Dry the two vials with N₂.
31. Add 50 µl of internal standard (IS = Methyl nonadecanoate C₁₉O₂Me) into the GC vial (50 µl at 20 mg.L⁻¹ for 3.2 mmoles). Dry with N₂ and store at 4°C.

32. GC-MS Analysis.

ANNEXE III : Procédure pour le traitement d'images et les calculs des abondances en ^{15}N et ^{34}S avec la NanoSIMS (Gicquel *et al.* 2012)

Etape 1 : Chargements des fichiers .im

1. Lancement du logiciel ImageJ.
2. Ouverture du module d'analyses NRIMS : Plugins > Open MIMS Image.
3. *NRIMS Analysis Module* : File > Open MIMS Image.

Etape 2 : Transformation des images

4. Choix d'une couleur type RGB : Sélection d'une image > Image > Lookup Tables > Rainbow RGB.
5. Lissage des images avec un filtre : Sélection d'une image > Process > Filters > Mean > radius = 1.0 pixels.

Etape 3 : Calcul des abondances isotopiques ex. pour le ^{15}N

6. Calcul de l'image $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$: Process > Image Calculator > Image 1 = $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$; Operation = add ; Image 2 = $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$; Create new window ; **32-bit (float) result** .
7. Calcul de l'image $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-)$: Process > Image Calculator > Image 1 = $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$; Operation = divide ; Image 2 = $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$; Create new window ; **32-bit (float) result** .
8. Résultats en % (Atom %) : Sélection de l'image $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- / (^{12}\text{C}^{14}\text{N}^- + ^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-)$ > Process > Math > Multiply > Value = 100.

Etape 4 : Mise en forme des images d'abondances isotopiques ^{15}N et ^{34}S

9. Choix du contraste de l'image : Sélection de l'image > Image > Adjust > Brightness/Contrast.
10. Choix de l'échelle : Sélection de l'image > Analyze > Set Scale > Distance in pixels = 128 ; Known distance = 30 ; Pixel aspect ratio = 1.0 ; Unit of length = μm .
11. Intégrer une barre d'échelle dans l'image : Sélection de l'image > Analyze > Tools > Scale Bar.
12. Intégrer une échelle de calibration : Sélection de l'image > Analyze > Tools > Calibration Bar.

Etape 5 : Linescans : A faire avant l'intégration des barres d'échelle et de calibration.

13. Lissage des images avec un filtre pour réduire le bruit de fond des distributions isotopiques : Sélection de l'image > Process > Filters > Mean > radius = 3.0 pixels.
14. Traçage d'une droite (linescan) à l'aide de la fonction 'Straight' d'ImageJ.
15. Profile du linescan : Sélection de l'image > Analyze > Plot Profile.
16. Récupération des valeurs du profile pour les utiliser dans un tableur : Bouton 'List' du 'Plot Profile'.

N.B. Possibilité d'agrandir les images de bases pour avoir de meilleures résolutions ex. images 128×128 pixels en 500×500 pixels : Sélection d'une image > Image > Adjust > Size > width et height = 500 ; **interpolation bicubic**.

Attention à adopter les filtres de lissage en conséquence des agrandissements.

Résumé

Dans un contexte de changements globaux, la fonction de "puits" de carbone (C) des tourbières est susceptible de basculer vers une fonction "source", en libérant dans l'atmosphère de grandes quantités de C initialement stockées dans la tourbe. Cette thèse vise à caractériser et quantifier, à différents niveaux d'organisation, i) l'impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement biogéochimique (C-N-S) d'une tourbière à Sphaignes et ii) l'impact de la restauration d'une tourbière abandonnée après exploitation sur les interactions entre les plantes recolonisatrices (*Eriophorum angustifolium*), la macrofaune (*Lumbricus rubellus*) et les microorganismes potentiellement impliqués dans la régénération du processus de tourbification. Le fonctionnement de la tourbière et les interactions biotiques ont été étudiées par couplage des cycles C-N-S et traçage isotopique ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S . Une augmentation modérée de + 1°C simulée par "Open Top Chambers" (OTCs) diminue significativement les flux de C à l'échelle de l'écosystème, la production primaire des Sphaignes et le compartiment microbien étant les plus affectés. A l'échelle des communautés, l'activité des bactéries anaérobies, des champignons et des protozoaires (estimée par SIP ^{13}C -PLFAs) est significativement ralentie. Nous avons montré qu'un organisme ingénieur comme le ver de terre *L. rubellus* jouait un rôle positif dans le recyclage de la matière organique en fournissant indirectement des éléments (C > N > S) à la plante. Ces transferts seraient dépendants des traits fonctionnels de l'organisme. A l'échelle de l'individu, nous avons caractérisé par approche NanoSIMS, les transferts "anticorrélés" N-S ver de terre → tourbe.

Abstract

In a context of global change, peatlands "sink" function of carbon (C) is likely to switch to a "source" function, releasing into the atmosphere large quantities of C initially stored in the peat. This thesis aims to characterize and quantify at different levels of organization: i) the impact of global warming on *Sphagnum*-peatland biogeochemical functioning (CNS) and ii) the impact of restoration of peatland abandoned after harvesting of peat on the interactions between recolonizing plants (*Eriophorum angustifolium*), macrofauna (*Lumbricus rubellus*) and the microorganisms potentially involved in the regeneration process of peat forming. The peatland functioning and biotic interactions have been studied by coupling C-N-S and isotope tracing ^{13}C - ^{15}N - ^{34}S . A moderate increase of + 1°C simulated by "Open Top Chambers" (OTCs) significantly reduces C fluxes at the ecosystem level, the primary production of *Sphagnum* and the microbes are most affected. At the community level, the activity of anaerobic bacteria, fungi and protozoa (estimated by SIP ^{13}C -PLFAs) was significantly slowed. We showed that a soil engineer as the earthworm *L. rubellus* played a positive role in recycling organic matter indirectly by providing elements (C > N > S) to the plant. Transfers depend on the functional traits of the organism. At the individual level, we have characterized using NanoSIMS, "anticorrelated" NS transfers from earthworms to peat.