



HAL
open science

Microbiologie des plantes en coussin des milieux alpins: influence des facteurs biotiques et abiotiques dans l'assemblage des communautés microbiennes

Julien Roy

► **To cite this version:**

Julien Roy. Microbiologie des plantes en coussin des milieux alpins: influence des facteurs biotiques et abiotiques dans l'assemblage des communautés microbiennes. Interactions entre organismes. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT: . tel-01141406

HAL Id: tel-01141406

<https://theses.hal.science/tel-01141406>

Submitted on 12 Apr 2015

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité Ecologie Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Julien ROY

Thèse dirigée par **Roberto Geremia**
préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie Alpine**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

**Microbiologie des plantes en
coussin des milieux alpins :
influence des facteurs biotiques
et abiotiques dans l'assemblage
des communautés microbiennes**

Thèse soutenue publiquement le **18 Septembre 2014**,
devant le jury composé de :

M. Serge AUBERT

Professeur à l'Université de Grenoble, Examineur

M. Francesco De BELLO

Chercheur à l'Institut Botanique de Trebon (République Tchèque), Rapporteur

Mme Monique GARDES

Professeure à l'Université de Toulouse, Examinatrice

M. Roberto GEREMIA

Directeur de recherche au Laboratoire d'Ecologie Alpine, Grenoble, Directeur de thèse

Mme Corinne VACHER

Chargée de recherche à l'INRA de Bordeaux, Rapportrice

M. Marc-André SELOSSE

Professeur au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, Examineur

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /

Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



*« Comme nous ne cherchions rien,
nous découvrons tout. Comme
nous n'allions nulle part, nous
arrivions partout... ».*

Patrick Chamoiseau,
Les neuf consciences du malfini.

Remerciements

Je porte tout naturellement mes premiers remerciements à Roberto Geremia et à Charline Giguet-Covex, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Roberto, merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir épaulé dans les moments (très) difficiles. Tes qualités humaines et scientifiques m'ont sincèrement beaucoup apporté et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Cette dernière année dans le bureau a été bénéfique. Je t'estime en tant qu'homme et en tant que scientifique. Charline, merci d'avoir été là pour me soutenir, pour ton aide personnelle et professionnelle qui me permettent aujourd'hui de clôturer plus qu'un chapitre de thèse mais un chapitre de ma vie.

Je tiens à remercier Lucie Zinger, un modèle depuis mon premier stage au LECA. C'est maintenant en fin de thèse que je comprends et prends note de tes nombreux conseils. Je t'ai toujours admirée et je te souhaite de trouver un poste.

Je remercie Sébastien Lavergne de m'avoir permis de travailler sur le projet Ecologie Verticale, une thèse en a émergé. Je remercie également toute l'équipe du projet, Cécile Albert, Sébasien Ibanez et Patrick Saccone. Le terrain a été pour moi un moment d'exception. Je suis heureux que l'on s'en soit sortis, lors de la montée à Roche Colombe quand Cécile a pris une grosse pierre dans la jambe alors que le gaz au dessous était des plus impressionnant, ou lors de la descente de la pointe du Combeynot par la face Nord quand Seb L. avait vu des traces qui se sont avérées être celles de chamois. Merci Patrick pour ton professionnalisme en montagne. Quelle descente et traversée au piolet et à la corde, et quelle marche des heures durant, à voir le parking quasiment 2000 m de dénivelé plus bas.

Je remercie Philippe Choler pour ces critiques sévères mais justes. Ta rigueur n'est qu'un exemple à suivre et ne tire que vers le haut. Merci également de m'avoir emmené à Montpellier au workshop sur les interactions biotiques.

Je remercie Muriel Raveton pour m'avoir fait confiance pour l'analyse d'un jeu de données de séquençage bactérien et pour la participation au papier.

Je remercie l'équipe Emabio, particulièrement Florian Boucher et Florent Mazel pour les moments passés, pour votre écoute ou votre aide en toute honnêteté et sans jugement. Je remercie également Damien Georges pour son aide sur R, toujours présent et avec plaisir.

Je remercie l'ensemble de l'équipe pédagogique, Rolland Douzet pour m'avoir confié les cours magistraux de biologie végétale en L1 et ainsi la possibilité de me retrouver de l'autre côté du bureau dans les amphis où moi-même étais étudiant. Stéphane Bec pour m'avoir soulagé de quelques corrections de l'examen d'écologie alors que je rédigeais ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de foot du LECA pour avoir vibrer ensemble au son de la victoire et de la défaite, tous ceux qui se sont battus. Quelle défaite en 2012, Mazout et Alberto, merci pour ces deux penaltys ratés lors des quarts de finale. Dur. Ce match reste pour moi une victoire.

Merci à mes amis d'avoir été là dans les bons et mauvais moments, Jojo, Kéké, Barbiche. Merci également à Fred Boyer. Merci à Gui et Arnaud, à Guillaume Chevrier, maître yogi.

Enfin je remercie mes parents, d'un soutien inconditionnel depuis toujours, merci Papa, merci Maman. Une grosse pensée à ma sœur aussi.

Une page se tourne, une pensée à ceux qui ont fait mes joies, à ceux qui ont fait mes peines, mes soleils et mes lunes.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
AVANT-PROPOS.....	13
INTRODUCTION GENERALE.....	15
I. Contexte et enjeux de la microbiologie environnementale.....	15
1. Définition et petite histoire de la microbiologie environnementale.....	15
2. Diversité des microorganismes dans le vivant.....	16
3. Rôle des microorganismes dans l'environnement.....	19
4. Importance socio-économique des microorganismes	21
II. Approches conceptuelles en microbiologie environnementale.....	24
1. Une unité d'évolution et de diversité : le concept d'espèce et son applicabilité aux microorganismes	24
1.1. Les différents concepts pour définir et caractériser une espèce.....	24
1.2. Cadre méthodologique : les OTUs (Operational Taxonomic Units)	28
2. Biogéographie microbienne : beta diversité et écologie des communautés	28
2.1. Biogéographie, généralités.....	28
2.2. La beta diversité et l'assemblage des communautés.....	29
2.3. Biogéographie et assemblage des communautés microbiennes	30
2.4. Influence de la résolution spatiale, taxonomique et temporelle	35
2.5. L'importance des facteurs biotiques.....	38
3. Sur la connaissance des niches écologiques chez les microorganismes	39
3.1. Contexte : le lien phylogénie-fonction.....	39
3.2. Connaissances des niches écologiques chez les microorganismes.....	41
III. Microbiologie terrestre	48
1. Influence des facteurs abiotiques du sol	49
2. Importance des facteurs biotiques dans les sols	50
2.1. Le cas particulier des sols : le couvert végétal.....	50
2.2. Un effet singulier de chaque espèce végétale ? Similarité fonctionnelle et similarité phylogénétique	52
2.3. Lien avec le fonctionnement de l'écosystème.....	54
IV. Méthodes de caractérisation des communautés microbiennes	58
1. Caractérisation d'une communauté microbienne.....	58
2. Les outils et méthodes de caractérisation des communautés microbiennes.....	59
2.1. Les méthodes traditionnelles et bas débit.....	59
2.2. Les méthodes moléculaires haut débit	60
2.3. Comment traiter les données de séquençage : quelles méthodes pour quels objectifs ?	62
2.4. Limites des approches moléculaires.....	66
3. Stratégies d'échantillonnage.....	70
4. Comment analyser la beta diversité : quelles méthodes pour quels objectifs ?.....	71
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	75
PRESENTATION DU SYSTEME D'ETUDE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE.....	77
I. Les plantes en coussins des milieux alpins : un modèle pour l'étude de la distribution spatiale des microorganismes.....	77
1. Les plantes en coussin : espèces fondatrices de l'écosystème.....	77
1.1. Le concept d'espèce ingénieure de l'écosystème	77
1.2. Le cas des plantes en coussins.....	79
1.3. Variation de l'effet ingénieur.....	81
2. Le système coussin des falaises d'altitude pour l'étude de l'écologie des communautés microbiennes.....	81
II. Présentation du système d'étude.....	84
1. Espèce modèle: <i>Silene acaulis</i> (Caryophyllaceae) L.....	84
2. Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage	85
CHAPITRE I. STRUCTURATION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET FONGIQUES PAR SILENE ACAULIS: L'IMPORTANCE DE L'EFFET INGENIEUR	89
I. Problématique et démarche scientifique.....	89
1. Contexte général	89
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	89
Article I.....	91
Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities	91

<i>III. Discussion</i>	107
1. Effet tampon de la plante sur le contexte environnemental : homogénéisation du pH du sol et apport de nutriments.....	107
2. Des différences inter-règnes de réponse à la plante.....	107
3. Sélection des communautés microbiennes par la plante le long d'un gradient de stress.....	108
4. Lien entre communautés microbiennes, contexte environnemental et variables abiotiques du sol des coussins.....	108
CHAPITRE II. DE L'IMPORTANCE DE LA VARIABILITE GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE INTRASPECIFIQUE DES PLANTES SUR L'ASSEMBLAGE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES	111
<i>I. Problématique et démarche scientifique</i>	111
1. Contexte général.....	111
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	112
<i>II. Contribution</i>	113
Article II.....	113
Genotypic variation within an alpine cushion plant correlates with soil fungal communities.....	113
<i>III. Discussion</i>	142
1. Sur la diversité génétique au sein de <i>S. acaulis</i>	142
2. La réponse des lignées biotrophes à la divergence chez le <i>S. acaulis</i>	144
3. Génétique des communautés et construction de niche.....	145
4. Du rôle des champignons pathogènes dans la spéciation des plantes.....	147
CHAPITRE III. EFFET DES PLANTES EN COUSSINS SUR LA VARIATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES LE LONG DE GRADIENTS D'ALTITUDE	150
PARTIE I. PATRONS DE DIVERSITE MICROBIENNE ALTITUDINAUX.....	150
<i>I. Problématique et démarche scientifique</i>	150
1. Contexte général.....	150
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	151
<i>II. Résultats</i>	153
<i>III. Discussion</i>	156
PARTIE II. EFFET POSITIF DES COUSSINS SUR LA PERSISTANCE DES MICROORGANISMES LE LONG DE GRADIENTS D'ALTITUDE.....	157
I. PROBLEMATIQUE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE.....	157
1. Contexte général.....	157
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	158
<i>II. Contribution</i>	159
Article III.....	159
Testing the positive effect of cushion plants on fungi along elevation.....	159
<i>III. Discussion</i>	173
1. Raisons probables d'un effet non significatif.....	173
2. Tendances à une augmentation de l'effet positif des coussins avec l'altitude.....	174
3. Perspectives dans l'étude de la biodiversité le long de gradients d'altitude.....	175
CHAPITRE IV. BETA DIVERSITE MICROBIENNE : QUID DE LA RESOLUTION PHYLOGENETIQUE ET DES METHODES POUR L'APPREHENSION DES COMMUNAUTES ?	178
PARTIE I. COMPARAISON SSCP ET SEQUENÇAGE.....	178
<i>I. Problématique et démarche scientifique</i>	178
1. Contexte général.....	178
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	178
<i>II. Résultats</i>	179
<i>IV. Discussion</i>	185
PARTIE II. SEQUENÇAGE ET TAXONOMIE DES CHAMPIGNONS: QUELS PATRONS POUR QUELLE RESOLUTION TAXONOMIQUE?.....	187
<i>I. Problématique et démarche scientifique</i>	187
1. Contexte scientifique.....	187
2. Objectifs et démarche de l'étude.....	187
<i>II. Résultats</i>	189
<i>III. Discussion</i>	193
1. De l'effet de la résolution taxonomique sur les patrons de beta-diversité.....	193
2. Quelle information écologique pour quelle résolution taxonomique ?.....	193

3. Du conservatisme de niche chez les champignons	194
4. Une hiérarchie de facteurs environnementaux et de traits fonctionnels.....	195
5. Conclusion	197
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	200
<i>I. Les coussins de S. acaulis, un effet fondateur sur les communautés bactériennes et fongiques</i>	<i>200</i>
1. « Ecosystem engineering » du <i>S. acaulis</i> sur différents niveaux trophiques	200
2. Inclure les microorganismes dans la construction de niche du <i>S. acaulis</i>	203
3. Les microorganismes, un trait végétal ?	204
4. Effet de la plante sur les microorganismes : coussin-spécifique ou effet plante ?	204
<i>II. Biogéographie : les différents processus à l'origine de l'assemblage des communautés microbiennes dans les écosystèmes alpins de falaises</i>	<i>206</i>
1. « Tout est partout mais l'environnement sélectionne » ou « existence de barrières biogéographiques » ?	206
2. Perspectives en biogéographie pour le système plante en coussin et <i>S. acaulis</i>	208
<i>III. Assemblage des communautés fongiques : un effet plante hôte médié par les traits fonctionnels végétaux</i>	<i>210</i>
1. Emergence d'un lien entre communautés fongiques et caractéristiques éco-physiologiques des plantes	210
2. Effet des plantes : singulier, similarité génétique, similarité phylogénétique ou similarité fonctionnelle ?	212
3. Vers une définition des stratégies adaptatives chez les microorganismes	216
<i>IV. Séquençage massif : apports, limites et perspectives</i>	<i>221</i>
1. Apports du séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques	221
2. Limites du séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques.....	223
3. Perspectives pour le séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques	224
4. Accéder à la fonction des communautés microbiennes.....	225
<i>V. Richesse microbienne et ambiguïté des espèces rares</i>	<i>226</i>
CONCLUSION GENERALE	228
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230
ANNEXES.....	251
<i>Annexe 1</i>	<i>253</i>
Nitrogen limitation and microbial diversity at the treeline.....	253
<i>Annexe 2</i>	<i>266</i>
Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies.....	266
<i>Annexe 3</i>	<i>268</i>
Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities.....	268
<i>Annexe 4</i>	<i>271</i>
Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in <i>Phragmites australis</i> rhizosphere.....	271

Avant-propos

Le travail présenté ici s'inscrit dans le cadre de l'écologie des communautés microbiennes. Les objectifs ont été de caractériser la diversité bactérienne et fongique associée aux plantes en coussin, un modèle simplifié (et non pas simple) de la biologie des sols, dans le but de mieux comprendre le rôle des plantes dans l'assemblage des communautés microbiennes et sur leurs réponses aux changements de conditions environnementales. Elle s'appuie sur le développement récent des approches moléculaires de nouvelle génération pour caractériser la diversité microbienne.

Une falaise grise mouchetée de vert qui déchire un ciel bleu. Voilà à quoi ressemble mon paysage de la microbiologie environnementale. Mon intérêt pour la microbiologie est somme toute fortuit, tout comme l'étude microbiologique des plantes en coussin. Tout commence en première année de master avec l'UE « Méthodes en Ecologie, Evolution et Environnement » du master Biodiversité Ecologie Environnement de l'université Joseph Fourier. Avec mon binôme, nous avons choisi le thème « Microbiologie environnementale » comme dernier choix, que mon binôme lui-même m'avait poussé à accepter. Ce thème nous avait été attribué. Oui, on a rarement ce qu'on souhaite. Tout a commencé alors avec l'étude des variations saisonnières chez les bactéries et les champignons de l'étage alpin sous la tutelle de Roberto Geremia qui encadrait alors la thèse de Lucie Zinger sur ce même sujet. Ce regard porté sur le monde invisible des microbes m'avait conquis et s'en était suivi un stage de M1. Je travaillais alors sur la diversité bactérienne associée à différentes espèces de plantes alpines et nous utilisions pour la première fois au LECA l'approche séquençage haut-débit d'amplicons des gènes de l'ARNr 16S. Eté 2010, la belle époque. Alors que nous marchions avec un ami aux alentours du Lac Blanc dans les confins de Belledonne sud, au pied de l'immense falaise du Grand Pic de Belledonne, mon œil fut attiré par des petits monticules verts au milieu d'un environnement relativement très minéral. Ce n'était pas de petits hommes débarqués sur Terre mais bien des coussins de *Silene acaulis*. Me vint alors une multitude de questions concernant les microbes associés à cette plante, notamment par la caractéristique de système en îles alors que je m'intéressais à la biogéographie microbienne à ce moment là. De retour de notre périple

de quelques jours, je retrouvais la technologie et allais chercher sur internet ce que l'on connaissait des plantes en coussins et de leur microbiologie. Je suis tombé sur une fiche projet porté par des chercheurs du LECA, le projet Ecologie Verticale. Après un entretien avec Sébastien Lavergne, j'ai donc entamé mon stage de M2 sur ce projet dont le but était d'étendre l'effet fondateur de ces plantes à différents niveaux trophiques. Et un sujet de thèse a (plus ou moins) émergé alors que je pouvais travailler sur la méta-transcriptomique des sols alpins. Je crois que l'« exotisme » du système avait conquis mon côté naturaliste. Les résultats de ce travail ont montré que la plante est un déterminant majeur de la distribution microbienne, à la fois à l'échelle locale mais aussi et surtout à l'échelle régionale. Les résultats appellent à étudier les différences phylogénétiques et fonctionnelles des communautés microbiennes en fonction des distances phylogénétiques et fonctionnelles entre plantes. Alors au plaisir maintenant de travailler sur les systèmes microbiens avec des approches méta-transcriptomique.

Le présent manuscrit apporte des éléments parfois précis de microbiologie environnementale. Il s'est voulu explicatif et illustré, dans le but qu'il puisse servir à de futurs étudiants.

Introduction générale

I. Contexte et enjeux de la microbiologie environnementale

1. Définition et petite histoire de la microbiologie environnementale

La microbiologie environnementale étudie la diversité, la fonction et les interactions des microorganismes dans l'environnement naturel. C'est une discipline récente, et bien que la supposition de l'existence d'agents infectieux invisibles à l'oeil nu remonte à l'Antiquité, ce n'est qu'en 1677 qu'un microorganisme est observé pour la première fois, par van Leeuwenhoek suite à l'invention du microscope. Au 19^e siècle, les naturalistes imaginaient la distribution des champignons indépendamment de l'écologie, mais plutôt comme une génération spontanée : si les conditions sont bonnes, les champignons appropriés apparaîtront (de Candolle 1920). Les travaux de Pasteur mettent fin à l'idée de génération spontanée. Les prémices de la microbiologie environnementale émergent quand dans les années 1886-1887, Hellriegel and Wilfarth prouvent que la fixation du diazote atmosphérique est réalisée par les bactéries associées aux Légumineuses. Avec ces découvertes suivent l'idée de symbiose entre plantes et microorganismes et de leur importance dans les cycles biogéochimiques. Fasciné par ces travaux, Hiltner montre la spécificité d'hôte de certaines de ces bactéries pour certaines légumineuses (1904). Un peu plus tard Beijerinck met en évidence la réduction du sulfate comme accepteur d'électron dans la respiration à la place de l'oxygène montrant l'importance des microorganismes dans des cycles biogéochimiques variés. Il mène également des travaux de culture de bactéries, et montre que certaines bactéries apparaissent suite à un changement de milieu. Reprenant les travaux de Beijerinck, Baas-Becking (1934) replace ces organismes dans une dimension écologique. En cultivant des bactéries sur différents milieux de culture, il montre l'inégalité des microorganismes face aux conditions environnementales. Les fondements de la biogéographie microbienne dans un contexte écologique sont posés.

Depuis, les connaissances en microbiologie environnementale s'accroissent considérablement. L'utilisation de l'ADN et de la biologie moléculaire a rendu compte de la diversité du monde microbien et de sa distribution spatio-temporelle. Aujourd'hui,

les microorganismes sont inclus dans des modèles de processus écosystémiques (Orwin *et al.* 2011).

2. Diversité des microorganismes dans le vivant

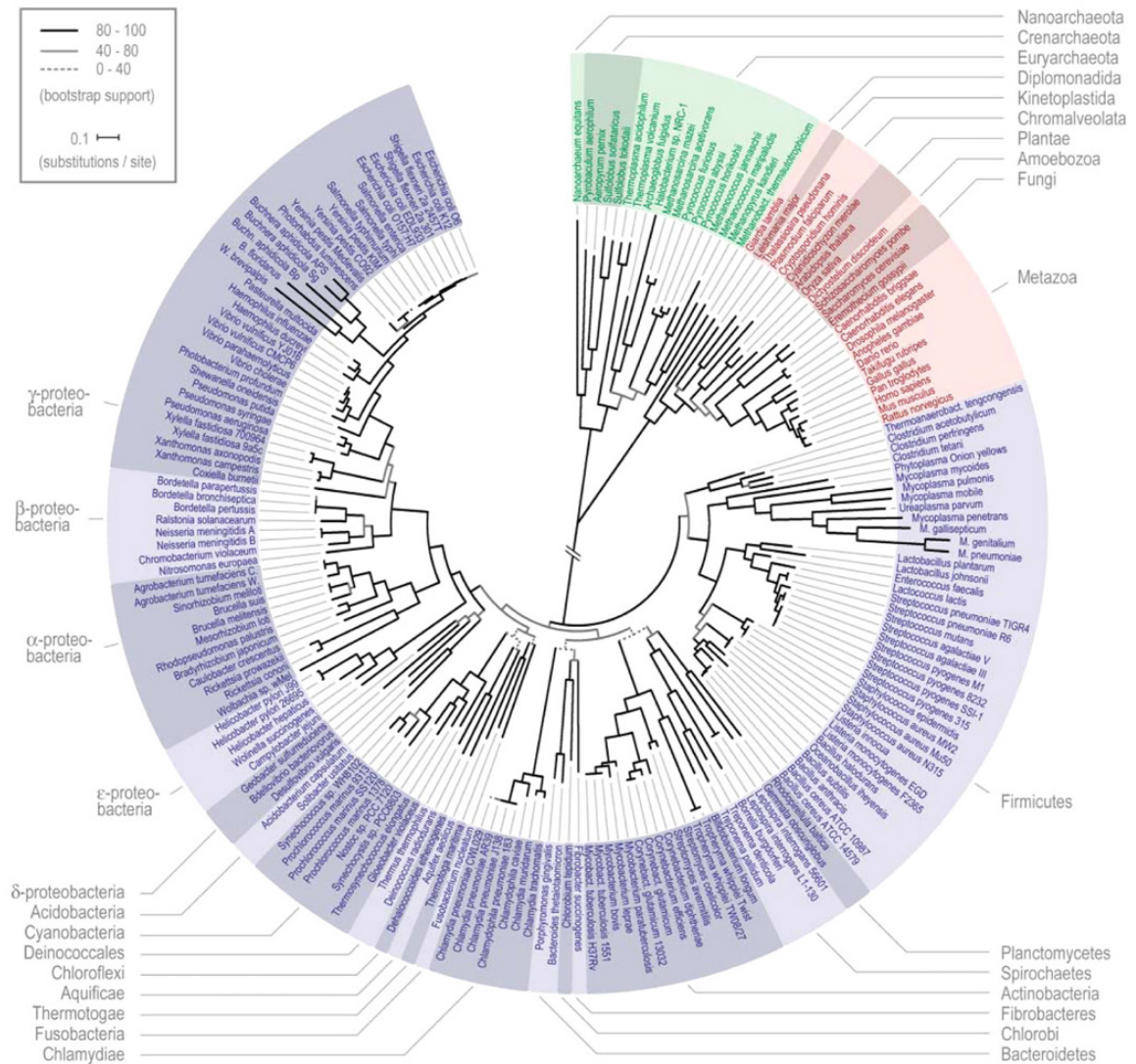


Figure 0.1. Arbre universel du Vivant révélant la diversité des microorganismes. Seuls les plantes, certaines algues et de nombreux métazoaires ne sont pas des microorganismes. Source Interactive Tree Of Life.

Les microorganismes sont composés majoritairement des Bacteria et des Archaea, mais également d'eucaryotes unicellulaires tels que certains champignons (Fungi) et les Protozoaires (Figure 0.1). La diversité microbienne a largement été sous-estimée, seule une infime partie de microorganismes étant cultivée et cultivable (Pace, 1997). La biologie moléculaire a révélé l'immense diversité génétique des microorganismes (Figure 0.1), dans des habitats aussi divers que la peau humaine, les sources

hydrothermales, les déserts polaires en Antarctique, les lacs souterrains, ou encore la troposphère, les pommeaux de douches ou dans les roches (Fierer & Lennon 2011).

Ils sont la première forme de vie sur Terre, à la base de notre héritage biologique et ayant permis l'évolution des eucaryotes (endosymbiose des Protéobactéries formant les mitochondries) et des plantes (endosymbiose des Cyanoactéries formant les chloroplastes).

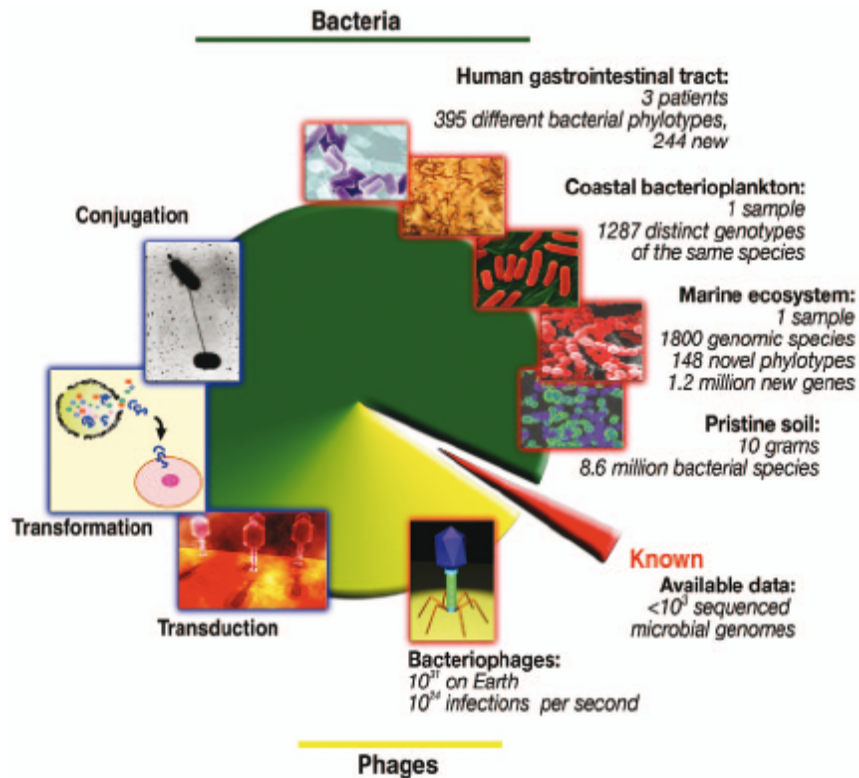


Figure 0.2. Diversité du monde microbien. Des découvertes récentes ont révélé une immense diversité génétique entre et au sein de populations bactériennes. Les bactéries peuvent acquérir des gènes provenant de l'environnement par conjugaison, transformation ou transduction. La *conjugaison* consiste en une transmission de plasmides dits de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et son intégration potentielle dans son génome. La *transformation* consiste en l'acquisition par une bactérie dite compétente d'un fragment d'ADN libre dans le milieu. La *transduction* consiste en un transfert d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse via un vecteur viral (infection par un bactériophage). Des études sur des échantillons environnementaux ont révélé un grand nombre d'espèces et de quantité de matériel génétique, pouvant constituer un réservoir infini de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions. La contribution des transferts horizontaux de gènes est particulièrement importante dans la diversification du monde microbien. Ces transferts peuvent avoir lieu entre organismes parfois distants phylogénétiquement permettant d'acquérir des traits écologiques avantageux pour la colonisation d'une nouvelle niche écologique. De toute cette diversité, en 2005, moins de 1000 génomes microbiens étaient entièrement séquencés, mais ce nombre a largement augmenté aujourd'hui : 3762 pour les Bactéries, 181 pour les Archaea et 183 pour les Eukaryotes, incluant des champignons mycorrhiziens comme *Laccaria bicolor*, ou des saprotrophes comme *Agaricus bisporus* (équipe de Francis Martin). Le sol contient la plus grande diversité en espèces. Source Medini et al. 2005.

Cette importante diversité (surtout prokaryote) est le résultat de plusieurs facteurs (Figure 0.2) : un passé évolutif très ancien, des temps de génération très courts entraînant une action rapide de la sélection naturelle, une multitude de niches écologiques potentielles de par leur petite taille et des transferts de gènes entre organismes même distants phylogénétiquement. Ces caractéristiques leur confèrent des grandes possibilités d'adaptation. Ils sont retrouvés dans tous les endroits du monde, des plus extrêmes aux moins accessibles. Un gramme de sol peut contenir 10 milliards d'individus et des milliers d'espèces (Torsvik & Ovreas 2002). Bien que le nombre d'espèces bactériennes décrites augmente, ~ 7000 en 2008 (Achtman & Wagner 2008), il est faible au regard des millions d'espèces prédites (Gans et al. 2005). Idem pour les champignons pour lesquels 70000 souches ont été décrites mais dont la diversité estimée à 1,5 millions d'espèces (Hawksworth 1991) pourrait atteindre plus de 5,1 millions (Blackwell 2011). Il est souvent conclu que la diversité en microorganismes est supérieure à celle des macroorganismes. Les comparaisons de diversité entre groupes doivent toutefois être faites avec précaution (Box 1). Premièrement, les insectes seraient un groupe beaucoup plus diversifié, avec un grand nombre d'espèce à découvrir (voir Tree Of Life project). Deuxièmement, cette comparaison n'est pertinente que si les différences d'échelles spatio-temporelles et de biologie entre les règnes du vivant sont prises en compte. Elle permet alors d'avoir une vision globale de la biodiversité mais aussi d'adapter les méthodes d'échantillonnage.

Box 1. La diversité microbienne, une question d'échelle

Il est souvent reporté que la diversité microbienne est bien plus grande que la diversité des macroorganismes, mais cette comparaison est influencée par des problèmes d'échelles d'études comme la profondeur phylogénétique, l'échelle temporelle et l'échelle spatiale. La diversité microbienne n'est peut être pas plus importante que la diversité en macroorganismes (Fierer & Lennon 2011). La diversité bactérienne est quantifiée à l'échelle du domaine (Bacteria), alors que la diversité en macroorganismes est mesurée au sein d'une part relativement petite du domaine eucaryote. Prenant en compte toute la diversité eucaryote, les mesures de diversité sont alors comparables, surtout prenant en compte la diversité des champignons et des organismes unicellulaires eucaryotes. De plus, les bactéries se diversifient depuis près de 3,7 milliard d'années. Egalement, les écologues échantillonnent les microorganismes et les macroorganismes avec un effort différent. Par exemple, les arbres sont échantillonnés à l'échelle de l'hectare, ce qui est 50000 fois plus important qu'un arbre (0.2m^2). Pour les microorganismes, un échantillon de 0.5g de sol a un volume qui est 30 millions de fois plus grand qu'une bactérie ($1\mu\text{m}^3$). Ainsi, dans un échantillon de sol moyen, une multitude d'habitats sont regroupés. A l'échelle des hommes, ce serait équivalent à l'hétérogénéité retrouvée dans une localité de $\sim 1000\text{ km}^2$ (Fierer & Lennon 2011).

3. Rôle des microorganismes dans l'environnement

L'importance des microorganismes dans les cycles biogéochimiques est largement reconnue. Les microorganismes interagissent chimiquement avec leur environnement. L'effet le plus notable est probablement la mise en place d'une atmosphère riche en oxygène et d'une couche d'ozone, résultat de la photosynthèse des cyanobactéries. Outre cet effet à grande échelle, les microorganismes affectent les écosystèmes à différentes échelles spatiales et temporelles.

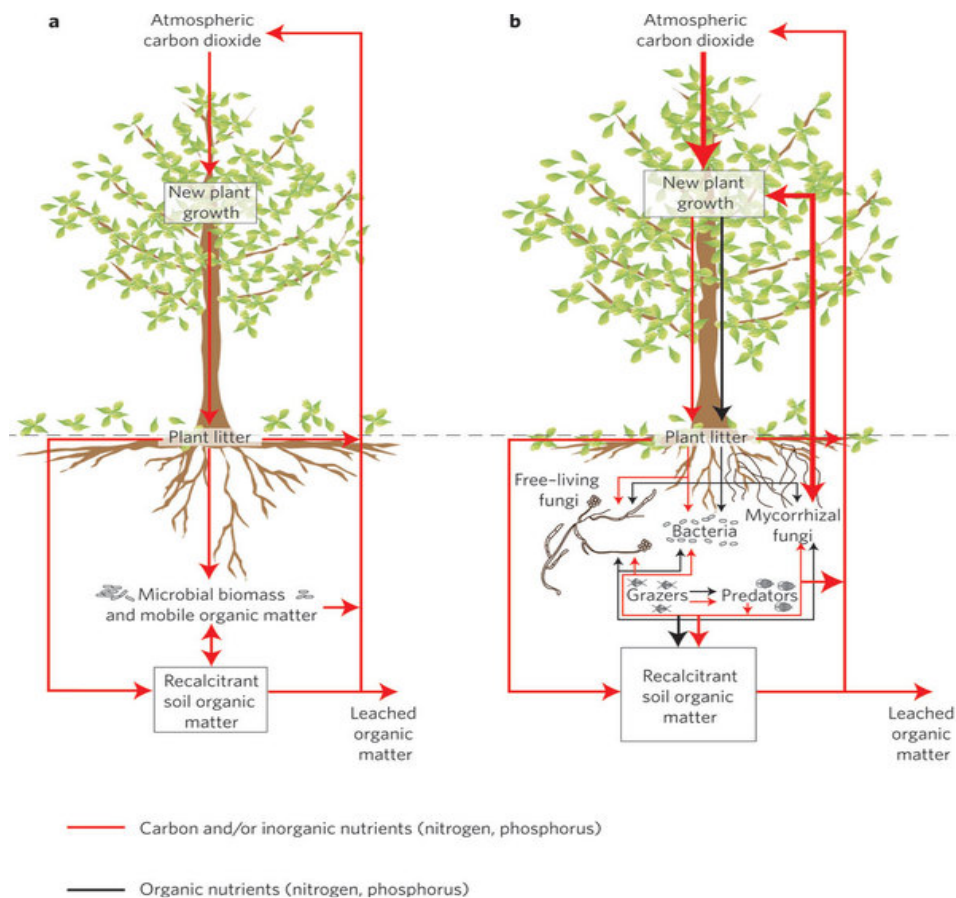


Figure 0.3. Le cycle du carbone dans le sol. Le CO_2 atmosphérique est fixé par les plantes par photosynthèse. La matière organique produite est rendue au sol (litière, exsudat racinaires), dégradée par les microorganismes (respiration), relâchant du CO_2 dans l'atmosphère. La figure représente des modèles schématiques utilisés pour étudier le cycle du carbone dans le sol. (A) Les modèles conventionnels traitent les microorganismes du sol comme une unique boîte noire à travers laquelle les flux de carbone et de nutriments inorganiques provenant de la plante sont partagés entre une matière organique lente à dégrader (récalcitrante) qui reste au sol et une partie respirée transférée dans l'atmosphère sous forme de CO_2 . (B) Aujourd'hui, certains modèles (Orwin *et al.* 2011) simulent l'activité de groupes individuels de microbes, incluant le prélèvement de nutriments inorganiques par les champignons mycorrhiziens et un transfert direct de carbone des plantes aux champignons. Les résultats montrent que le prélèvement de nutriments organiques par les champignons mycorrhiziens augmente la quantité de carbone séquestré dans les sols à l'échelle du paysage en augmentant le transfert de nutriments aux plantes, ce qui en retour augmente le taux de croissance des plantes et ainsi l'apport de litière et d'exsudats racinaires au sol et le flux de carbone aux champignons. *Source Talbot & Treseder 2011.*

Le phytoplancton est le producteur primaire à la base des chaînes trophiques aquatiques. Dans les environnements terrestres, les microorganismes sont principalement impliqués dans la dégradation de la matière organique et de manière générale dans le cycle du carbone (Figure 0.3) et de l'azote (Figure 0.4). Les champignons sont une composante majeure de la séquestration du carbone dans les sols (50 à 70% du carbone stocké dans les sols de forêts boréales dérive des racines et des champignons associés, Clemmensen *et al.* 2013). Certaines bactéries (*Rhizobium*, *Frankia*) sont les seules à fixer l'azote atmosphérique sous forme assimilable par les plantes. Les microorganismes, notamment les champignons, sont capables de dégrader les roches pour en tirer des nutriments par la production de composés secondaires tels que les acides organiques (acide oxalique, acide citrique) menant à la première création d'un sol organique (Gadd 2007; Gadd & Raven 2010; Scheerer *et al.* 2009), amorçant ainsi les successions primaires.

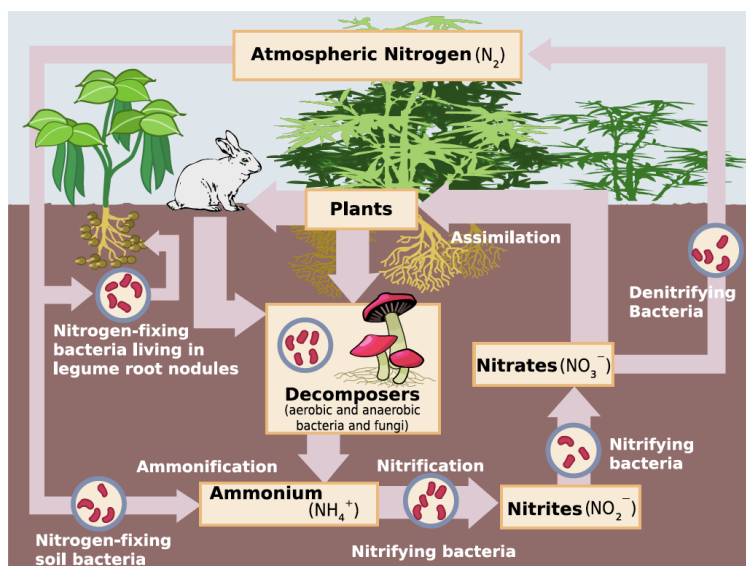


Figure 0.4. Rôle des microorganismes dans le cycle de l'azote dans le sol. Seules quelques bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique, relâché au sol ou transféré directement aux plantes sous forme d'ammonium. Ce sont les *Rhizobium* (Alpha-protéobactéries) et les *Frankia* (Actinomycètes). La matière organique provenant des plantes est dégradée par les bactéries et les champignons en ammonium, transformé en nitrates en deux étapes par les bactéries nitrifiantes : la nitritation assurée par les *Nitrosomonas* (Beta-protéobactéries) et la nitratation assurée par les *Nitrobacter* (Alpha-protéobactéries).

Ce processus peut aussi être assuré par des champignons (nitrification hétérotrophe, et non plus autotrophe). Les nitrates peuvent être acquis par la plante. À l'étage alpin, les plantes peuvent assimiler directement l'ammonium, voire des acides aminés. Enfin, la dénitrification, autotrophe ou hétérotrophe, assurée par un large panel de Protéobactéries. *Source image wikipedia.*

Enfin, les microorganismes sont en interactions avec les plantes. Les premières associations entre les champignons et les plantes auraient favorisé l'émergence des plantes hors de l'eau, il y a environ 450 millions d'années (Simon *et al.* 1993). La performance des plantes et la productivité du système sont affectées par des effets directs mutualistes (mycorhizes), délétères (parasites) ou indirects, via les cycles des nutriments (rétention/relargage de nutriments, saprotrophes) (Figure 0.5) (Janos *et al.*

2013; van der Heijden *et al.* 2008). Ce sont des acteurs contribuant aux interactions négatives (compétition) entre plantes ou positives (facilitation) (Casanova-Katny *et al.* 2011; Rodriguez-Echeverria *et al.* 2013); ainsi, ils agissent sur la distribution des espèces et structurent les communautés végétales. Par exemple, *Prunus serotina*, un arbre nord-américain, est en faible abondance dans son aire de distribution native alors qu'il est invasif en Europe, où un pathogène oomycète est absent (Reinhart *et al.* 2005). Les microorganismes sont aussi en compétition avec les plantes pour les nutriments, notamment l'azote. Cette compétition pourrait expliquer la limite altitudinale haute de la forêt dans l'hémisphère sud (Annexe 1). Ces interactions ont donc un impact sur le fonctionnement des écosystèmes. De plus, en affectant la performance des plantes dans l'environnement, ils sont des acteurs clef de l'évolution des plantes.

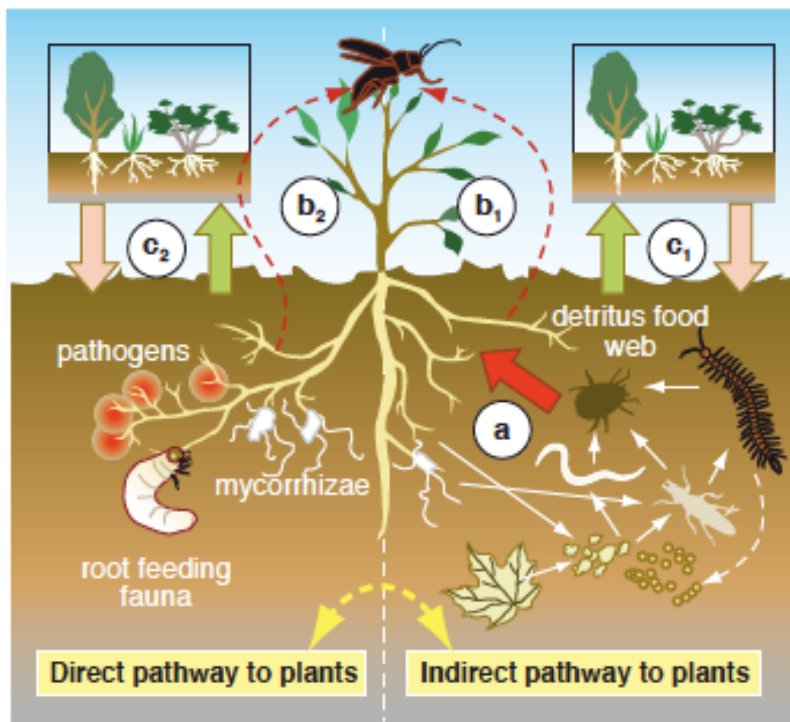


Figure 0.5. Les communautés au dessus du sol sont affectées à la fois par des conséquences directes et indirectes de la chaîne trophique du sol. A droite, Les activités des organismes décomposeurs détritiques (fines flèches blanches) stimulent le renouvellement des nutriments (grosse flèche rouge), l'acquisition des nutriments par la plante (a), et sa performance. Cela influence indirectement les herbivores au dessus du sol (flèche rouge en tirets) (b1). A gauche, les communautés du sol exercent un effet direct sur les plantes en se nourrissant des racines et par la mise en place de relations antagonistes ou mutualistes avec leur plante hôte. Ces interactions directes avec les plantes influencent la performance des plantes hôtes

mais également celle des herbivores et leurs prédateurs. Enfin, la chaîne trophique du sol peut contrôler les successions des communautés de plantes, directement (c2) et indirectement (c1). En retour, ces changements de communautés affecteront les communautés du sol. *Source Wardle et al. 2004.*

4. Importance socio-économique des microorganismes

Etant donné leur rôle dans les cycles de la matière et leurs interactions avec de nombreux niveaux trophiques, les microorganismes sont d'une grande importance pour la société et l'économie. Ils sont connus pour leur rôle négatif du fait des maladies

affectant aussi bien les hommes que les autres animaux et les plantes, menant à de grandes épidémies (la peste noire, causée par la bactérie *Yersinia pestis*, menant à la mort de la moitié de la population européenne au XIVe siècle), ou de grandes grandes famines (chute de la production de pommes de terre suite à l'infection par le champignon *Phytophthora infestans* en Irlande au XIXe siècle). Aujourd'hui la maladie « eyespot » du blé par le champignon *Oculimacula yallundae* coûte des millions de dollars réduisant les rendements de 40% et entraînant une production de fongicides, dont la gestion est compliquée par l'apparition de résistances. Les microorganismes constituent de fait un problème sanitaire et économique,

Cependant, les microorganismes sont également commensaux, voire mutualistes, à commencer par les bactéries du corps humain et des animaux en général, ainsi que des plantes. Ces connaissances offrent des perspectives pour la santé humaine mais aussi pour la gestion des terres agricoles, en limitant la quantité d'intrants chimiques pour la fertilisation (apport de nutriments par les mycorhizes) ou le traitement des maladies (production de composés anti-microbien par les endophytes). Ils ont une importance dans le comportement source ou puits des sols vis à vis du carbone (Zinger 2009) par la séquestration ou le relargage de carbone. Ils sont utilisés dans l'agro-alimentaire pour la fermentation et l'affinage des fromages et dans l'industrie pharmaceutique pour leur production d'antibiotiques (e.g. la pénicilline). En biologie moléculaire, l'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) est un procédé facilité par l'utilisation d'une ADN polymérase provenant de *Thermus aquaticus*, une bactérie thermorésistante (la Taq polymérase). Les interactions plante-sol sont une perspective pour la restauration de milieux perturbés (Bashan et al. 2012; Eviner & Hawkes 2008; Kennedy et al. 2012) ou la dépollution de l'eau (Annexe 4) et des sols (Mouhamadou et al. 2013a), notamment par les champignons qui possèdent un large panel d'enzymes (Gadd 2007). 20000 espèces végétales seraient complètement dépendantes de symbiotes microbiens (van der Heijden *et al.* 2008). La migration de ces plantes en réponse au changement climatique peut être contraindre par la distribution ou la co-migration de symbiotes microbiens. Etant donné que beaucoup de microbes, aussi bien que les plantes, diffèrent dans leur capacité de dispersion, il est probable que ces différences dans le taux de migration mènent inévitablement à la création de nouveaux assemblages et de nouvelles interactions (revu dans Peay *et al.* 2010). En dépit des évidences que les communautés microbiennes changent à tout moment, et que ces changements se traduisent aux

niveaux de propriétés clef des écosystèmes (séquestration du carbone, production primaire), la capacité de prédire et généraliser la distribution des microbes, et les échelles spatiales et temporelles pertinentes auxquelles ces changements ont une importance écologique, reste limitée.

Les microorganismes occupent une place centrale dans la diversité du vivant et le fonctionnement des écosystèmes. Les enjeux en microbiologie environnementale se résument à trois questions : qui est où, pourquoi tel microorganisme est-il là et qu'est ce qu'il fait ? Malgré un nombre grandissant d'études de microbiologie environnementale, la plupart des communautés microbiennes n'ont pas été étudiées, alors qu'il est probable qu'un grand nombre d'espèces inconnues et donc de fonctions uniques soient amenées à disparaître dans le contexte actuel de changement global.

II. Approches conceptuelles en microbiologie environnementale

Afin de répondre aux questions de savoir « qui est où ? », « pourquoi cet organisme est là ? » et « qu'est-ce qu'il fait ? », il convient de définir ce « qui ».

1. Une unité d'évolution et de diversité : le concept d'espèce et son applicabilité aux microorganismes

« ... I was much struck how entirely vague and arbitrary is the distinction between species and varieties. »

Charles Darwin, *On the origin of species*, 1859

Comprendre la diversité, l'assemblage des communautés et le rôle des organismes dans l'environnement nécessite de caractériser puis de regrouper les organismes composant les communautés, c'est à dire d'obtenir des données de distribution pour des unités discrètes. L'unité fondamentale en écologie et en évolution est l'espèce. Cependant, selon la question, l'unité considérée peut correspondre à différentes résolutions.

1.1. Les différents concepts pour définir et caractériser une espèce

Pour les macroorganismes sexués, une espèce est définie comme un groupe d'êtres vivants, génétiquement cohérent du fait des flux de gènes entre individus (force de cohésion), tous interféconds dont la descendance est fertile, et aux caractéristiques écologiques similaires (Mayr 1944, 1963). Cette définition conceptuelle n'est évidemment pas applicable sur le terrain pour l'étude de la biodiversité et la distribution spatiale des organismes. Que ce soit avant ou après cette définition, il a fallu et il faut des critères pour classer les organismes. Cette classification peut se faire sur une base phénotypique, fonctionnelle, phylogénétique.

Conceptuellement, la définition d'une espèce est difficilement applicable en microbiologie. Les microorganismes sont majoritairement asexués, la notion d'interfertilité est donc caduque pour ces organismes. Cette notion de reproduction (sexuelle) est de plus complexifiée par les Transferts de Gènes Horizontaux (HGT). Ces transferts peuvent avoir lieu entre organismes très distants phylogénétiquement. Les

microbes montrent une forte plasticité phénotypique « intra-spécifique » (Figure 0.6A), une adaptation rapide à des environnements changeants (Figure 0.6B) et un continuum génétique entre individus/groupes morphologiques proches (Figure 0.6C). De nombreuses espèces cryptiques au sein d'espèces prédéfinies sont découvertes. La notion d'inter-fécondité n'a pas de sens, et l'utilisation des critères de regroupement sur des bases phénotypiques et génétiques difficile.

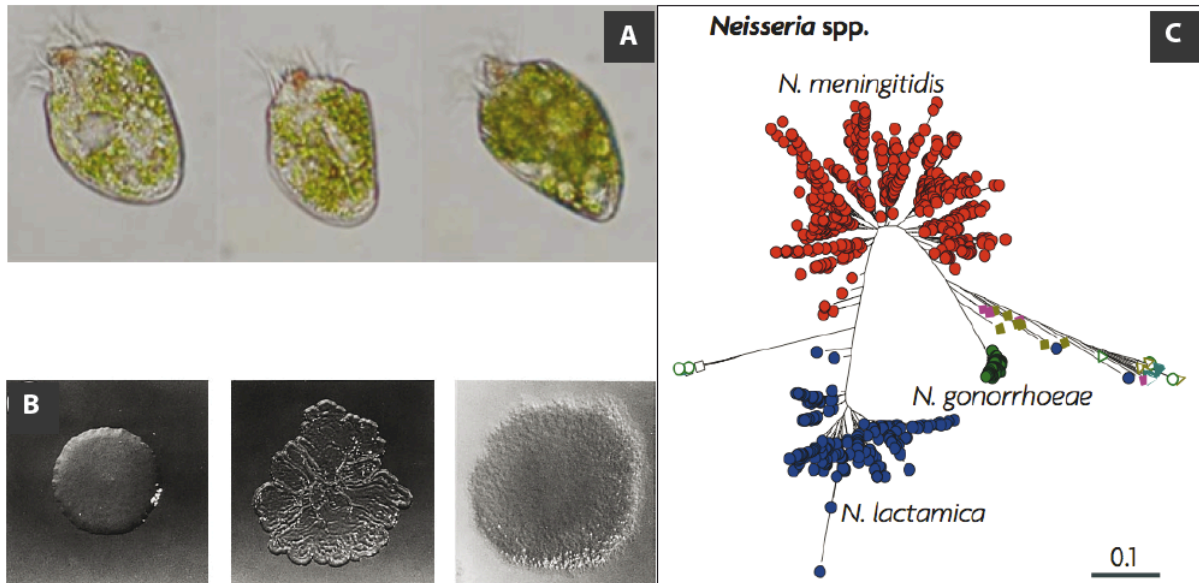


Figure 0.6. Des espèces microbiennes floues. (A) Variation morphotypique au sein d'une population de ciliées du genre *Strombidium* provenant d'une même localité. Source Katz et al. 2005. (B) Variation morphotypique de colonies de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (au milieu et à droite) à partir d'un ancêtre commun (à gauche) en fonction de l'habitat. Source Rainey & Travisano 1998. (C) Arbre bayésien d'espèces bactériennes (une couleur par espèce) du genre *Neisseria*. Seules les espèces rouges, bleus et vertes sont génétiquement résolues alors que les autres mènent à un continuum génétique entre toutes les espèces. Cette mauvaise résolution reflète des problèmes avec les assignations taxonomiques et/ou l'incapacité de séparer des espèces distinctes seulement par des groupes génotypiques. Source Hanage et al. 2005, et Achtman & Wagner 2008. D'après Zinger (2009).

Ces difficultés tiennent pour les procaryotes comme les microeucaryotes. Suite à ces découvertes et difficultés, plusieurs concepts ont été développés et des critères proposés pour définir une espèce sans qu'aucun consensus n'ait pu être établi. La notion d'écotype, une population d'organismes écologiquement similaires dont les variants sont régulièrement contre-sélectionnés, semble avoir les caractéristiques de ce qu'on entend par espèce (Box 2).

Une variété de définitions est utilisée pour les microorganismes. La définition « phylophénétique » limite une espèce à un « groupe d'individus monophylétique et génomiquement cohérent avec un haut niveau de similarité globale pour de nombreux

caractères indépendants et qu'il est possible de diagnostiquer par des propriétés phénotypiques discriminantes (Rosello-Mora *et al.* 2001). D'un point de vue pratique, historiquement en microbiologie, les souches bactériennes étaient regroupées selon des critères morphologiques. Les approches génomiques ont déterminé que les souches appartenant à une même espèce (sur la base des critères morphologiques), partageaient 70% ou plus de leur génome et que les souches appartenant à des espèces différentes partageaient moins de 70% de leur génome (Johnson *et al.* 1986). Ce degré de réassociation ADN-ADN a donc été choisi pour définir des espèces (Colwell *et al.* 1995). Cela correspond à une divergence de l'ARNr 16S supérieure à 3%, seuil de 3% de divergence recommandé comme critère conservatif pour distinguer des espèces bactériennes (Stackebrandt & Goebel 1994). Une phylogénie (basée sur plusieurs gènes) peut permettre de regrouper des organismes proches évolutivement, s'ils forment un groupe monophylétique mais ces méthodes sont complexifiées par la structure en mosaïques des génomes du fait des transferts des gènes horizontaux. Sans recourir à la phylogénie, l'idée est alors de regrouper les organismes selon les gènes partagés. Cette approche repose sur le concept de pan-génome, inclus dans celui d'écotype (Box 2).

Le pan-génome comprend l'ensemble des gènes de tous les individus d'une espèce/d'un taxon. Il est composé du core-génome qui comprend l'ensemble des gènes partagés par tous les individus du taxon/espèce et le variable-génome qui comprend l'ensemble des gènes propres à chaque ou partie des individus du taxon/espèce. Le variable-génome est à l'origine de la plasticité éco-physiologique du groupe et permet l'adaptation.

Chez les micro-eucaryotes les problèmes sont similaires. Toutefois, les problèmes dans la définition des espèces portent davantage sur les critères de regroupement que sur le concept en soi (Giraud *et al.* 2008).

Ainsi, il n'y a pas de consensus entre les différentes approches (Achtman & Wagner 2008). La spéciation est un processus continu dans le temps et il y a en réalité un continuum entre tous les individus, intra et inter espèces, certains organismes formant ou non des groupes écologiques et génétiques distincts. La mise en place des approches phylogénétique et de partage de gènes nécessite l'obtention et la comparaison de plusieurs parties, voire l'intégralité des génomes pour les individus de la communauté. Ces approches sont difficiles à mettre en œuvre pour l'étude de la structure des communautés car l'écologie des communautés repose sur la comparaison

d'une multitude de communautés qui se révèlent être très complexes (Torsvik & Ovreas 2002), complexité qui ne fait que d'augmenter avec les nouvelles méthodes de caractérisation de la diversité (voir « Richesse microbienne et ambiguïté des espèces rares »). De plus ces approches ne permettent pas toujours (et toujours pas) de différencier des espèces (Stewart *et al.* 2014) bien qu'elles aient par exemple permis de différencier des écotypes qui se sont spéciés par spécialisation dans l'utilisation de différentes intensités lumineuses le long d'une colonne d'eau (Rocap *et al.* 2003).

Box 2. Le concept d'écotype

Dans le cas des bactéries, les propriétés universelles de l'espèce chez les macroorganismes sont retrouvées chez les écotypes (Figure B2; (Cohan 2002b). C'est un ensemble (une population) de souches utilisant la même ressource, tel qu'un mutant adaptatif provenant de l'écotype exclut par compétition toutes les autres souches du même écotype (scénario 1) ou diverge indépendamment échappant aux pressions de sélection de l'écotype ancestrale (scénario 2). Les variants non adaptatifs d'un écotype subissent la purge de la sélection naturelle (scénario 3). Un mutant adaptatif ne conduit pas à l'extinction des souches des autres écotypes car écologiquement distincts et sont libres de diverger librement. Ces écotypes sont donc des lignées évolutives qui sont séparées de manière irréversible. S'ils sont entièrement asexués, les écotypes (bactériens) ont les propriétés universelles d'une espèce. A la manière des échanges de gènes entre organismes sexués, la sélection naturelle purge périodiquement la diversité au sein de l'écotype et agit comme une force de cohésion. Ces écotypes peuvent être découverts par des approches basées sur la divergence des séquences ADN. Les approches moléculaires ont montré qu'une espèce bactérienne comme définie aujourd'hui contient une multitude d'écotypes (Cohan 2002a).

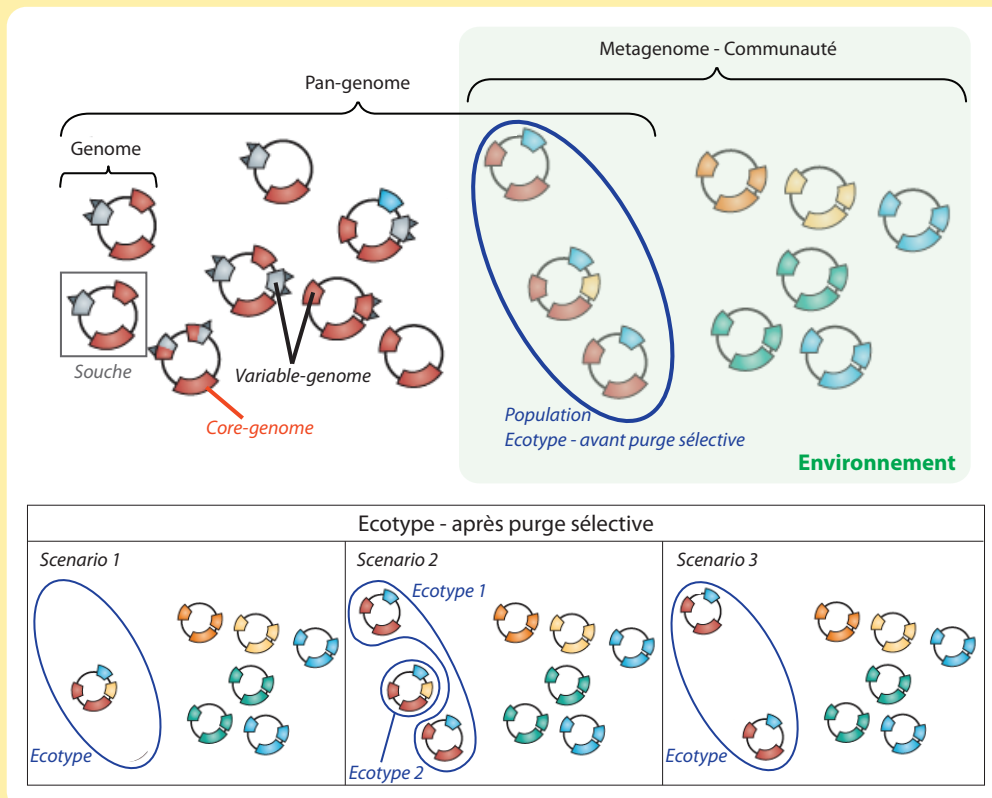


Figure B2. Représentation schématique des concepts de pan-genome et d'écotype.

Ces problèmes à la fois théoriques et opérationnels sont surpassés par les approches plus pragmatiques basées sur le séquençage non dirigé de l'ADN métagénomique ou par le suivi des gènes ribosomiaux. Ces études reposent sur le concept d'OTU (Operational Taxonomic Unit). Cette approche ne présente pas les caractéristiques des différents concepts d'espèces et est limitée par une multitude de biais techniques, mais elle s'affranchit i) du manque de consensus pour définir une espèce, ii) des techniques classiques de culture et iii) est facile à mettre en œuvre à l'échelle des communautés pour l'étude de la diversité microbienne et sa distribution spatiale.

1.2. Cadre méthodologique : les OTUs (Operational Taxonomic Units)

Les OTUs sont un outil de travail, au même titre que l'espèce. Un OTU correspond à un regroupement d'entités similaires. Un OTU peut donc tout autant correspondre à un individu, une espèce ou encore un phylum. Lorsque la diversité est appréhendée par les méthodes moléculaires, un MOTU (Molecular OTU) est généralement composé de rybotypes (séquences ribosomiales) similaires. L'approche MOTU est une approche pragmatique mais il est admis qu'un MOTU ne correspond ni à une espèce phénotypique, biologique ou phylogénétique. Dans les parties suivantes, « espèce » réfère au critère actuel de la définition d'espèce microbienne basé sur la similarité de l'ARNr16S (ou d'une région) et taxon définit un groupe taxonomique quelle que soit la résolution taxonomique.

2. Biogéographie microbienne : beta diversité et écologie des communautés

2.1. Biogéographie, généralités

La biogéographie peut être définie comme la science qui documente la distribution spatiale (et temporelle) des taxons à échelle locale, régionale ou continentale. C'est une pierre angulaire dans la compréhension de la diversité, l'écologie et de l'évolution des organismes (Ramette & Tiedje 2007). Cela comprend la compréhension des processus générant et maintenant ces patrons de distribution. Le but est de proposer et évaluer des théories concernant la création et le maintien des patrons de diversité.

Les échelles spatiales et temporelles sont souvent très grandes en biogéographie, trop grandes pour mettre en œuvre des expériences. Les théories sont généralement développées et testées à partir des patrons de diversité. Les hypothèses et prédictions

de ces théories peuvent inclure la présence/absence ou l'abondance de taxons dans l'espace et dans le temps ainsi que leur interactions. La mise en évidence de règles d'assemblage pour les microorganismes comme il est le cas pour les macroorganismes permettrait à termes de comprendre et prédire la dynamique des patrons de diversité dans l'environnement. Les patrons de biogéographie microbienne et la formulation de ces règles sont encore dans leur enfance.

Ce travail de thèse aborde la biogéographie microbienne par l'angle de l'écologie des communautés dont le but est de comprendre l'assemblage des espèces, à différentes échelles spatiales, temporelles et phylogénétiques.

2.2. La beta diversité et l'assemblage des communautés

En écologie des communautés, la diversité se décompose en trois composantes: la **diversité alpha**, qui décrit la composition en espèces en un endroit, la **diversité beta** qui décrit le changement dans la composition dans l'espace, et enfin la **diversité gamma** qui décrit la composition en espèces dans l'aire d'étude globale. La comparaison des composantes de la diversité permet de déduire, à partir des patrons, des règles d'assemblage des communautés et caractériser les facteurs influençant la distribution des espèces. Le concept de beta diversité a été premièrement introduit par Whitaker en 1964. L'assemblage des communautés est le résultat d'une succession hiérarchique de filtres limitant la présence (et/ou l'abondance) d'une espèce à un endroit donné (Figure 0.7). Des effets viennent s'ajouter comme la règle de priorité ; un organisme arrivé en premier à plus de chances de s'établir. Dans certaines régions, l'immense diversité des communautés et sa structure spatiale sont difficiles à expliquer avec ces règles amenant à la théorie neutre de la diversité (Hubbell 2001). Elle pose que les communautés sont le résultat d'une dispersion aléatoire et limitée et des dynamiques démographiques stochastiques (mort/naissance) des populations. Toutes les espèces sont équivalentes dans leur réponse aux conditions environnementales. Ce processus peut être vu comme l'hypothèse nulle. Une synthèse récente propose que les différents mécanismes d'assemblage des communautés se résument à quatre processus (Box 3).

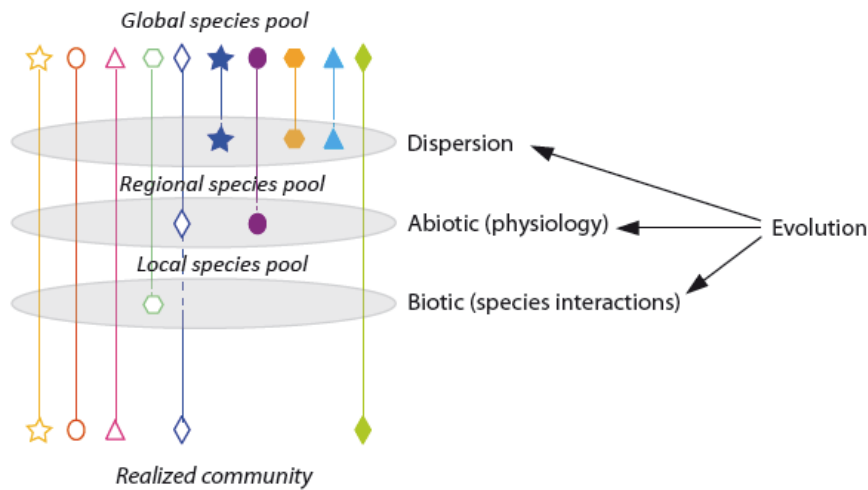


Figure 0.7. Hiérarchie des filtres à l'origine de l'assemblage d'espèces. Pour les macroorganismes, les filtres sont bien définis, notamment les échelles spatiales à laquelle ils s'exercent. A large échelle spatiale, l'assemblage est déterminé par les facteurs géographiques et historiques séparant des populations ancestrales. L'absence de flux de gènes entre ces populations à entrainer l'apparition de

nouvelles espèces, le pool régional. Des facteurs environnementaux exercent ensuite un filtre des espèces ayant les aptitudes physiologiques à survivre dans la région, ou l'habitat, le pool local (e.g. la quantité de lumière pour un autotrophe). Enfin, le filtre biotique, qui mène à la communauté réalisée. Il correspond aux interactions entre espèces. Deux espèces en compétition pour une même ressource mène à la disparition de la moins performante (principe d'exclusion compétitive). Inversement, la présence d'un organisme moins adapté peut être facilitée par une espèce protectrice (facilitation). Enfin, la dynamique évolutive des organismes va changer l'importance de certains filtres.

Box 3. Ecologie des communautés

Vellend (Vellend 2010) définit quatre forces influençant l'assemblage des communautés. Elles sont un parallèle directe aux quatre forces régissant la génétique des populations. Dans ce parallèle, il y a un changement d'échelle dans lequel les individus (ou les génotypes) en génétique des populations sont remplacés par les espèces. La **sélection**. C'est le parallèle à la sélection naturelle. Elle réfère au filtre exercé par l'environnement sur les espèces suivant leurs caractéristiques et besoins physiologiques et écologiques. Elle prend aussi en compte les interactions entre espèces, notamment celles de nature antagoniste comme la compétition pour une ressource, ou les relations proie-prédateur ou hôte-parasite. La **dispersion**, parallèle de la migration. C'est le mouvement d'individus d'un endroit à un autre. Des organismes aptes à vivre dans le milieu peuvent ne pas être retrouvés du fait des limitations de la dispersion. Inversement, la dispersion de masse fait que certains individus sont présents dans un milieu où les conditions de la sélection ne permettent pas leur survie. La **dérive écologique** se réfère à la dérive génétique. C'est un processus aléatoire/neutre démographique, comme les naissances et les morts, qui peut mener à la dominance d'une espèce par rapport à une autre. La **spéciation**. C'est le parallèle à la mutation. De nouvelles espèces sont retrouvées dans la communauté.

Ces forces agissent à toutes les échelles de temps et d'espace, et interagissent.

2.3. Biogéographie et assemblage des communautés microbiennes

Les microorganismes sont ubiquistes sur Terre. Cependant, les microorganismes suivent-ils des patrons de distributions similaires à ceux des macroorganismes ? Le débat en biogéographie microbienne porte sur l'existence ou non de barrières géographiques impactant l'assemblage des communautés et l'évolution des espèces ou si cet assemblage et la distribution des espèces ne reflètent que les conditions environnementales du moment.

Du point de vue de la structure des communautés, les communautés microbiennes semblent structurées de la même façon que les communautés de macroorganismes. Elles sont composées de quelques espèces très dominantes accompagnées d'espèces subordonnées, moins abondantes, mais aussi d'espèces de « transition » insubordonnées aux espèces dominantes, avec une diversité d'espèces rares, mais néanmoins nettement supérieures aux macroorganismes (visualisée à travers les courbes rangs-abondance), la « biosphère rare » (Sogin *et al.* 2006).

Du point de vue de la distribution des espèces, plusieurs patrons permettent de mettre en évidence une structure biogéographique et d'analyser différentes facettes de la beta diversité. Le premier exemple est l'augmentation du nombre d'espèces en fonction de l'aire échantillonnée, la relation aire-espèces. Le second exemple est une différence de composition en espèces des communautés qui augmente avec la distance géographique les séparant (distance-decay relationship). Ces deux relations maintes fois rapportées pour les macroorganismes sont rapportées également pour les microorganismes eucaryotes et prokaryotes (Figure 0.8) (Fulthorpe *et al.* 2008; Green & Bohannan 2006; Green *et al.* 2004; Zinger *et al.* 2014), montrant que « tout n'est pas partout », mais semblent être plus faibles.

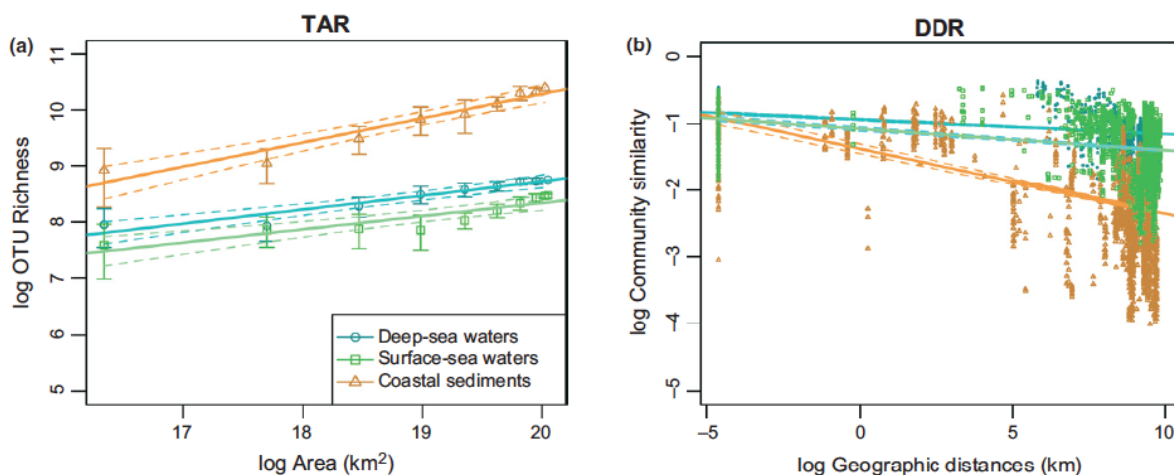


Figure 0.8. Relation (A) aire-espèce et (B) distance-decay pour des communautés bactériennes dans les eaux de mer de surfaces, de profondeur et des sédiments côtiers. Ces résultats sont obtenus à partir de données de séquençage haut débit de la région hypervariable V6 de l'ARNr 16S avec des MOTUS définis à 97% de similarité. *Source Zinger et al. 2014.*

Ces patrons peuvent cependant résulter de différences majeures dans les processus à l'origine de la distribution des macro- et microorganismes. Certaines caractéristiques influençant la distribution spatiale des organismes diffèrent

fondamentalement entre les macro- et microorganismes. Premièrement, les microorganismes sont supposés avoir un taux de dispersion très élevé de par leur petite taille ou celles des spores. Deuxièmement, les microorganismes ont un taux de spéciation très élevé résultant i) d'une sélection de l'environnement rapide en raison d'un temps de génération court, et ii) d'échanges horizontaux de gènes. Enfin, beaucoup d'espèces microbiennes peuvent survivre sur de longues périodes à un état dormant. Des bactéries viables ont été retrouvées d'un sol de permafrost âgé de 500 000 ans (Johnson *et al.* 2007). Bien qu'il y ait des coûts associés à la dormance, c'est une stratégie d'histoire de vie répandue taxonomiquement et dans une variété d'habitats (Lennon & Jones 2011). Ces caractéristiques couplées aux effectifs très grands de populations font que les microorganismes ont un faible taux d'extinction, d'autant que la capacité à sporuler leur permet de résister aux stress environnementaux (Ramette & Tiedje 2007).

L'ensemble de ces caractéristiques propres aux microorganismes a mené à l'idée d'une distribution cosmopolite des espèces. En parallèle, l'observation que toutes les bactéries n'ont pas la même capacité à se développer selon le substrat a mené à la proposition que « tout est partout mais l'environnement sélectionne » (Beijrenick 1913 ; Baas-Becking 1934). Cette hypothèse reflète l'idée d'une distribution cosmopolite des microorganismes et d'une forte sélection de l'environnement sur la présence de l'organisme à un endroit donné, ce qui résulte en une diversité locale très importante mais faible à échelle régionale, effectivement observée (Green *et al.* 2004).

La sélection. L'hypothèse de Baas-Becking est confortée par de nombreuses études qui indiquent que les communautés microbiennes sont structurées par l'environnement actuel quelque soit l'échelle spatiale et la connectivité entre habitats (Van der Gucht *et al.* 2007, revu dans Hanson *et al.* 2012). Elles soutiennent que les populations microbiennes sont panmictiques et que tous les organismes sont cosmopolites (Fenchel 2003; Finlay 2002; Finlay *et al.* 2006).

La dispersion. La distribution des espèces et/ou l'assemblage des communautés peut aussi dépendre de facteurs historiques et géographiques. C'est le cas de la succession écologique et/ou des conditions environnementales passées qui contribuent à l'état actuel du milieu (Bardgett *et al.* 2005; Martiny *et al.* 2006), et de la distance géographique séparant deux milieux (Martiny *et al.* 2006). Certaines études supportent l'existence de barrières géographiques et une contingence historique dans l'assemblage des communautés et l'évolution des espèces microbiennes. Certains rapportent de

l'endémisme chez les bactéries du genre *Pseudomonas* dans des sols distants géographiquement (Cho & Tiedje 2000). De la même manière, la composition génomique de cyanobactéries *Synechococcus* ou d'archaebactéries du genre *Sulfolobus* retrouvées dans les sources chaudes était corrélée à l'isolement géographique et non à la chimie actuelle du milieu (Bahl *et al.* 2011; Papke *et al.* 2003; Whitaker *et al.* 2003). La présence supposée infinie pour les microorganismes n'est donc pas seulement limitée par des facteurs environnementaux mais aussi géographiques. Récemment, il a été montré que l'ancêtre commun de populations de cyanobactéries du genre *Chroococcidiopsis* distribué dans l'ensemble des déserts chauds et froids autour du monde date d'avant la formation des continents actuels et que les variants phylogénétiques ne reflètent pas les conditions actuelles du milieu (Bahl *et al.* 2011).

L'isolement géographique entraîne donc une spéciation qui influence la composition des communautés microbiennes (revu dans Martiny *et al.* 2006), similairement aux facteurs régissant la distribution des macroorganismes. Ainsi, des facteurs climatiques/abiotiques mais aussi historiques affectent la distribution des microorganismes. Il existe différents moyens de distinguer l'effet de l'environnement actuel de l'effet d'une contingence historique (Figure 0.9; Figure 0.10).

La spéciation. La spéciation écologique sympatrique est mise en évidence chez les bactéries *Bacillus simplex* entre des populations en face sud ou nord d'un canyon en Israël (Sikorski & Nevo 2005) ou encore chez les cyanobactéries marines *Prochlorococcus* qui se spécient le long d'un gradient d'intensité de lumière dans la mer des Sargasses (Rocap *et al.* 2003). Etant donné la grande capacité d'adaptation et de spéciation des microorganismes, cette force pourrait être majeure dans l'assemblage des communautés microbiennes.

La dérive. La dérive est difficile à quantifier *in natura* et peu de réponses sont apportées quant à son influence dans l'assemblage des communautés (Hanson *et al.* 2012). Certaines études concluent que l'assemblage des champignons associés aux racines d'arbres serait stochastique (Queloz *et al.* 2011).

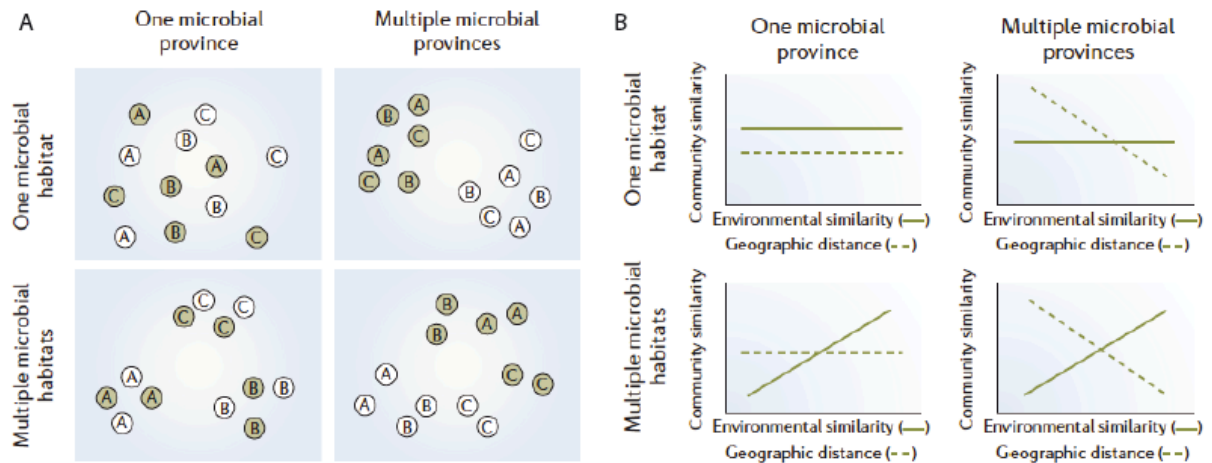


Figure 0.9. Manière d’appréhender les effets de l’environnement et de l’histoire sur la biogéographie microbienne. La figure présente les patrons prédits des effets de l’environnement et de la géographie sur l’assemblage des communautés microbiennes pour un environnement (A) discontinu et (B) continu. Quatre hypothèses alternatives sur l’effet de l’environnement et de la géographie sur l’assemblage des communautés sont présentées. Un habitat définit les caractéristiques environnementales actuelles du milieu (e.g. le couvert végétal). L’hypothèse d’un habitat sous tend que tous les organismes sont équivalents au regard des conditions environnementales. Une province correspond à une aire géographique dans laquelle la dispersion est illimitée et au passé évolutif et historique homogène. Plusieurs provinces indiquent une dispersion limitée entre régions géographiques (e.g. un continent). Une province peut contenir différents habitats. (A) La figure montre comment varie la similarité des communautés suivant les scénarii de dispersion limitée ou non et de l’existence de plusieurs habitats pour un environnement discontinu (habitat A, B et C). Plus les communautés sont similaires en composition plus elles sont proches sur l’ordination. (B) La figure montre comment varie la similarité des communautés suivant les scénarii de dispersion limitée ou non et de l’existence de plusieurs habitats pour un environnement continu. Une corrélation entre la similarité des communautés et la similarité environnementale ou la distance géographique indique une biogéographie (tout n’est pas partout). (A) et (B) constitue deux manières d’étudier la beta diversité (Anderson 2011). Les tests de corrélation standards ne sont pas appropriés pour distinguer ces hypothèses car les valeurs sont non indépendantes les unes des autres ; des tests de randomisation/permutation sont requis. La similarité de composition en espèces des communautés peut être transposée à la similarité génétique d’individu appartenant à un même taxon. *Source Martiny et al. 2006.*

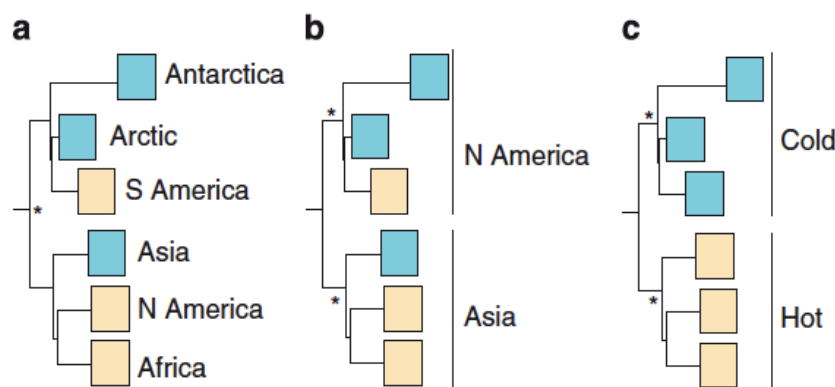


Figure 0.10. Phylogénies conceptuelles résultant de différents scénarii de la distribution globale de cyanobactéries de désert. L’analyse se concentre sur la diversification d’un taxon microbien. (a) La dispersion est infinie, il n’y a pas d’effet fort de l’environnement, les régions géographiques et les habitats sont mixés dans la phylogénie. La divergence est récente. (b) La dispersion

est limitée permettant la spéciation allopatrique, les régions géographiques sont distinctes et les habitats mixés dans la phylogénie. La divergence correspond à la formation des continents. (c) La dispersion n’est pas limitée, et il y a une forte pression de l’environnement sur l’occurrence des organismes, les régions sont mixées et les habitats distincts dans la phylogénie. La divergence est très ancienne, avant la formation des continents. Les astérisques indiquent des groupes monophylétiques. Les encadrés marron et bleu indiquent les déserts chauds et froids respectivement. *Source Bahl et al. 2011.*

2.4. Influence de la résolution spatiale, taxonomique et temporelle

L'influence respective de chaque processus varie selon l'échelle spatiale. Une étude ciblant les communautés Nitrosomonadales (amonia-oxidizing bacteria, AOB) de marais maritimes révèle une dispersion limitée à échelle locale pour des organismes globalement distribués (Figure 0.11; Martiny *et al.* 2011). Ces résultats sont somme toute contradictoires avec l'idée que l'environnement aura un effet plus fort aux échelles locales qu'à l'échelle continentale (Martiny *et al.* 2006).

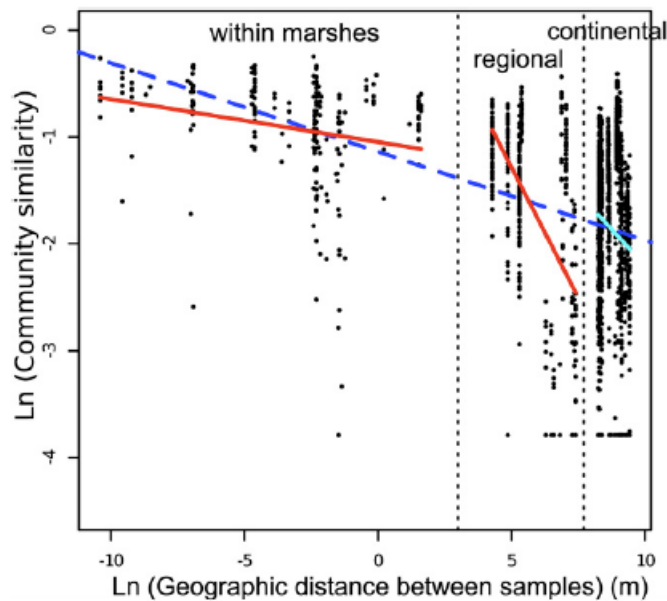
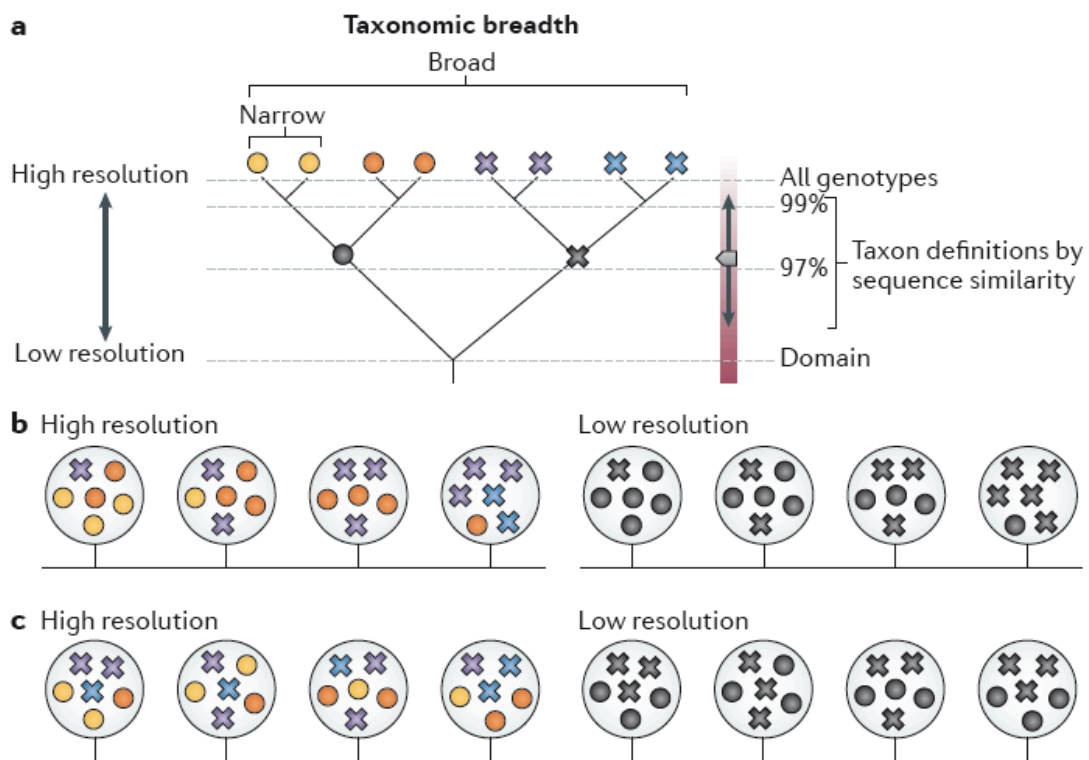


Figure 0.11. Les déterminants de la beta diversité varient avec l'échelle spatiale. Relation entre la similarité des communautés de Nitrosomonadales et la distance géographique les séparant. La courbe bleue en pointillés est la régression globale, les pleines par échelles spatiales (au sein d'un marais, entre marais d'une même région, entre région). La pente de la courbe bleu azur n'est pas différente de 0, les pentes des courbes rouges sont négatives. Les effets de la distance géographiques sont forts à petites échelles spatiales. *Source Martiny et al. 2011.*

La résolution taxonomique a également une incidence sur les patrons biogéographiques. Dans une certaine mesure, si oui ou non « tout est partout » est une question d'échelle (Figure 0.12). Les microorganismes sont ubiquistes sur Terre mais la distribution des espèces ne l'est pas. En général, les patrons observés à une résolution taxonomique fine ne le seront pas à une résolution plus grossière. C'est le cas des macroorganismes comme les plantes, pour lesquelles plus de genres sont restreints à une zone géographique que ne le sont les familles.

La dimension temporelle des patrons de distribution est un point important et elle est implicitement évoquée ci-dessus. Les microorganismes peuvent se disperser partout, mais si le taux d'évolution est plus rapide que le taux de dispersion, il en résultera de l'adaptation locale. De plus, les transferts horizontaux de gènes pouvant avoir lieu dans la minute il est très probable qu'il y ait de l'adaptation locale. Les études montrant un effet de la contingence historique sont vivement débattues par Fenchel

(2003). Il invoque la non prise en compte de la dynamique génétique au sein des populations. Les clusters génétiques géographiques trouvés ne seraient issus que de la dérive génétique au sein d'espèce ou d'écotype n'ayant pas encore subi la purge occasionnelle de la sélection naturelle. Le nombre de génotypes possibles au sein de telles espèces peut être « infini ». Localement, certains clones peuvent dominer à un moment donné, et les séquences de gènes des bactéries échantillonnées dans différents endroits peuvent donner l'impression d'une structure géographique (Fenchel 2003).



Egalement, l'environnement (biotique et abiotique) n'est pas constant dans le temps. Ainsi, les variations du climat vont fortement impacter la composition des communautés microbiennes, tant dans les écosystèmes marins (Gilbert *et al.* 2012) que terrestres (Zinger *et al.* 2009). Les variations du climat ou de l'environnement s'opèrent à l'échelle des cycles journaliers, saisonniers ainsi qu'à des pas de temps plus long comme les successions écologiques (primaires et secondaires, revu dans Bardgett *et al.* 2005) ou au cours des temps géologiques (fondement de la biogéographie avec la dérive des continents).

Les différents processus ne sont pas mutuellement exclusifs. Ils peuvent agir à des échelles de temps et d'espace similaires ou différentes et la magnitude de leur effet peut changer selon l'habitat et les taxons microbiens. Toutefois, une revue récente rapporte que plus de 90% des études qui testent explicitement l'effet de l'environnement actuel et de la dispersion limitée sur la composition des communautés microbiennes mettent en évidence une influence plus forte de l'environnement, mais n'excluent pas un effet de la distance géographique (dispersion limitée et contingence historique, Hanson *et al.* 2012). Deux points importants sont à relever: i) les facteurs biotiques sont rarement pris en compte et ii) la place de la spéciation et de la dérive reste à définir.

L'ensemble des études tend à montrer que les patrons d'assemblages des communautés microbiennes ne sont pas aléatoires et qu'ils répondent aux mêmes lois que celles qui régissent la distribution de la diversité chez les macroorganismes. Cependant, à l'échelle continentale, la structure des communautés bactériennes ne reflète pas la classification générale des biomes décrits pour les plantes et les animaux (Lauber *et al.* 2009). Plusieurs études indiquent également que la biogéographie pour les champignons diffère de la biogéographie des macroorganismes, Le cadre de travail appliqué aux macroorganismes est applicable aux microorganismes. La question est de savoir l'importance relative de chaque processus (en incluant les interactions biotiques dans la force de sélection) et à quelles échelles ils opèrent (Green & Bohannan 2006, Zinger 2009). Il est important d'évaluer l'influence de ces processus selon les caractéristiques biologiques des organismes.

2.5. L'importance des facteurs biotiques

Comment se fait-il qu'il y ait tant d'espèces microbiennes dans un écosystème apparemment homogène dans lequel toutes les espèces sont en compétition pour la même ressource? Cette question a fait l'objet de nombreuses études tant pour les macro- que les

Box 4. Interactions interspécifiques

Il a été proposé de faire la distinction entre les interactions dans lesquelles les organismes se nourrissent directement de l'autre organisme (nutritive interaction) de celles dans lesquelles les organismes interagissent (directement) pour un pool de nutriments qui s'épuise indirectement en résultat de l'interaction (non nutritive interaction) (Tuininga dans Dighton et al. 2005). Cette distinction est importante pour les microorganismes, notamment les champignons, car ils acquièrent leurs ressources hors de la cellule, impactant presque toujours les autres organismes, sans que ce soit obligatoirement négatif. Par exemple, un organisme peut utiliser les enzymes sécrétées par un autre ou le produit des réactions comme sources de nutriments (Garbaye 1991). Les deux classes d'interactions mettent en jeu des mécanismes sous-jacents différents et non comparables directement.

Nutritive interactions. Elles sont divisées en trois classes, correspondant à des modes d'acquisition des nutriments. **Biotrophie.** L'organisme acquiert des nutriments à partir de cellules vivantes de l'hôte, e.g. parasitisme. **Nécrotrophie.** L'organisme acquiert des nutriments en tuant l'autre organisme, e.g. la prédation. **Saprotrophie.** L'organisme acquiert des nutriments à partir de matériel mort, e.g. la décomposition. Ces classes d'acquisition de nutriments ne sont pas mutuellement exclusives mais se chevauchent en continuum. Sous cette classification, les mycorhizes sont un exemple de biotrophisme et non de mutualisme. Cela stoppe les problèmes de l'interaction mycorhizienne dont le résultat n'est pas toujours positif pour l'hôte comme le symbiote. La connaissance des modes d'acquisition des nutriments (décrit comme classe d'interactions) peut aider à prédire les types d'interactions interspécifiques non nutritives pouvant avoir lieu : deux saprotrophes ont plus de chances d'entrer en compétition qu'un saprotrophe et un nécrotrophe.

Non-nutritive interactions. Elles sont caractérisées par le résultat de l'interaction sur la croissance ou l'occurrence des organismes (Figure B4). Les résultats d'une interaction non-nutritive sont plus facilement comparables entre disciplines en écologie que les mécanismes, bien que les deux catégories soient nécessaires pour une compréhension complète de l'interaction. **Coantagonisme:** (-/-). Ce terme est préférable à compétition pour décrire une interaction bilatérale mutuellement antagoniste car la compétition n'est qu'un mécanisme du coantagonisme. **Antagonisme:** (-/0). Ce terme est préféré à amensalisme car il est consistant avec coantagonisme. **Agonisme:** (-/+). Le parasitisme et la prédation ont le même résultat d'interaction que l'agonisme mais l'utilisation de ces termes doit être restreinte à la description d'interactions impliquant l'acquisition de nutriments (biotrophisme et nécrotrophisme, cf. ci-dessus). **Cohabitation:** (0/0). Interaction plus ou moins neutre dans laquelle aucun des organismes impliqués n'est affecté positivement ou négativement. Il est cependant peu probable que deux organismes croissent côte à côte sans s'influencer, et si cela se passe ce devrait être éphémère. Cette interaction ne requiert pas une absence absolue d'effet (faiblement positive ou négative pour l'un ou l'autre protagoniste, variable dans le temps, neutralité nette au final) et est donc préférée à neutralisme. La cohabitation couvre une plus grande partie du continuum autour de la neutralité stricte. **Commensalisme:** (0/+). **Mutualisme:** (+/+). Cette interaction tout comme le commensalisme doit être répandue dans la nature du fait de la grande quantité d'enzymes extracellulaires et de métabolites secondaires sécrétés par les champignons (Frankland 1998; Garbaye 1991) pouvant constituer une source directe de nutriments pour d'autres organismes ou indirecte si les produits de la réaction sont une source de nutriments ou inhibent la croissance d'un compétiteur commun aux deux organismes.

Cette redéfinition des interactions interspécifiques permet d'avoir des termes clairs, sans ambiguïté entre mécanisme et résultat d'interaction et est cohérent avec le continuum du co-antagonisme au mutualisme.

Les interactions plantes-microorganismes sont généralement étudiées du point de vue des interactions nutritives (ce sera le cas de cette thèse). Cependant, les plantes et les microorganismes peuvent rentrer en compétition pour une même ressource, et donc entretenir des interactions non nutritives.

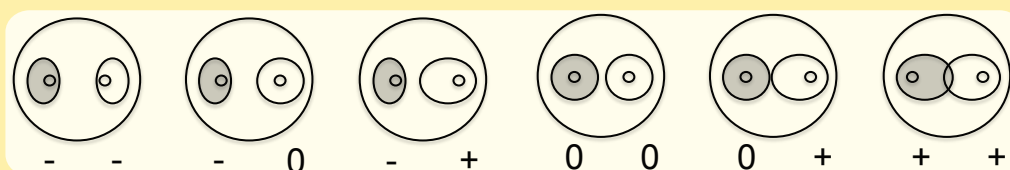


Figure B4. Illustration des conséquences des interactions entre deux organismes sur leur croissance.

microorganismes. Pour les microorganismes, cette observation est connue sous le nom du “paradoxe du plancton” (Hutchinson 1961).

Cette diversité microbienne est en partie régulée par la compétition, mais elle devrait mener au stade ultime de la dominance d’une espèce. Les espèces en compétition peuvent coexister si des mécanismes de perte sélective d’espèce sont à l’oeuvre afin d’éviter que l’espèce la plus compétitrice séquestre les ressources. Par exemple, la prédation d’espèces de différentes tailles par les bactériophages ou des protozoaires ou encore le parasitisme par des virus hôte-spécifiques peut permettre la coexistence d’espèces microbiennes en compétition (Torsvik *et al.* 2002). Les interactions biotiques sont une force de sélection importante dans la régulation de la diversité microbienne et sa distribution spatio-temporelle.

Les interactions sont de nature diverse et sont généralement classées en fonction du résultat de l’interaction entre deux organismes, c’est à dire en fonction de la somme des coûts et des bénéfices de l’interaction pour chaque partie. Plusieurs mécanismes différents peuvent cependant mener au même résultat d’interaction et dépendre des espèces en présence, ce qui a amené à clarifier les types d’interactions (Box 4). Il existe une différence fondamentale dans les types d’interactions : les interactions où l’une des parties se nourrit sur l’autre, les interactions nutritives (trophiques), et les interactions où les deux organismes tirent leur énergie de la même ressource, les interactions non nutritives.

3. Sur la connaissance des niches écologiques chez les microorganismes

3.1. Contexte : le lien phylogénie-fonction

Il est frappant de voir le manque d’information concernant l’écologie des microorganismes, à commencer par l’habitat et la distribution spatiale, et le manque encore plus grand de ce qu’ils font, à savoir les modes de vie et les stratégies écologiques. La niche des microorganismes (Box 5) est difficile de définir.

L’écologie des organismes est essentielle à caractériser car elle nous renseigne sur le rôle des organismes dans l’écosystème. L’espèce est l’unité fondamentale de l’organisation de la diversité mais le concept d’espèce en microbiologie est vivement débattu. Un point peut être encore plus controversé est la cohérence écologique des branches profondes des arbres phylogénétiques. C’est à dire à savoir si les modes de vie, les stratégies écologiques ou encore les traits fonctionnels sont conservés dans la

phylogénie, c'est à dire s'il existe un conservatisme de niche. Il est défini de la manière suivante : plus les organismes sont proches phylogénétiquement plus leurs caractéristiques écologiques sont similaires. Le lien phylogénie-fonction est débattu d'autant plus que les microorganismes échangent des gènes entre eux même lorsqu'ils sont distants phylogénétiquement.

Box 5. La niche écologique

La **niche écologique** est l'ensemble des conditions environnementales telle qu'une espèce donnée peut former des populations viables (Figure B5A). C'est un hypervolume où chaque dimension de l'espace représente une ressource ou une condition de l'environnement. En effet, la niche peut être caractérisée par une multitude de traits fonctionnels et/ou d'histoire de vie, ou de préférences climatiques (espace multidimensionnel).

La **niche fondamentale** reflète les capacités physiologiques de l'espèce à vivre dans certaines conditions climatiques. La **niche réalisée** est caractérisée par les conditions climatiques et écologiques pour lesquelles l'espèce est effectivement retrouvée. Les processus de dispersion (limitée ou de masse) et d'interactions biotiques (compétition ou facilitation) sont à l'origine de la discordance entre niche fondamentale et réalisée (Figure B5B).

Chez les plantes, la niche est souvent caractérisée en deux dimensions par la température et l'humidité. Pour les microorganismes il reste à caractériser les variables environnementales qui contraignent l'établissement des espèces mais aussi les modes de nutrition et les traits d'histoire de vie.

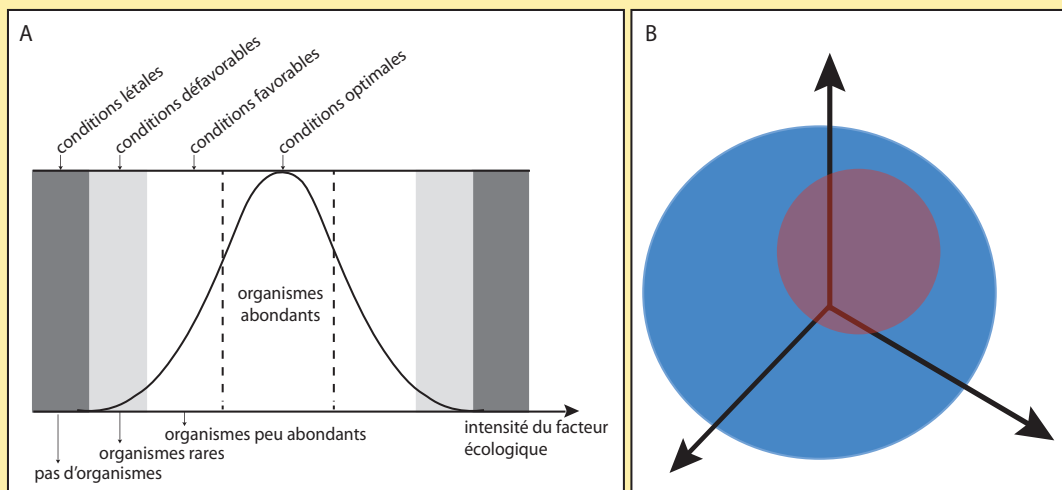


Figure B5. (A) Relation entre l'abondance d'un organisme et les conditions du milieu. D'après source (locust.cirad.fr). (B) Niche fondamentale (bleue) et réalisée (rouge), en 3 dimensions d'habitat.

La question du lien phylogénie-fonction peut en partie être traitée par l'analyse de la beta diversité. Le principe est de voir comment varient les patrons de beta diversité selon la résolution phylogénétique. Les forces qui gouvernent la biogéographie microbienne seraient mieux évaluées à une échelle fine de la diversité génétique (Martiny *et al.* 2006). Cela suggère que les grands groupes taxonomiques sont ubiquistes

et que les espèces au sein de ces groupes se spécialisent pour différents habitats, impliquant qu'il n'y a pas de conservatisme de niche.

3.2. Connaissances des niches écologiques chez les microorganismes

Jusque là, la question des stratégies écologiques chez les microorganismes et leur cohérence dans la phylogénie est principalement étudiée chez les bactéries. Un travail récent de revue sur la génomique bactérienne met en évidence une cohérence écologique entre organismes au sein d'un même phylum et des différenciations de niches entre phylums (Figure 0.13 ; Philippot *et al.* 2010).

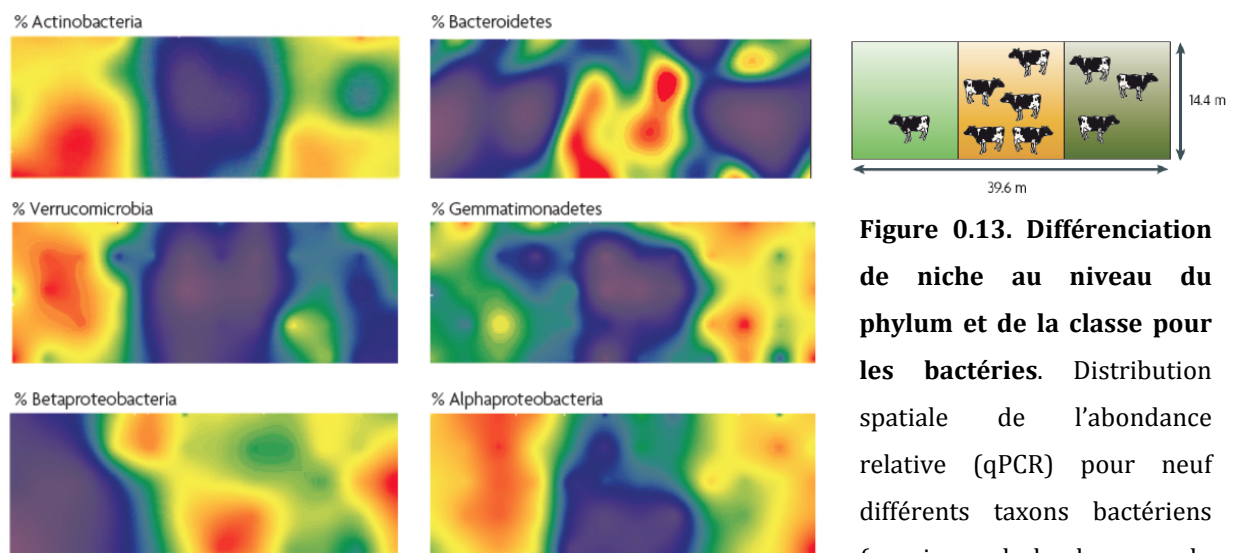


Figure 0.13. Différenciation de niche au niveau du phylum et de la classe pour les bactéries. Distribution spatiale de l'abondance relative (qPCR) pour neuf différents taxons bactériens (au niveau de la classe ou du

phylum) dans la communautés bactérienne totale d'un pâturage sujet à trois niveaux de pressions de pâturage. Rouge : forte abondance ; bleu : faible abondance. *Source Philippot et al. 2010.*

Fierer et collègues ont conduit une analyse expérimentale et une méta-analyse dans laquelle ils proposent que les bactéries se différencient selon des stratégies écologiques au niveau de la classe ou du phylum (Fierer *et al.* 2007). Ces stratégies écologiques sont définies sur la base des stratégies de vie r et K, r représentant les organismes qui se développent rapidement quand les ressources sont abondantes, aussi appelés et retrouvés dans les systèmes copiotrophes, et K, les organismes qui se développent lentement mais qui ont une affinité pour un substrat, aussi appelés et retrouvés dans les systèmes oligotrophes. Leur analyse se base sur la réponse des phylums bactériens à la teneur en carbone (sucrose). La classe des Betaproteobacteria et le phylum des Bacteroidetes ont un comportement copiotrophe, alors que les Acidobacteria ont un

comportement oligotrophe (Figure 0.14). Comme le nom de phylum le suggère, la préférence pour les pH acides (du sol généralement) est un trait commun pour plusieurs sous-phylums au sein des Acidobacteria. Dans l'environnement, l'abondance (relative) des Acidobacteria dans la communauté bactérienne totale est négativement corrélée avec

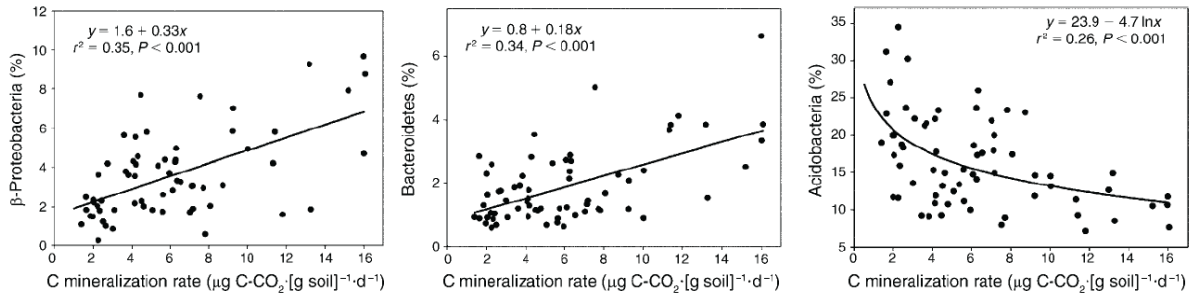


Figure 0.14. Différence de réponse à la disponibilité en carbone (C) entre phyla bactériens. La figure montre la relation entre le taux de minéralisation nette du C (un indicateur de la disponibilité en C) et l'abondance relative de trois taxons bactériens, pour 61 sites distribués dans les Etats-Unis. Source Fierer *et al.* 2007.

le pH, à l'inverse de ce qui est observé pour plusieurs autres taxons (Lauber *et al.* 2009). En accord avec ces observations, le séquençage du génome de trois souches d'Acidobacteria a permis d'identifier des gènes candidats indiquant un mécanisme de tolérance aux conditions acides (Ward *et al.* 2009). Dans leur méta-analyse, Fierer et collègues montrent par exemple que les Proteobacteria sont généralement plus abondantes dans le sol de rhizosphère, et excluent le fait que les patrons retrouvés sont tirés par une seule espèce (Figure 0.15). Ainsi, plus de 500 taxons proches phylogénétiquement et appartenant aux Proteobacteria et aux Actinobacteria augmentent en abondance pour des composés organiques labiles (glycine, sucrose) (Goldfarb *et al.* 2011). Les taxons qui augmentent en abondance pour la matière organique complexe (cellulose, lignine, tannins-protéines) sont moins nombreux (moins de 200) et sont à l'inverse plus distants phylogénétiquement (8 phylums). Quelques taxons répondaient positivement aux deux catégories de substrats. Ces spécialisations écologiques étaient corrélées au nombre de copies du gène de l'ARNr 16S, un indicateur des stratégies de croissance copiotrophes (beaucoup de copies) et oligotrophes (peu de copies) (Fierer *et al.* 2007; Green *et al.* 2008; Goldfarb *et al.* 2011). Ces résultats sont présentés dans la Figure 0.16.

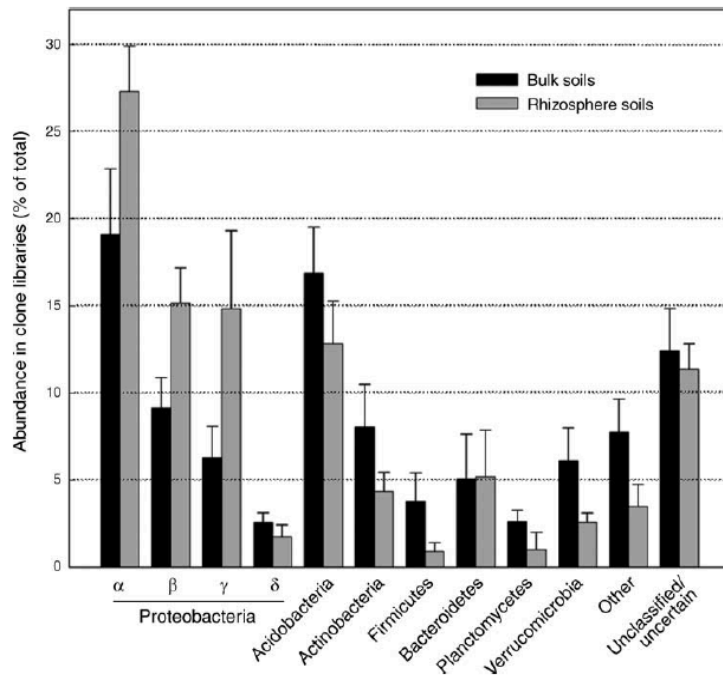


Figure 0.15. Différence de réponse à la présence de plantes entre phylums bactériens. La figure montre l'abondance relative de trois phylums estimée à partir de 16 études différentes dans le sol nu et sous les plantes. *Source Fierer et al. 2007.*

Les caractéristiques écologiques des taxons bactériens apparaissent plutôt conservées au sein des phylums et des classes, amenant à une cohérence des signatures écologiques à différentes résolutions phylogénétiques (Philippot *et al.* 2010; Zinger *et al.* 2011a). Les bactéries appartenant à un même phylum ont ainsi tendance à être simultanément présentes plus souvent que par chance à échelle globale (Barberan *et al.* 2012). Elles sont sélectionnées par l'environnement pour un trait commun sans qu'elles ne soient en compétition. Les bactéries d'un même phylum ou d'une même classe ont ainsi tendance à être significativement proches phylogénétiquement dans la communauté qu'elles composent, suggérant un comportement trophique propre à certains phylums (Shahnavaz *et al.* 2012). Récemment, quelques organismes généralistes, résistants à la sécheresse, et spécialistes des conditions humides ont été identifiés chez les bactéries et les champignons (Lennon *et al.* 2012). Ces stratégies contrastées avaient également un signal à un haut niveau phylogénétique (phylum) suggérant que la niche des microorganismes vis à vis de l'humidité est très conservée. Cependant, la conservation des traits ou des stratégies dans la phylogénie varie selon le trait étudié ou des caractéristiques pour définir la niche. Une étude expérimentale récente sur la distribution des bactéries à un changement dans les régimes de précipitations montre que les stratégies de réponses à une succession d'évènements humides et de sécheresse ne sont pas conservées dans la phylogénie (Evans & Wallenstein 2014).

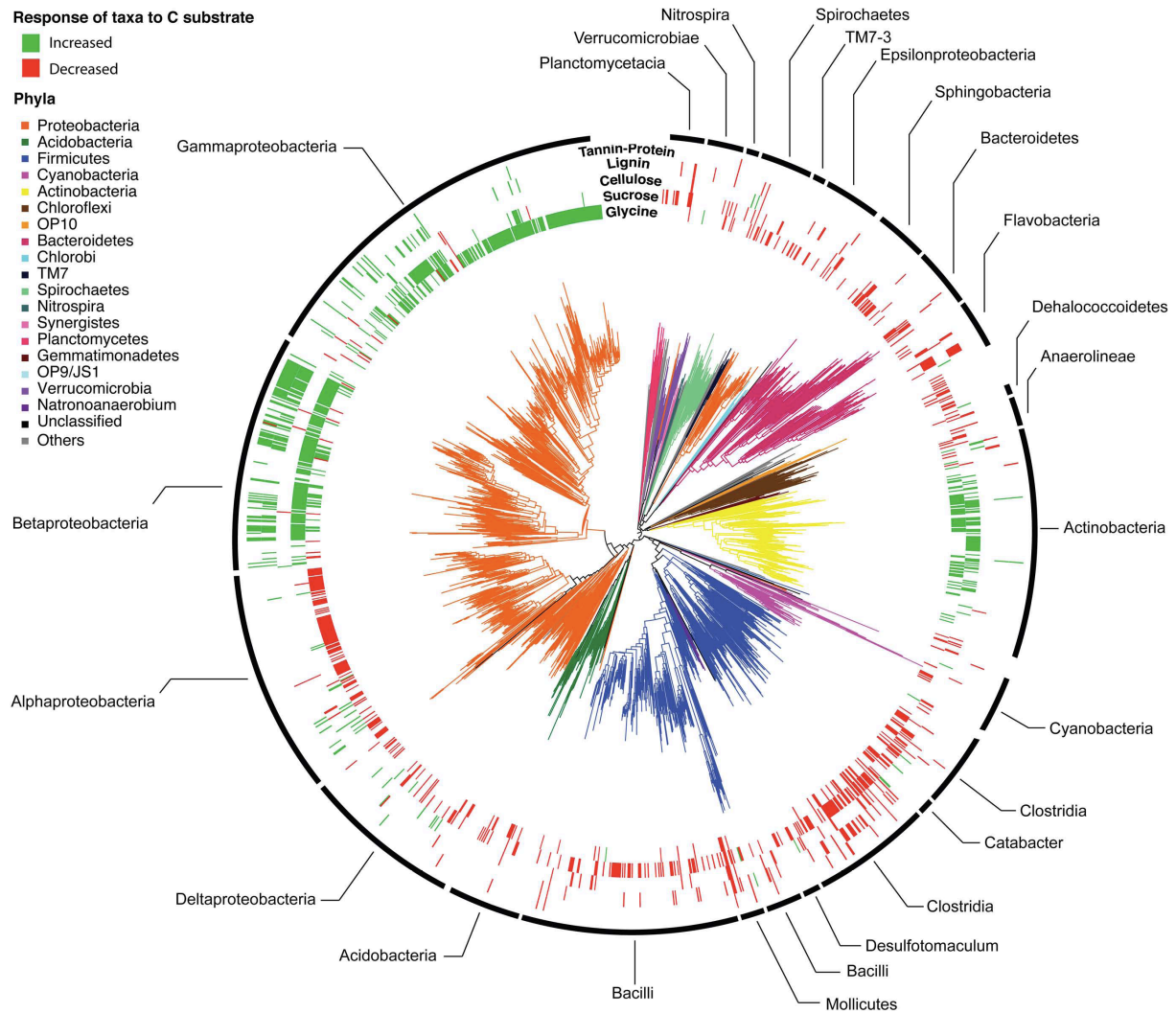


Figure 0.16. Réponse des bactéries à l'addition de composés carbonés de différente qualité suivant leur position phylogénétique. Source Goldfarb *et al.* 2011.

En dépit de l'étude de Lennon et collègues (Lennon *et al.* 2012), cet important développement théorique et empirique chez les bactéries n'a pas eu lieu pour les champignons, à l'instar du manque déjà apparent d'étude de la diversité fongique. L'existence d'un conservatisme de niche n'est pas claire pour les champignons (Box 6). Une phylogénie récente indique que les modes de nutrition ne sont pas conservés. Chaque mode serait apparu plusieurs fois indépendamment, avec une évolution courante des parasites aux saprotrophes et vice versa (Figure 0.17) (James *et al.* 2006).

La capacité à pénétrer les parois cellulaires jusqu'au cytoplasme pour établir une association entre les hyphes fongiques et les racines d'une plante, les endomycorhizes, se trouve exclusivement chez les Glomeromycota, mais la capacité à établir une association mycorhizienne est aussi retrouvée chez les Ascomycota et les Basidiomycota. Ce cas est similaire à la capacité à former des lichens : tous les

Box 6. The Fungi

Les niches écologiques des taxons fongiques restent à caractériser, bien que certaines caractéristiques soient relevées au sein des majeurs clades fongiques (Figure B6).

Zygomycota (Mortierellales). Principalement terrestre. Dans les sols et/ou sur du matériel végétal et animal (décomposition). **Ascomycota**. Grande variation de taille et de complexité des levures unicellulaires aux pathogènes (leaf-spot) jusqu'aux champignons en forme de coupe et les truffes. Produisent un grand nombre de spores, généralement dispersé par le vent. Saprotophres importants, particulièrement sur matériel végétal. Près de la moitié forme des lichens. Certains sont mycorhiziens. **Basidiomycota**. Décomposeurs importants du bois et de matériel végétal en général. Ce sont les plus aptes à décomposer les polymères carbonés complexes comme la lignine. Certains sont des mycorhiziens ou des parasites des plantes. La reproduction asexuée est moins commune que chez les Ascomycota. **Glomeromycota**. Endomycorhiziens.

Cependant, les différents modes de nutrition ne sont pas phylogénétiquement conservés (James et al. 2006). Le mode de nutrition de l'ancêtre commun est ambigu mais la lignée divergente la plus ancienne contient des parasites (James et al. 2006), suggérant un lien fort entre les champignons et les plantes, à la manière de l'évolution des plantes et des mycorhizes il y a 450 millions d'années.

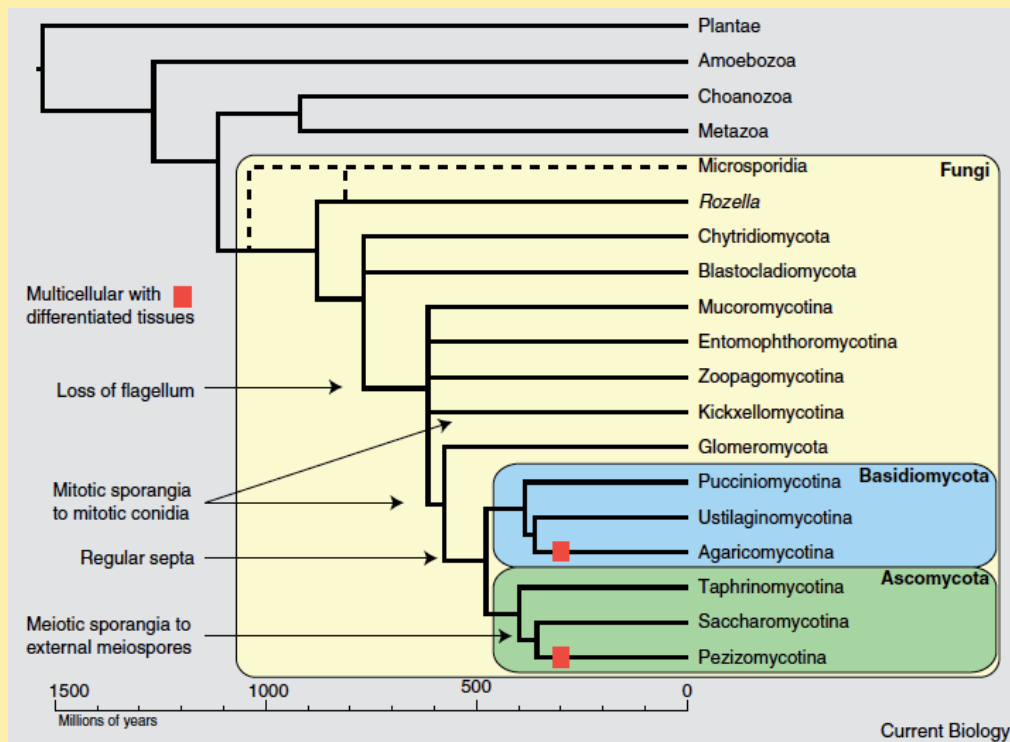


Figure B6. Arbre phylogénétique des Fungi. Les Ascomycota comptent 64% des espèces décrites, les Basidiomycota 34%. Source (Stajich et al. 2001).

Lécanoromycètes forment des lichens mais ce trait est retrouvé dans d'autres groupes (James *et al.* 2006). Enfin, une analyse phylogénétique (ADNr 18S) révèle que les champignons pathogènes des plantes au sein des Ascomycota sont concentrés dans quatre classes (Léotiomyètes, Dothidéomyètes, Sordariomyètes, Taphrinomyètes) (Berbee 2001). Les pathogènes des animaux sont eux aussi concentrés, dans deux classes contenant peu ou pas de pathogènes des plantes (Eurotiomycetes, Chaetothyriomycetes). Cependant, au lieu que ce soit un trait commun à la classe, la

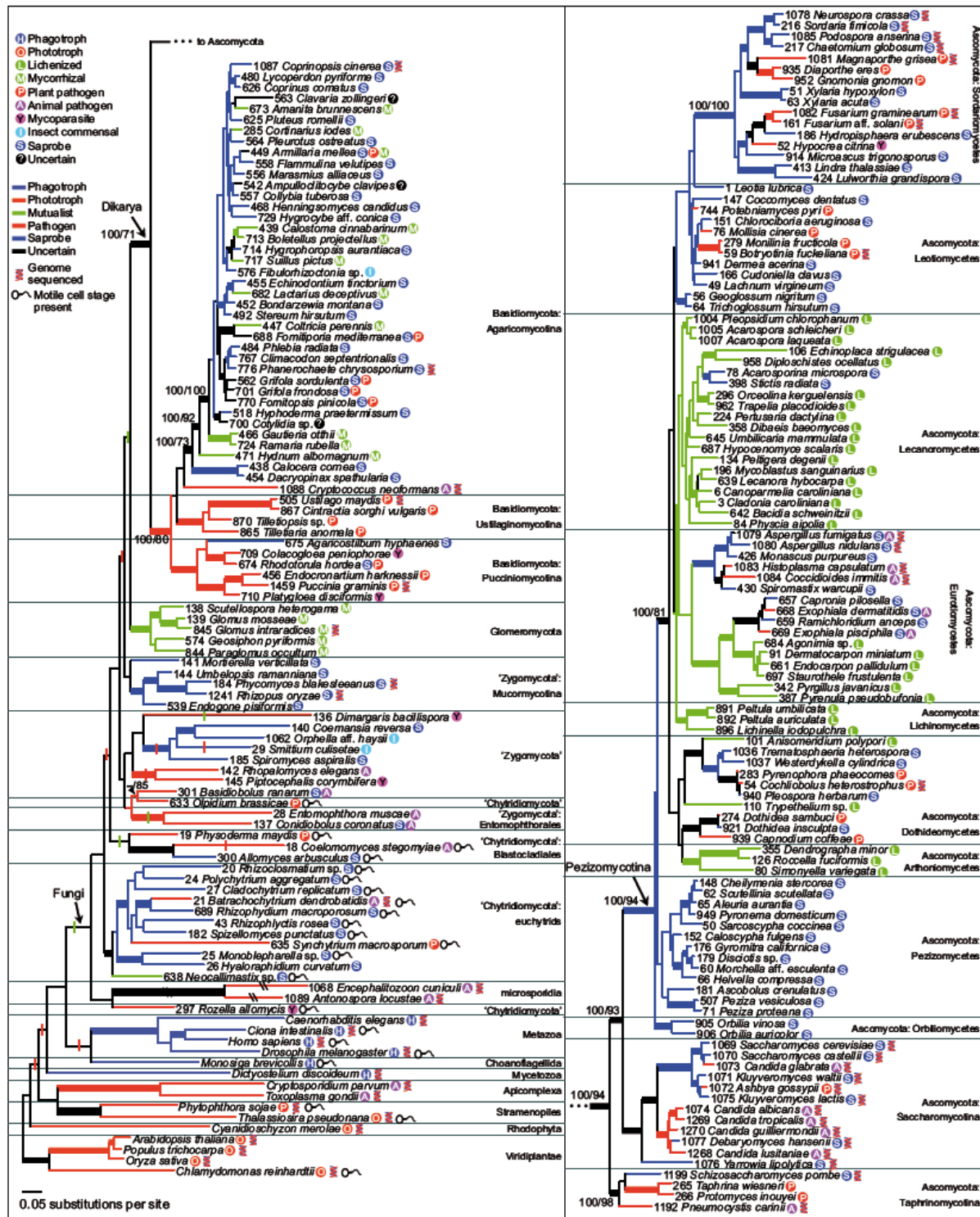


Figure 0.17. Phylogénie des champignons et modes de nutrition de différents clades. Source James et al. 2006.

capacité de causer une maladie aux plantes ou aux animaux serait gagnée ou perdue de manière répétée (Berbee 2001). Les auteurs suggèrent que les plantes sont importantes dans l'évolution des champignons et que la co-évolution rapide entre les deux parties

pourrait partiellement expliquer l'absence de caractères flagrants et globaux unifiant tous les pathogènes des plantes.

Peu d'études ont testé la variation des patrons écologiques selon la résolution taxonomique à laquelle les communautés sont caractérisées (voir Zinger *et al.* 2011a). Utilisant l'approche moléculaire et séquençage haut-débit, une étude a mis en évidence des préférences écologiques altitudinales au niveau de l'ordre pour les champignons. Cependant, cet effet n'était généralement tiré que par un seul MOTU dans l'ordre (Davey *et al.* 2013a) et aucune préférence d'habitat n'était flagrante. L'analyse des patrons de diversité à différentes échelles phylogénétiques et la caractérisation de la distribution ou de l'habitat des différents taxons sont une étape importante à la compréhension du lien phylogénie-fonction.

Nous sommes loin d'une description complète de la diversité microbienne dans la plupart des environnements. Plus important, l'écologie, la physiologie et l'histoire de vie de la plupart des taxons microbiens, même abondants, restent inconnues. Il est nécessaire de décrire la diversité microbienne, les facteurs structurant les communautés et les caractéristiques écologiques des différents taxons, à commencer par leur distribution. Les facteurs biotiques doivent être pris en compte dans les études de biogéographie.

III. Microbiologie terrestre

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse à la microbiologie environnementale terrestre. La surface terrestre est majoritairement recouverte par du sol. La particularité des sols est double : i) c'est un milieu très complexe, présentant une multitude de micro-niches et des forts gradients à très faible échelle spatiale. La diversité dans les sols (et les sédiments excède d'un ordre de magnitude celle des habitats aquatiques (Torsvik *et al.* 2002); ii) ils sont recouverts par la végétation.

Cette thèse s'intéresse particulièrement au rôle des interactions plantes-microorganismes sur la distribution spatiale de la diversité microbienne. Dans le milieu hétérogène complexe que sont les sols, la distribution spatiale des microorganismes est susceptible d'être influencée à différentes échelles spatiales par une hiérarchie de facteurs biotiques et abiotiques (Figure 0.18), souvent confondants. Par des effets de rétroactions chaque composante influe sur une autre. Par exemple, la teneur en eau des sols est corrélée au contenu en matière organique du sol (Poulenard *et al.* 2003) dépendante généralement du couvert végétal, lui même dépendant de la teneur en eau.

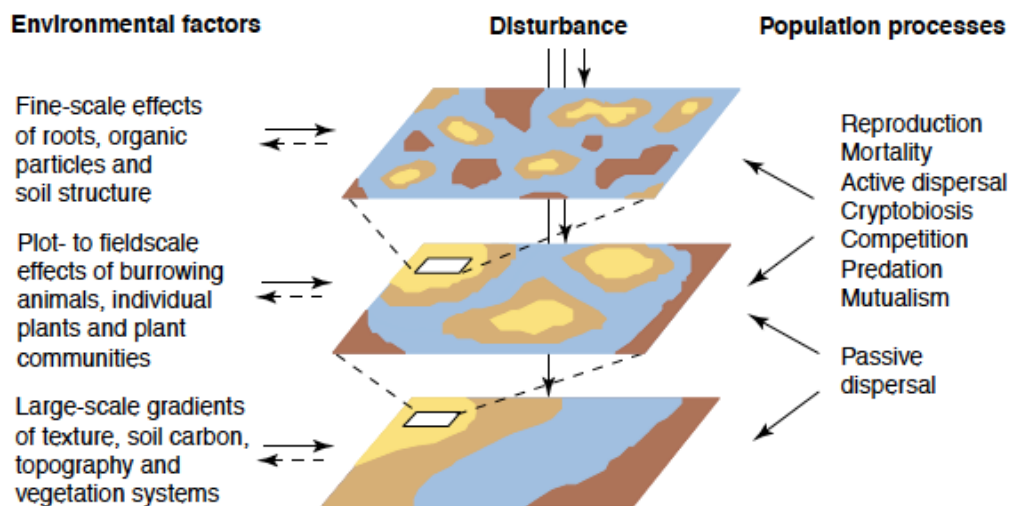


Figure 0.18. Facteurs à l'origine de la distribution spatiale des organismes du sol. L'hétérogénéité spatiale du sol opère à différentes échelles spatiales emboîtées à travers une hiérarchie de facteurs environnementaux et des processus intrinsèques aux populations. La perturbation influence cette distribution spatiale en modifiant les caractéristiques de l'habitat à petite ou grande échelle. Les effets de rétroaction entre l'activité des organismes et l'hétérogénéité des facteurs environnementaux influence en retour l'hétérogénéité des facteurs environnementaux et la distribution des organismes. *Source Ettema & Wardle 2002.*

1. Influence des facteurs abiotiques du sol

Plusieurs facteurs abiotiques peuvent être déterminants de l'assemblage des communautés du sol. Le pH semble être un facteur majeur impactant les communautés bactériennes mais aussi fongiques, quelque soit l'échelle spatiale considérée. A l'échelle du continent nord-américain et du continent américain, la diversité et la composition des communautés bactériennes sont déterminées par le pH du sol (Fierer & Jackson 2006; Lauber *et al.* 2009). La beta diversité est particulièrement forte pour des pH acides quand il varie entre 3 et 6. Un pic de diversité est observé pour des valeurs neutres de pH. Ces changements de diversité sont valables inter- et intra- taxons. A l'étage alpin, le pH détermine la composition des communautés microbiennes notamment bactériennes (Zinger *et al.* 2011b). Les bactéries sont donc particulièrement sensibles aux variations de pH. Les bactéries et les champignons répondent de manière antagoniste. Basée sur la technique des PLFA, Baath & Anderson montrent une corrélation positive entre le pH du sol et le ratio de biomasse champignons/bactéries (Baath & Anderson 2003) en parallèle d'un changement de composition. Utilisant la même technique, Hogberg *et al.* (2007) montrent une corrélation positive entre la biomasse bactérienne et le pH, et négative pour les champignons, avec un changement de composition. Le pH du sol est cependant affecté par plusieurs composantes comme la végétation sus-jacente, l'utilisation des terres, la qualité de la matière organique mais aussi par l'activité microbienne. Minimisant la variation d'un maximum de caractéristiques abiotiques du sol et maximisant la variation de pH, en utilisant une quantification de la biomasse bactérienne et fongique par qPCR, Rousk *et al.* (2010) montrent que l'abondance relative et la diversité des bactéries sont affectées de manière positive par le pH, alors qu'il n'y a qu'un faible changement de l'abondance des champignons sans effet sur la diversité (Rousk *et al.* 2010). Cette influence du pH apparaît directe sur la composition des communautés bactériennes, probablement due à une croissance optimale des bactéries pour une gamme restreinte de pH. Les communautés fongiques semblent moins impactées par le pH. Des études de mise en culture des champignons, démontrant qu'ils peuvent avoir une croissance optimale dans une plus grande gamme de pH (Rousk *et al.* 2010).

La température affecte également les communautés microbiennes. Le froid, et en particulier le gel, sont des stress communs qui requièrent des adaptations microbiennes

et des acclimatations (Walker *et al.* 2006). On classe ainsi les micro-organismes selon leur tolérance aux températures. Les psychrophiles ont une croissance à des températures variant de -5 à 20 °C, les mésophiles de 15 à 45 °C et les thermophiles de 65 à 95°C. Pour les champignons associés aux arbres, la température est plus influente sur les communautés fongiques de la phyllosphère que celles du sol (Coince 2013). L'incidence lumineuse affecte l'abondance des microorganismes phototrophes et hétérotrophes. L'incidence lumineuse influe sur la composition et la productivité du couvert végétal ayant en retour un effet sur les microorganismes. L'humidité du sol impacte aussi profondément les communautés microbiennes (macromycètes, Gomez-Hernandez *et al.* 2012). Par exemple, les teneurs en eau en combinaison avec les variations de températures affectent la croissance de *Lecanicillium spp.* et leur virulence (Rivas *et al.* 2014). Notons l'importance des mouvements d'eau dans la dispersion des nutriments (et la perte par lessivage) et des microorganismes. Le potentiel d'oxydo-réduction contrôlant les réactions métaboliques affecte également l'abondance des microorganismes.

2. Importance des facteurs biotiques dans les sols

2.1. Le cas particulier des sols : le couvert végétal

Les plantes sont le compartiment autotrophe à la base de la chaîne trophique des sols, dont va dépendre toute une communauté d'organismes subordonnés, notamment les microorganismes principalement hétérotrophes dans les sols. Leur développement va largement dépendre de la matière organique apportée par les plantes. De cet apport découleront ensuite des interactions entre microorganismes, et avec les autres niveaux trophiques. La matière organique provient de la litière des plantes en sénescence (racines et feuilles) et des exsudats racinaires (e.g. carbohydrates, acides organiques, acides aminés). Les plantes constituent également un hôte obligatoire pour les biotrophes et les nécrotrophes.

L'impact de la présence d'une plante sur la structure des communautés microbiennes du sol est décrit pour la première fois par Hiltner en 1904. Il observe que le nombre et l'activité des microorganismes augmentaient à proximité des racines et propose qu'une multitude de microorganismes est attirée par les nutriments exsudés par les racines. Cet effet peut être expliqué également par un changement de la structure du sol par les racines. C'est l'effet rhizosphère. Kowalchuk *et al.* (2002) observe que la

composition bactérienne du sol nu adjacent à deux espèces de plantes différentes était similaire mais que la composition des communautés au niveau de la rhizosphère était propre à chaque espèce végétale. Ils relèvent aussi une perte de richesse au niveau de la rhizosphère quelque soit l'espèce étudiée. Cette étude suppose une sélection filtrante d'espèces microbiennes par la plante, spécifique selon l'espèce végétale.

Les relations entre plante et communautés microbiennes ont été observées à différentes échelles d'intégration, des espèces individuelles (Kowalchuk *et al.* 2002) aux communautés végétales (Eskelinen *et al.* 2009; Peay *et al.* 2013; Zinger *et al.* 2011b), à différentes échelles spatiales, de l'individu (Mouhamadou *et al.* 2013b; Article I) aux populations d'individus spatialement distantes au sein d'une région (Hovatter *et al.* 2011; Article I), et en conditions naturelles et de laboratoire (Bouasria *et al.* 2012).

Une multitude de facteurs éco-évolutifs peuvent expliquer les différences d'effet sur la communauté microbienne suivant l'espèce végétale. Les plantes possèdent des caractéristiques éco-physiologiques qui peuvent affecter de manière spécifique à la fois les saprotrophes à travers la quantité ou la qualité de la matière organique et les biotrophes à travers les mécanismes de défenses immunitaires ou les caractéristiques de cycle de vie. Les caractéristiques éco-physiologiques des espèces résultent de la sélection naturelle et traduisent leur adaptation à un environnement donné. Cette suite de traits fonctionnels définit ainsi les stratégies écologiques mises en place au cours de l'évolution par l'espèce ou la population maximisant la performance des individus ou du groupe en réponse aux contraintes environnementales.

Les traits fonctionnels tels que le taux de croissance, la capacité d'absorption des nutriments, la production de composés issus du métabolisme secondaire (polyphénols tels que les tanins ou les anthocyanes) ou encore la production de lignine vont avoir un effet sur la quantité et la qualité de la matière organique. Les espèces microbiennes les plus aptes à utiliser la ressource domineront. Le remplacement d'espèces par d'autres durant la colonisation (Frankland 1998) et l'utilisation de ressources spécifiques dans l'environnement ont été observés (Garbaye 1991). Pour les champignons par exemple, la succession de saprotrophes est reliée à la capacité relative de chaque groupe fonctionnel à produire l'enzyme de dégradation appropriée (Frankland 1998). La compétition pour les ressources explique le remplacement des espèces par d'autres, meilleures dans l'utilisation des ressources non consommées du fait de leur plus faible dégradabilité.

Les biotrophes, comme les pathogènes, les mycorhizes ou les endophytes, sont plus intimement liés aux plantes du fait d'une interaction physique. Ils peuvent co-évoluer (cas des systèmes hôtes-parasites) dans une « course à l'armement » dans laquelle l'innovation d'une partie entraîne une réponse de l'autre. Ils peuvent également co-spécier, l'apparition d'une espèce végétale (en sympatrie ou allopatric) ouvrant une nouvelle niche écologique et ainsi une opportunité pour certains organismes de s'adapter. Également, les traits végétaux comme la durée de vie peut mener à sélectionner des biotrophes aux caractéristiques différentes comme leur pouvoir virulent. Ces phénomènes mènent à une forte spécialisation des microorganismes pour chaque plante.

Les plantes excrètent également dans le sol une multitude de composés impliqués dans la communication interspécifique (Bais *et al.* 2006). Ces molécules peuvent avoir des effets négatifs sur les microorganismes du sol (e.g. les antibiotiques, mimiques du Quorum Sensing), ou positif en les attirant au niveau des racines par chimiotactisme par exemple.

2.2. Un effet singulier de chaque espèce végétale ? Similarité fonctionnelle et similarité phylogénétique

L'observation répétée d'un effet des plantes espèce-spécifique sur les communautés microbiennes a mené à la formulation de l'hypothèse singulière (Eisenhauer *et al.* 2010). A chaque plante serait associé un cortège microbien qui lui est propre. Le pendant de cette hypothèse est que la diversité microbienne est corrélée à la diversité végétale. Ces deux hypothèses impliquent à la fois i) une forte spécificité d'hôte de la part des microorganismes et ii) une capacité équivalente de chaque espèce végétale à créer un nouvel habitat. La spécificité d'hôte est observée chez les ectomycorhizes (ECM). Il semblerait que plus les plantes sont proches phylogénétiquement, plus leurs communautés sont similaires (Tedersoo *et al.* 2012; Tedersoo *et al.* 2013). Ces observations mettent en exergue le rôle de la diversité phylogénétique végétale comme support à la diversité fongique. La spécificité des ECM vis à vis d'un hôte est cependant variable, plus forte dans les écosystèmes tempérés que tropicaux (Tedersoo *et al.* 2012), le dernier biome étant dominé par les endomycorhizes à arbuscules (AMF) (Allen 1995). Toutefois, cette spécificité d'hôte n'est pas généralisée. Dans l'arctique, la capacité des plantes à s'associer à n'importe quel champignon mycorhizien serait une adaptation et

une stratégie de survie dans ces environnements aux forts stress abiotiques (froid, limitation en nutriments, Botnen *et al.* 2014). Des suivis de racines de mêmes plantes dans différents milieux, ou espacées géographiquement, ont montré que l'association entre une espèce hôte et une espèce microbienne est rarement obligatoire à la fois dans les écosystèmes tropicaux (Allen *et al.* 1995) et les écosystèmes arctico-alpins (Gardes & Dahlberg 1996), ce qui montre une influence forte du contexte abiotique sur l'association entre une plante et les champignons associés (Allen *et al.* 1995). Une corrélation entre la richesse bactérienne et la richesse spécifique végétale a été observée (Kowalchuk *et al.* 2002). Cependant cette relation n'est pas toujours validée. Pour les champignons, le nombre d'OTUs fongiques n'est pas corrélé au nombre d'espèces végétales mais à la productivité du milieu (Figure 0.19; Waldrop *et al.* 2006), pointant un lien fort entre diversité et fonctionnement des écosystèmes. De la même manière, une seule espèce d'arbre peut entraîner une forte variation de composition des communautés microbiennes, créant un milieu plus hétérogène par sa présence qu'une pelouse diversifiée (Hooper *et al.* 2000). Ces observations posent la question de la modification environnementale par la plante, de sa capacité à augmenter l'hétérogénéité environnementale. Ce point est abordé dans le Chapitre I. Ces observations mettent en exergue le rôle de la diversité fonctionnelle végétale comme support à la diversité fongique.

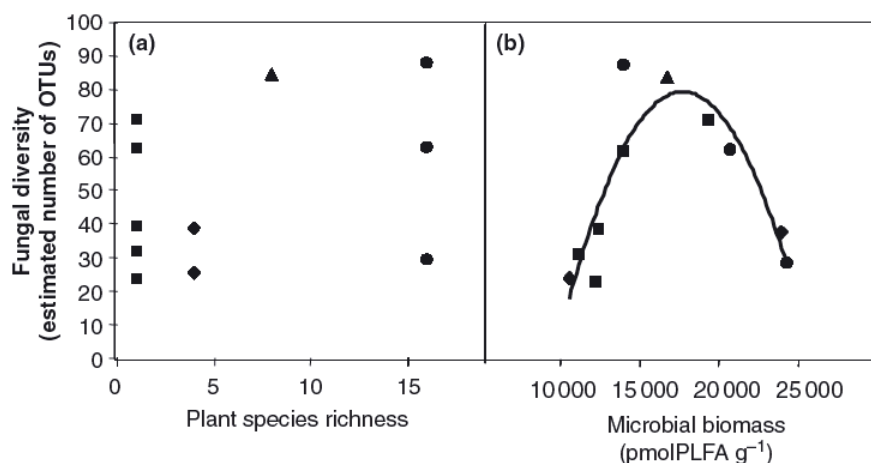


Figure 0.19. Lien entre la diversité fongique, la diversité végétale et la productivité du milieu. La diversité spécifique en champignons ne semble pas corrélée à la diversité spécifique en plante mais est corrélée à la biomasse microbienne, un proxy de la production du milieu. D'après Waldrop *et al.* 2006.

Le contexte abiotique est confondant de l'effet plante dans les études de terrain car la plante (l'hôte) est souvent inféodée à un milieu. A ce jour, des différences d'assemblages mycorhiziens et autres endophytes sont observées pour une même espèce poussant dans une prairie subalpine fertilisée ou non (Mouhamadou *et al.* 2011).

Les communautés bactériennes associées au fraisier sont similaires entre elles mais tendent à se différencier selon la localisation géographique (Costa *et al.* 2006) en accord avec les prédictions de la bigéographie (Martiny *et al.* 2006). Récemment, il a été montré que les communautés bactériennes associées à *Lolium perenne* se différenciaient selon la distance géographique séparant les plantes, alors que les communautés de sol ne reflétaient les caractéristiques du sol (Hovatter *et al.* 2011). Plusieurs études ont mis en évidence un effet de l'identité de la plante hôte supérieur à l'effet de l'environnement dans lequel poussent les plantes dans la structuration des communautés fongiques (Becklin *et al.* 2012; Zinger *et al.* 2011b) mais les bactéries semblent liées aux interactions végétation/caractéristiques abiotiques du sol (Zinger *et al.* 2011b).

2.3. Lien avec le fonctionnement de l'écosystème

Les caractéristiques éco-physiologiques des plantes co-varient avec l'environnement. A l'échelle de la communauté, ces relations environnement-végétation vont influencer le fonctionnement de l'écosystème à travers le compartiment microbien (Figure 0.20).

Un exemple : le cas des écosystèmes subalpins

A l'étage subalpin, les communautés de plantes établies sur roche mère siliceuse ou calcaire vont varier en composition. Ces variations de composition liées au milieu covariant avec des changements de traits portés par les espèces dominantes, avec notamment des buissons dans les communautés sur sol acide et des herbes dans les communautés à sol basique. Ces différences de végétation et intrinsèquement de traits fonctionnels entraînent de fortes variations dans la qualité de matière organique, difficile à dégrader dans le cas des buissons, ce qui a un fort impact sur la diversité microbienne du sol (Eskelinen *et al.* 2009). On observe une dominance des bactéries dans les sols des prairies à herbes et des champignons dans les sols de landes à buissons. Ces relations sont ultimement liées au pH du sol, par des effets directs et indirects, le pH du sol étant d'autant plus acide que la matière organique n'est pas dégradée (ou lentement) (Eskelinen *et al.* 2009). Les liens entre végétation, environnement et fonctionnement de l'écosystème sont illustrés dans la Figure 0.21. Ces interactions sont également très bien illustrées par le changement de composition fongique et bactérienne entre des sols de crêtes dominés par une végétation à croissance lente (milieu stressant) et les sols de combes à neiges dominés par une

végétation à croissance rapide qui entraînent de fortes variations dans le contenu en matière organique des sols (Zinger *et al.* 2009b).

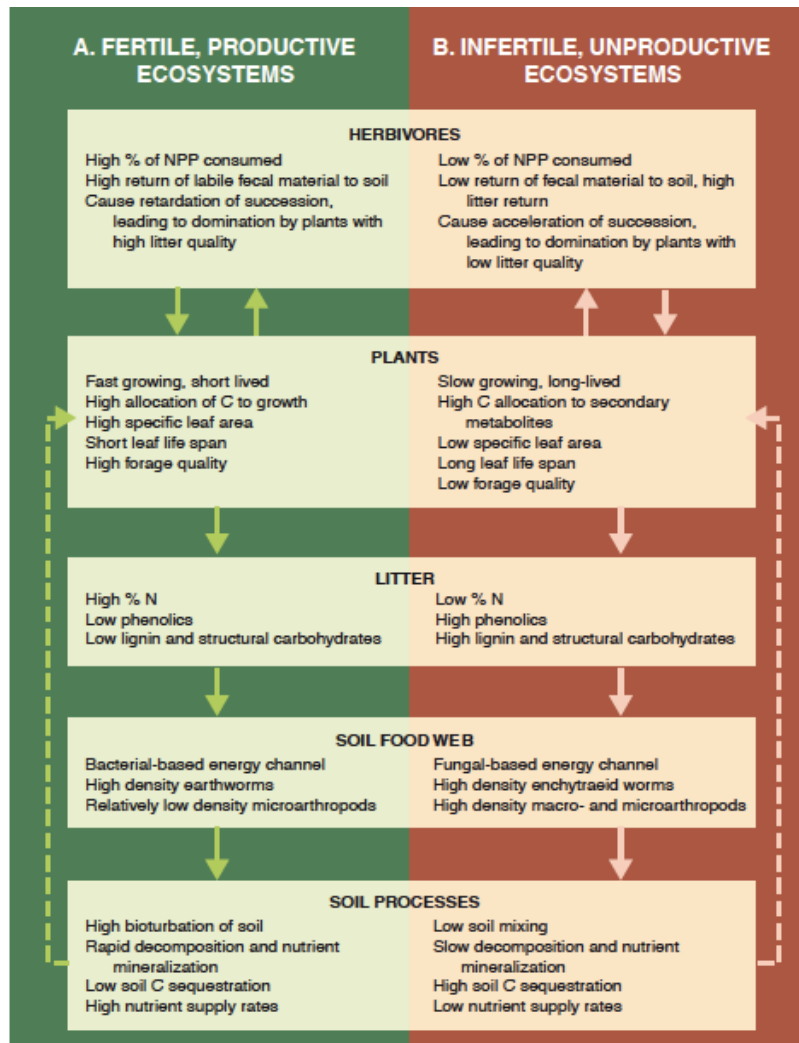


Figure 0.20. Les traits des espèces dominantes structurant les communautés végétales influence le fonctionnement du sol à travers les microorganismes.

Les espèces des systèmes fertiles ont une croissance rapide et une matière organique facilement dégradée, favorisant les bactéries. L'herbivorie est plus forte à l'encontre de ces espèces. Le renouvellement des nutriments est rapide. A l'inverse, les espèces des systèmes pauvres ont une croissance lente et une matière organique récalcitrante, principalement dégradée par les champignons. Les cycles des nutriments sont lents. En retour, les liens entre le compartiment aérien et souterrain influencent la communauté végétale sus-jacente. Source Wardle *et al.* 2004.

Les interactions plantes-microorganismes sont majoritairement de types nutritives. Les microorganismes entretiennent également des interactions de types « non-nutritives » avec les plantes. Les plantes et les microorganismes sont aussi en compétition pour les mêmes ressources. A l'étage alpin, l'azote est une ressource limitante pour la croissance des organismes (Körner 2003). Dans cet écosystème aux fortes contraintes abiotiques, les microorganismes séquestrent les nutriments pour leur croissance/biomasse (rétention) ce qui pourrait être à l'origine de la limite altitudinale supérieure de la forêt (Annexe 1). Ces effets mènent à une corrélation entre le couvert végétal et la microflore du sol.

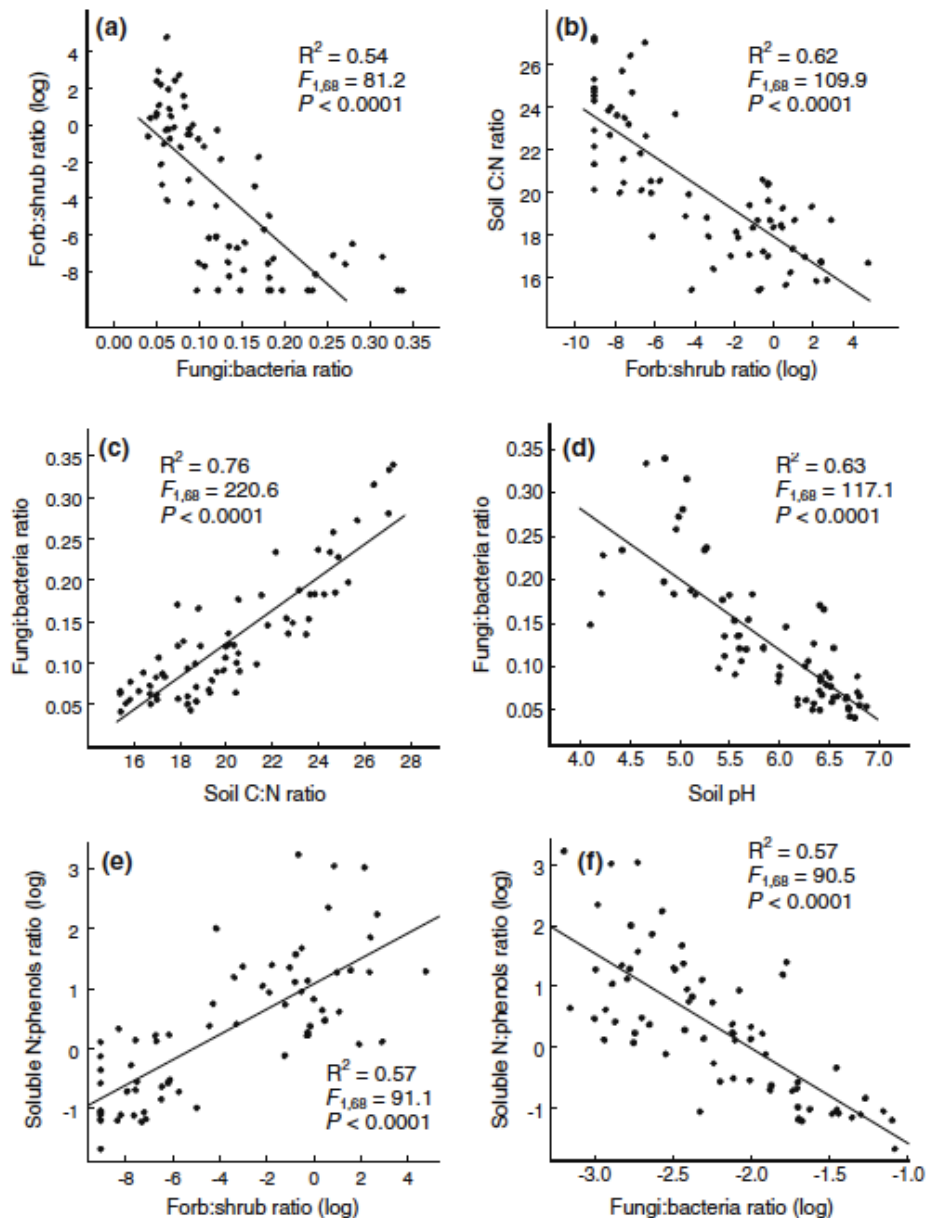


Figure 0.21. Lien entre composition des communautés végétales, qualité de la matière organique et composition des communautés microbiennes. Le rapport C:N est un proxy de la qualité de la matière organique, des valeurs élevées indiquant une faible qualité (difficilement dégradable). La quantité d'azote soluble sur la quantité de phénols est également un proxy de la qualité de la matière organique. Un rapport élevé indique une bonne qualité. *Source Eskelinen et al. 2009.*

Pour finir, l'interaction entre deux organismes peut varier dans l'espace et au cours du temps suivant les conditions abiotiques/biotiques et le développement des organismes. Ceci est notamment observé chez les mycorhizes où la réponse de la plante varie en fonction du groupe fonctionnel végétal, du groupe fonctionnel fongique, de la complexité biotique du milieu et du contexte abiotique comme la limitation en azote ou en phosphore (Hoeksema *et al.* 2010). Également, les communautés bactériennes et

fongiques associées varient au cours du développement des plantes et de la saison (Mougel *et al.* 2006; Zinger *et al.* 2009b).

L'intrication des différents facteurs biotiques et abiotiques est difficile à démêler et il semble que la plante et le type de sol structurent les communautés microbiennes (Berg & Smalla 2009). La végétation entretient des interactions complexes avec les microorganismes du sol qui en retour, par leur activité de dégradation de la matière (minéralisation/rétention) et d'interaction directes (parasite/mutualiste) vont affecter la dynamique de la végétation sus-jacente (van der Heijden *et al.* 2008). La caractérisation de la diversité microbienne et des facteurs qui l'organise est donc essentielle pour prétendre à comprendre la réponse des écosystèmes dans un contexte de changement globaux (climatiques, utilisation des terres). Il est primordial de découpler les effets abiotiques des effets biotiques.

IV. Méthodes de caractérisation des communautés microbiennes

1. Caractérisation d'une communauté microbienne

Il existe plusieurs caractéristiques mesurables d'une communauté. Elles se divisent en deux parties : les caractéristiques phylogénétiques et les caractéristiques fonctionnelles, qui vont renseigner sur la structure et le fonctionnement de la communauté, ainsi que l'état écologique d'un système (indicateurs). Certaines fois, des informations phylogénétiques informent sur la fonction de la communauté.

La structure d'une communauté correspond à son nombre d'espèces (richesse), l'identité de ces espèces (composition) et leur abondance relative dans la communauté (diversité). Elle s'étend aussi aux relations phylogénétiques entre les espèces qui composent la communauté, c'est à dire si elles sont plus phylogénétiquement proches ou plus éloignées entre elles que ce qui est attendu par hasard. La composition en espèces, leur abondance et les liens phylogénétiques renseignent sur les processus d'assemblages des communautés. Ces caractéristiques peuvent être un indicateur du fonctionnement du sol si l'on connaît le rôle des espèces identifiées dans les chaînes trophiques, leur mode de vie ou encore leur stratégie écologique.

D'un point de vue fonctionnel, une communauté microbienne se caractérise par sa biomasse, les fonctions exprimées et leur diversité, les produits de ces fonctions, et les flux de matières. La biomasse renseigne sur la productivité de l'écosystème. De plus, elle constitue un réservoir de matière organique. Une caractéristique particulièrement intéressante concernant la biomasse est le rapport de biomasse champignons/bactéries, à l'interface entre information sur la structure de la communauté et sur son fonctionnement. Les systèmes (sol) fertiles sont dominés par les bactéries alors que les systèmes contraints et pauvres sont dominés par les champignons. Il constitue de ce fait un indicateur important du fonctionnement du sol. Les fonctions exprimées par la communauté sont une étape de plus vers la compréhension du fonctionnement du sol. Ces fonctions sont caractérisées par les gènes fonctionnels, ceux exprimés (ARN messagers) et les produits de leurs activités (métabolites). La reconstruction de « méta-voies » métaboliques à partir du méta-transcriptome peut donner des indications sur l'utilisation des ressources (carbonées ou

azotées). Par exemple, l'utilisation du carbone diffère entre les communautés des combes à neiges de celles des crêtes ventées à l'étage alpin (travail en développement au LECA par Jean-Marc Bonneville et Roberto Geremia). Le carbone est utilisé pour la croissance et la division cellulaire dans les combes alors qu'il est utilisé pour des réponses au stress en situation de crêtes. Enfin, des mesures de flux de matière comme la part de carbone (ou azote) inorganique et microbien renseignent sur la compétition des microbes vis à vis des plantes. D'autres exemples de mesures de flux de matières incluent les mesures de respiration (dégagement de CO₂) par exemple.

Un grand nombre de méthodes permet de caractériser les communautés microbiennes. Cette thèse s'intéresse à la structure des communautés microbiennes. Nous nous focaliserons donc sur les techniques permettant de caractériser la diversité en espèces des communautés.

2. Les outils et méthodes de caractérisation des communautés microbiennes

2.1. Les méthodes traditionnelles et bas débit

L'appréhension de la composition des communautés microbiennes (procaryotes, eucaryotes -avec les microeucaryotes et les champignons macromycètes) peut se faire à partir de la caractérisation morphologique des individus. Elle s'est fait traditionnellement par la caractérisation morphologique in situ, restreinte sur le terrain pour les champignons aux macromycètes ou fructifiants et par une étape de culture des organismes microscopiques. L'analyse microscopique directe des mycéliums associés aux racines de plantes pour identifier des mycorhizes est possible également, tout comme la caractérisation des spores ou des organes les contenant (e.g. Ascomycètes, Basidiomycètes). La composition des communautés de bactéries et de champignons a longtemps été caractérisée par culture et isolement de souches sur différents milieux nutritifs. L'identification des souches se fait alors sur des critères encore une fois morphologiques (formes des cellules, des colonies, des hyphes des organes de reproduction..) avec l'aide de la microscopie qui peuvent être complétées par des analyses biochimiques (test de Gram, e.g. bactérie Gram+ et Gram-,...). Cependant, avec l'avènement des méthodes moléculaires, il est reconnu que seulement 1% des microorganismes sont cultivés. La part cultivable est plus difficile à estimer, et des efforts de cultures doivent être faits, notamment en essayant plusieurs conditions environnementales (type de milieu, ressources ou interaction avec d'autres

organismes). Par exemple, des études de co-occurrence entre microorganismes basées sur des approches de caractérisation moléculaire de la diversité ont mis en évidence des relations étroites entre eux et ont permis la culture de microorganismes grâce à la présence d'espèces clé de voûtes (Duran-Pinedo *et al.* 2011). Malgré un accès limité à la diversité microbienne par la culture, elle permet une caractérisation phénotypique des organismes, un point vivement défendu pour caractériser la diversité microbienne (Fenchel & Finlay. 2006).

Certaines méthodes permettent d'observer *in situ* les microorganismes et leur distribution spatiale à l'échelle microscopique comme la coloration au DAPI ou encore l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Cette dernière technique reposant aujourd'hui sur l'hybridation à des gènes spécifiques permet d'observer la distribution (échelle microscopique) du microorganisme ciblé mais est difficilement généralisable à l'ensemble de la communauté, chaque puce ADN étant dessinée pour un groupe.

2.2. Les méthodes moléculaires haut débit

L'étude des communautés requiert un outil haut débit. Les premières méthodes moléculaires développées se sont basées sur la composition en acides gras phospholipidiques des membranes des microorganismes, spécifiques de certains taxons, pour caractériser la composition d'une communauté (PLFA). Les PLFA sont intéressants car ils apportent une idée de la composition en parallèle d'une estimation de la biomasse et la possibilité de calculer un rapport de biomasse champignons/bactéries, mais la méthode n'est pas résolutive, surtout pour les champignons.

Les avancées en biologie moléculaire ont permis le développement de méthodes basées sur l'ADN appliquées à l'étude des communautés microbiennes. Les approches moléculaires sont principalement basées sur la possibilité de discriminer et de faire des liens de parenté entre des individus appartenant à des taxons différents à partir d'un fragment d'ADN, codant ou non, les marqueurs moléculaires (Figure 0.22). Ces méthodes reposent sur la technique de PCR permettant d'amplifier de manière préférentielle le gène que l'on souhaite suivre du fait de i) une quantité d'ADN inférieure au seuil de détection et ii) un mélange complexe d'ADN de génomes d'individus appartenant à des taxons divers. Un marqueur moléculaire en écologie des communautés doit donc être une région d'ADN avec un bon pouvoir résolutif taxonomique (différencier des individus d'espèces différentes mais appartenant au

même genre par exemple) et être flanquée de régions conservées permettant l'amplification du marqueur pour un maximum de taxons.

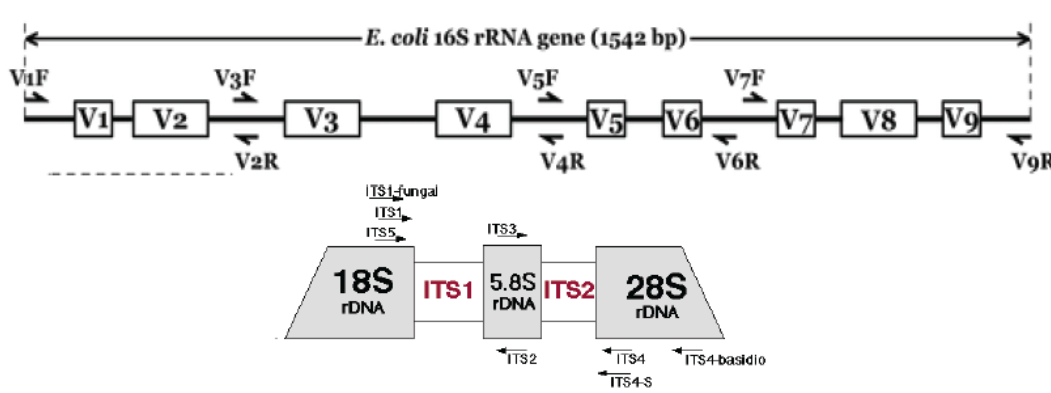


Figure 0.22. Marqueurs moléculaires (A) bactérien (gène ARNr 16S) et (B) fongique (ITS) et amorces permettant de les amplifier. Un marqueur moléculaire doit être résolusif pour discriminer les espèces, avoir des régions conservées pour l'amplification d'un maximum de taxons, et relativement court du fait i) que l'ADN est dégradé dans les matrices environnementales et ii) que le séquençage est limité à 450 bp pour le 454 et 2x250 bp pour l'Illumina (paired-end) à la date d'écriture du présent manuscrit.

Jusque récemment, les communautés étaient caractérisées par empreintes moléculaires, des techniques basées sur celle de l'électrophorèse. Selon le polymorphisme de taille (ARISA -restreint à l'ITS-, T-RFLP, FLA) et de conformation des marqueurs moléculaires (SSCP, DGGE), les différents brins d'ADN migrent à des vitesses différentes résultant en un profil moléculaire caractérisant la composition et l'abondance des phylotypes (un type phylogénétique, défini à partir d'un marqueur moléculaire) dans la communauté. L'étude du chapitre I utilise une méthode d'empreinte moléculaire, la SSCP, développée au laboratoire pour l'étude d'échantillons environnementaux (Zinger *et al.* 2008).

Le séquençage des marqueurs moléculaires permet une analyse plus fine des communautés microbiennes. Le séquençage à l'origine ne pouvait se faire sur un mélange complexe de molécules d'ADN. Il fallait passer par une étape d'isolement des brins d'ADN par clonage dans des cellules bactériennes. La diversité microbienne étant très grande, le nombre de clones générés ne permettait pas une estimation précise de la diversité microbienne. Aujourd'hui, il est possible de séquencer des mélanges complexes de molécules d'ADN grâce aux nouvelles techniques de séquençage comme le pyroséquençage (Margulies *et al.* 2005) ou le séquençage Illumina (Bentley *et al.* 2008). Ces techniques sont une révolution pour l'étude des communautés et ont révélé l'immense diversité microbienne et leur structuration spatiale (Roesch *et al.* 2007). Son

utilisation est facilitée par la possibilité de séquencer l'ADN de plusieurs échantillons en même temps (Binladen *et al.* 2007). L'augmentation des profondeurs de séquençage ne permet cependant toujours pas d'accéder à la totalité de la diversité d'un échantillon environnemental, bien que cela puisse être causé par les erreurs de PCR et de séquençage. L'ensemble de ces méthodes ne permet pas non plus d'accéder à la part active de la diversité.

2.3. Comment traiter les données de séquençage : quelles méthodes pour quels objectifs ?

La quantité de séquences générées par le séquençage massif a demandé un développement important des méthodes informatiques pour la « cuisine » de base (trier les séquences par échantillons, enlever les amorces, inverser les séquences reverse...). Il existe plusieurs plateformes d'analyses bioinformatiques (QIIME (Caporaso *et al.* 2010), MOTHUR (Schloss *et al.* 2009)), qui ne seront pas décrites dans le manuscrit. Ce travail de thèse ne repose sur l'utilisation que d'une seule, les OBITools, développés au LECA par Eric Coissac et son équipe.

Les deux points les plus importants sont le développement des méthodes d'alignement pour comparer les séquences (obtenir une similarité) et le clustering des séquences en OTUs. L'alignement est utilisé i) pour comparer les séquences entre elles avant de les regrouper sur la base de leur similarité (i.e. former des MOTUs) et ii) pour l'assignation taxonomique des séquences.

Alignement. Le but d'un alignement est de retrouver des régions de similarité entre séquences. Le principe est de maximiser le nombre de concordances de caractères (nucléotides ou acides aminés). Pour cela, il y peut y avoir l'insertion de brèches, correspondant à des événements d'insertion ou de délétion (indels) de caractères. Il est possible que deux caractères différents soit alignés ensemble mettant en évidence potentiellement un événement de mutation. Un poids spécifique est donné à une concordance de caractères, une brèche, ou une non-concordance des caractères. Le poids choisi relève d'un modèle évolutif. Un alignement raconte une histoire évolutive et les hypothèses peuvent changer suivant les gènes étudiés.

On distingue deux types d'alignements (Figure 0.23). Les alignements globaux basés sur l'alignement de la totalité de la séquence, et les alignements locaux d'une région d'une séquence sur une autre séquenc. Un alignement local permet de trouver des régions de similarités entre deux séquences. Il est utile pour les assignations

taxonomiques, fonctionnelles ou retrouver des régions de fortes similarités, homologues, afin de mettre en évidence des domaines et donc des fonctions conservés entre plusieurs organismes. Il n'est cependant pas adapté pour comparer des séquences entre elles que l'on souhaite par la suite regrouper en OTUs car il est possible de trouver des régions d'ADN très conservées entre organismes distants, qui ne partagent pas la même séquence totale. Comparer des séquences entre elles pour former des OTUS requiert un alignement global. Les alignements globaux sont utiles pour les assignations taxonomiques également. On distingue ensuite les alignement multiples des alignements par paires (deux à deux). L'alignement multiple permet d'aligner plusieurs séquences simultanément et d'établir des phylogénies ou de retrouver des régions conservées entre toutes les séquences mettant en évidence une pression évolutive sur ce domaine. Il est rapide mais n'est pas adapté aux marqueurs qui évoluent rapidement comme l'ITS qui ne contient pas d'information phylogénétique et qui ont un fort polymorphisme de taille. Les alignements sont généralement mauvais avec ce type de marqueurs menant à l'inclusion de grandes régions de brèches. Les alignements par paire permettent quant à eux d'avoir un score de similarité entre toutes les séquences dont le résultat n'est pas dépendant de l'alignement des séquences précédentes. L'alignement deux à deux est nécessaire pour former des MOTUs.

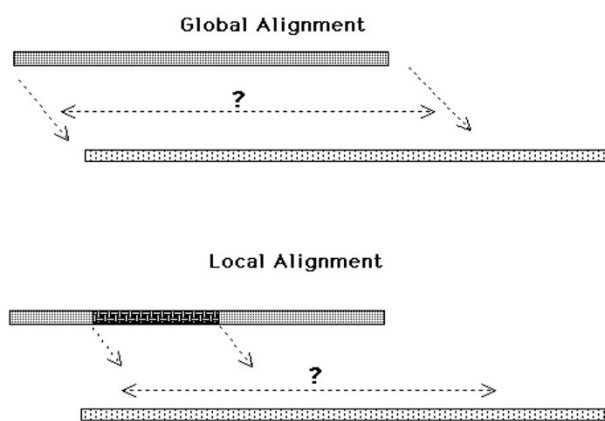


Figure 0.23. Principe d'un alignement global et local. L'alignement global commence au début d'une séquence (Needleman and Wunsch). Il ajoute des gaps jusqu'à la fin d'une des séquences plus courte. Si cette séquence est plus courte et partielle du fait du séquençage (454), il existe des variantes dont le coût des gaps de fin est nul (Free End Gap, développé au LECA par Eric Coissac). L'alignement local trouve la ou les régions les plus similaires (Smith and Waterman).

Clustering. Le clustering des séquences en OTUs est une étape cruciale pour appréhender la composition des communautés microbiennes. Ce clustering est nécessaire pour i) réduire la complexité du jeu de données, ii) regrouper des variants génétiques dans la même pseudo-espèce et iii) lisser le bruit introduit par les erreurs, de

PCR notamment. Il existe plusieurs méthodes de clustering. Le clustering supervisé est basé sur une connaissance a priori de la taxonomie. Cependant, les bases de données étant incomplètes, cette approche ne peut être utilisée. Le clustering non supervisé ne repose sur aucun a priori. Le clustering non supervisé est une partition de graphe où le graphe représente la matrice de distance entre toutes les séquences deux à deux. Les séquences constituent les nœuds et la similarité les arêtes. Les méthodes les plus classiques de partitions reposent sur des méthodes algébriques, i.e. le « single linkage » et le « complet linkage » consistant à regrouper une séquence ou un cluster avec le voisin le plus proche/similaire (single linkage) ou le plus proche des plus éloignés (« complet linkage »). Alors que la méthode de « single linkage » est une vraie partition le « complet linkage » repose sur le concept de clique maximal, où plusieurs séquences peuvent se retrouver dans le même cluster. De l'autre côté, le « single linkage » ne parvient pas à séparer des clusters connectés par un ou deux nœuds, c'est l'effet de chainage. Une alternative à ces méthodes est basée sur la topologie du graphe, c'est une méthode graphique (Figure 0.24). Le clustering MCL est basé sur la théorie des graphes et recherche un sous graphe de nœuds interconnectés, i.e. une composante connexe. Comme le clustering single linkage, c'est une vraie partition. Dans cette thèse nous sommes principalement intéressés à la composition des communautés. Notre objectif était de discriminer les taxons les uns des autres sans forcément avoir une idée des liens de parenté entre eux. Le clustering MCL est une bonne approche pour les questions de composition taxonomique/spécifique des communautés. Nous discutons tout de même les liens que nous pouvons faire avec la phylogénie.

Pour former des MOTUs avec des approches ne reposant pas sur les phylogénies, il convient de fixer un seuil de similarité pour regrouper les séquences. Pour les bactéries, le seuil de divergence inférieur à 3% pour regrouper les séquences de l'ARNr 16S est largement accepté (voir « Les différents concepts pour définir et caractériser une espèce »). Il est utilisé dans l'ensemble des études de diversité microbienne visant à caractériser les communautés par séquençage de l'ARNr 16S (voir Chapitres III et IV), bien que différentes régions de l'ARNr 16S aux caractéristiques évolutives différentes soient utilisées selon les études (voir « Limites des approches moléculaires »). Ce seuil peut de plus être mis en doute car il a été suggéré que la diversité en MOTUs définis à 99% pouvaient avoir un sens biologique et correspondre aux écotypes (Acinas *et al.* 2004; Cohan 2002b). Cette étude montre également une explosion de la diversité au

dessus du seuil de 99% qui pourrait correspondre à la diversité intra écotype non purgée (Acinas *et al.* 2004).

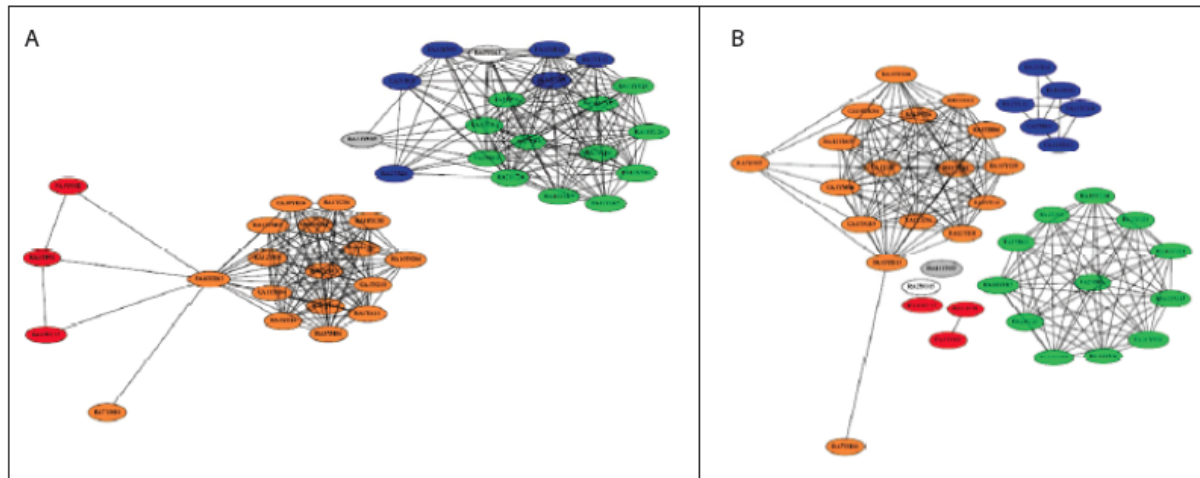


Figure 0.24. Supériorité des méthodes basées sur la théorie des graphes aux méthodes algébriques dans la définition des MOTUs. Graphe pondéré non dirigé montrant le résultat de clustering de séquences par (A) Ccomps, une méthode algébrique de simple lien et (B) MCL, une méthode basée sur la théorie des grappes qui recherche des composantes connexes. Chaque nœud représente une séquence et chaque arête une similarité égale ou supérieure à 98% entre deux séquences. Les couleurs indiquent les clusters formés par Ccomps et MCL. *Source Zinger et al. 2009b.*

Pour les champignons, il n’y a pas d’étude qui soit conduite à ce jour du type de ce qui a été fait pour les bactéries reliant morphologie des souches et similarité génomique. Basé sur la divergence de l’ITS1, plusieurs études ont montré une explosion de la diversité en MOTUs au dessus de 98% (Lentendu *et al.* 2011). Cette diversité peut être réelle ou artificielle. Elle peut représenter la diversité intraspécifique non purgée, issue de la dérive génétique ou être issue des erreurs de réplication de l’ADN lors de la PCR ou du séquençage. Ce seuil de 98% que nous (voir chapitre II) et d’autres études utilisons est cohérent avec la variabilité intraspécifique de 2,51% (moyenne pondérée) de l’ITS1 et avec les 1,96% de variabilité intraspécifique pour l’ITS des Ascomycètes (Nilsson *et al.* 2008).

Ces seuils ne représentent pas une réalité biologique et ne sont pas généralisables à l’ensemble du règne, notamment pour les Champignons (Blaalid *et al.* 2013; Nilsson *et al.* 2008). Une définition plus fine des MOTUs est encore peu applicable à l’échelle de la communauté, et le seuil de 98% pour les champignons est un consensus pertinent.

Enfin, certains programmes cherchent à identifier les erreurs de PCR, que ce soit les erreurs de réplifications ou les formations de chimères. Ces erreurs sont stochastiques

et indépendantes à chaque PCR. Il existe le DENOISER, implémenté dans QIIME. Il est basé sur un modèle issu de l'analyse d'un seul jeu de données, provenant d'un séquençage 454 mais son fonctionnement reste obscur. Cela pose la question de la fiabilité de ce modèle pour les jeux de données provenant d'un séquençage Illumina ou tout simplement d'autres PCRs. Les OBITools ont eux aussi leur programme de recherche d'erreurs, *obiclean*. Il se base sur la position des séquences dans le réseau de similarités en prenant également en compte l'abondance des séquences dans la structure topographique du réseau (le graphe). Une « vraie » séquence aura une position de tête, les erreurs qui en découlent étant moins abondantes. Ce programme exclue la possibilité de variabilité génétique intraspécifique et n'a peut-être un sens que pour les marqueurs codants. De plus, l'erreur provient d'une vraie séquence. Posons que deux séquences soient en proportion identiques mais que l'une subit une erreur lors de sa réplication. Ne pas prendre en compte les erreurs provenant de cette séquence biaise le nombre de lectures de cette espèce. La question du traitement des erreurs de PCR est complexe. Inclure des réplicats techniques et biologiques est une nécessité pour tirer une conclusion biologique par des méthodes statistiques. Passer par une étape de formation de MOTUs permet également de lisser les données.

2.4. Limites des approches moléculaires

Ces techniques sont soumises aux biais de PCR et de choix de marqueurs (Box 7).

Les biais de PCR sont de nature multiple. L'ADN polymérase introduit des erreurs lors de la réplication des fragments, erreurs qui se propagent et peuvent s'accumuler. Elles influent sur l'estimation de la diversité (Qiu *et al.* 2001). Certaines enzymes sont plus fidèles que d'autres (Gury *et al.* 2008; Qiu *et al.* 2001) mais ces erreurs restent stochastiques, indépendantes d'une réaction de PCR à l'autre et sont difficiles à prendre en compte. L'ADN polymérase ajoute des bases adénine en fin de synthèse du brin d'ADN. Cette modification de taille aléatoire est critique pour les études d'empreinte moléculaire basées sur l'électrophorèse mais aussi pour la création des OTUs.

Box 7. Les marqueurs moléculaires

Les différences de marqueurs moléculaires entre bactéries et champignons.

L'étude de la diversité en espèces des microorganismes repose principalement sur les gènes ribosomaux. Ils permettent une discrimination sur une base taxonomique des individus composant les communautés. Tout autre gène peut cependant être utilisé, notamment des gènes fonctionnels. L'étude des procaryotes se base généralement sur le gène de l'ARNr 16S. Le gène de l'ARNr 16S est résolutif d'un point de vue taxonomique. Ce gène est codant, subit une pression de sélection sur sa conformation. La conformation dépendant de la séquence protéique, le gène ne varie qu'en composition et non en taille (Figure B7 A). Il peut être aligné par alignements multiples qui permettent d'établir des liens phylogénétiques entre les organismes. L'étude des eucaryotes se base quant à elle sur les gènes de l'ARNr 18S, 28S ou de l'ITS. Les marqueurs 18S et 28S permettent de la même manière que le 16S pour les procaryotes d'établir des liens phylogénétiques entre organismes eucaryotes. Cependant il est peu résolutif d'un point de vue taxonomique. Ainsi, l'étude de l'ITS est préférée dans les études d'écologie des communautés pour les champignons. L'ITS est composé de l'ITS1 et de l'ITS2 séparé par le 5.8S. L'ITS1 est considéré comme le meilleur « code-barre » ADN disponible pour identifier les champignons au niveau de l'espèce (Nilsson et al. 2009). Ce marqueur est un intron épissé au moment de la transcription de l'ADN en ARN. Il n'est pas codant et donc non soumis aux pressions de sélection. Il évolue rapidement et montre un fort polymorphisme de taille à la différence des marqueurs 16S, 18S et 28S (Figure B7 A). Il ne permet donc pas d'obtenir une information phylogénétique fiable entre groupes et est difficilement alignable par les algorithmes d'alignement multiples nécessaire pour établir une phylogénie. Cependant, nous pouvons penser que deux champignons ayant une séquence ITS1 très similaire seront proches phylogénétiquement (approche proposée dans l'Article II).

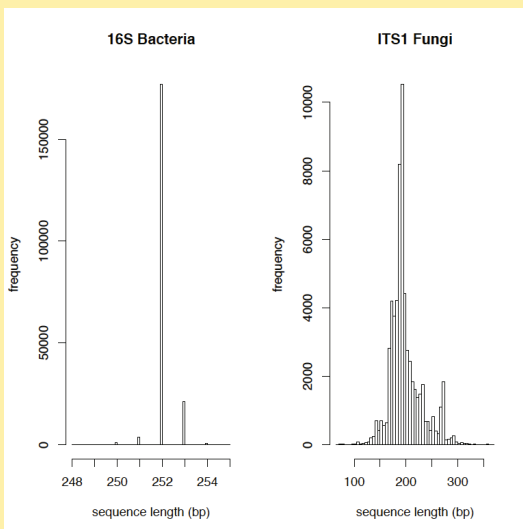


Figure B7 A. Distribution de taille observée dans cette thèse pour la région v3-v4 de l'ARNr 16S et pour la région ITS1 de l'ITS fongique.

Effet du choix des marqueurs moléculaires sur l'appréhension de la diversité.

Plusieurs marqueurs existent pour caractériser la composition d'une communauté et ces marqueurs ne contiennent pas la même information (Figure B7 B) ni le même degré d'universalité. Les gènes non codant ne permettent pas de savoir si les espèces de la communauté sont plus, ou moins, apparentées que ce qui est attendu par chance. Cette structure phylogénétique de la communauté a de fortes implications sur les mécanismes d'assemblages des espèces (Vamosi et al. 2009). L'ARNr 16S est divisé en différentes régions. Le marqueur ciblé est généralement restreint à une ou deux régions du gène. Certains marqueurs auront une bonne résolution taxonomique au niveau du genre, d'autres différencieront les espèces mais pas pour tous les genres (Chakravorty et al. 2007). Des différences de richesse absolue et relative en espèces sont observées suivant le marqueur moléculaire pour les bactéries (Venter et al. 2004), pour les différentes régions du 16S (Kumar et al. 2011) ou de l'ITS (Arfi et al. 2012; Blaallid et al. 2013). Cependant, les patrons de beta-diversité semblent conservés suivant l'utilisation de tel ou tel marqueur pour les champignons (Arfi et al. 2012; Blaallid et al. 2013).

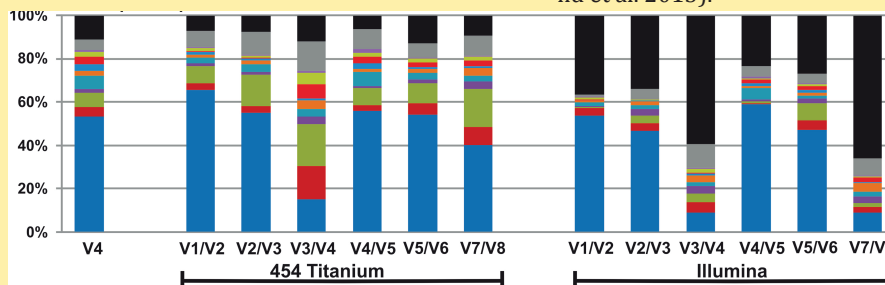


Figure B7 B. Différence de composition taxonomique d'une communauté selon le marqueur moléculaire utilisé. Cas des différentes régions de l'ARNr 16S. Chaque couleur correspond à un genre bactérien. Source (Claesson et al. 2010).

L'amplification de mélange complexe d'ADN peut mener à l'amplification préférentielle de certains fragments par rapports à d'autres (du aux caractéristiques intrinsèques des

fragments). De plus, des fragments d'ADN peuvent servir d'amorces à la polymérase pour la réplication d'un autre fragment (chimères) ou la polymérase peut changer de fragment en cours de réplication (hétéroduplexes). Cela arrive en fin de PCR lorsque les mélanges sont très concentrés en fragments synthétisés et peu en amorces et dNTP. Réduire le nombre de cycle peut diminuer ces biais. Les amorces « universelles » utilisées pour amplifier un maximum de taxons peuvent quant à elles montrer une certaine spécificité pour certains groupes qui seront préférentiellement amplifiés par rapport à d'autres (Bellemain *et al.* 2010). Les amorces couramment utilisées ne permettent pas d'amplifier les Gloméromycètes, un groupe de champignons pourtant très important d'un point de vue fonctionnel car exclusivement endomycorhiziens. C'est une limite majeure pour l'écologie des communautés des écosystèmes alpins car une part importante de plantes alpines est associée à ces champignons (Haselwandter 1987; Read & Haselwandter 1981). La région d'ADN ciblée peut être répétée plusieurs fois dans le génome et le nombre de copies diffère selon les organismes. Bien que ce soit un trait fonctionnel important (Fierer *et al.* 2007; Green *et al.* 2008), renseignant notamment sur les capacités de division de l'organisme (gènes ribosomiaux) ou de dégradation d'un substrat (gène codant une enzyme de dégradation par exemple), cette variation entraîne un biais dans l'estimation de l'abondance des taxons dans une communauté. De plus, les transferts de gènes entre microorganismes ne sont pas restreints aux gènes fonctionnels. En effet, des transferts horizontaux d'ARNr 18S sont observés ce qui est de première importance pour l'écologie des communautés microbiennes eucaryotes (Yabuki *et al.* 2014), mais aussi procaryotes.

Bien que le séquençage d'amplicons ait révolutionné la caractérisation des communautés microbiennes, son utilisation reste limitée à cette application. Il n'y a pas de lien direct entre la biomasse de l'individu et le nombre de séquences ADN qui lui est attribué, et le lien avec le nombre d'individus est difficile du fait de l'amplification de l'ADN et des biais associés. Ces méthodes sont semi-quantitatives dans une certaine mesure. Il est possible de savoir si un taxon est relativement plus abondant dans une communauté qu'une autre et il n'est possible de connaître l'abondance absolue des taxons. Du fait des biais évoqués, des études mettent en doute l'analyse des abondances relatives inter-taxons au sein d'une communauté mais indique que la comparaison intra-taxon des abondances relatives entre communautés est valide (Amend *et al.* 2010). Il existe des différences entre méthodes de séquençage haut-débit (Claesson *et al.* 2010).

L'approche séquençage haut débit donne accès à un nom mais non à de fonctions. Les bases de données nécessaires à l'assignation taxonomique sont fortement incomplètes, peu de microorganismes étant caractérisés, identifiés et séquencés, entraînant des biais dans les assignations taxonomiques (Figure 0.25). De plus les caractéristiques écologiques des microorganismes, notamment des champignons, sont très peu connues. Si un OTU ITS1 est assigné à un champignon mutualiste, il n'est pas démontré que c'est ce champignon qui est présent et quand bien même sa présence est avérée, est-il associé aux racines, et si oui faut-il encore avoir une idée des coûts et bénéfices de cette association pour la plante à ce moment donné.

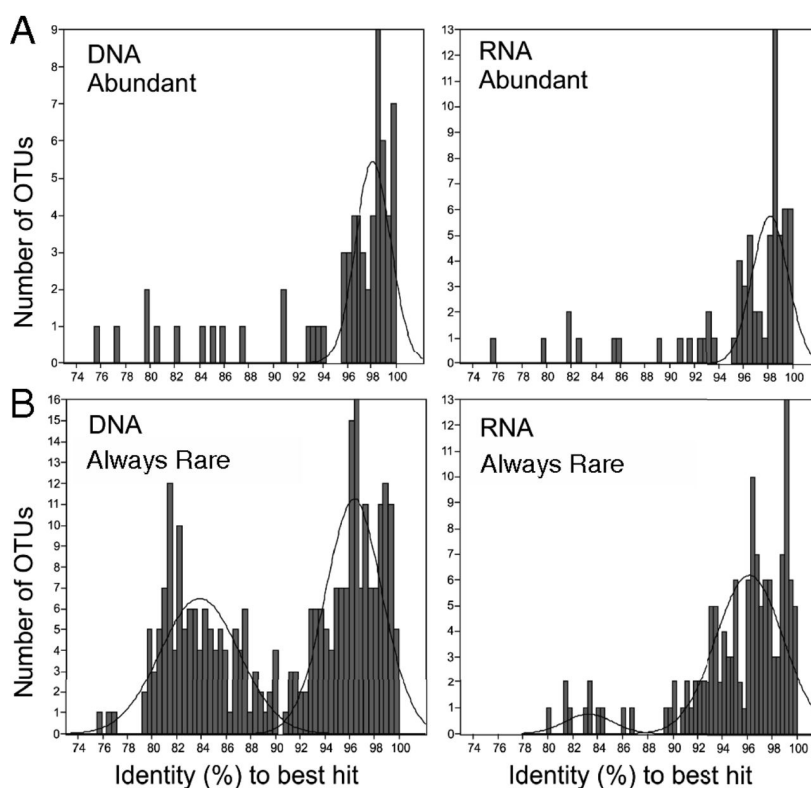


Figure 0.25. Distribution du pourcentage d'identité entre une séquence d'un échantillon et celles déjà présentes dans une base de données. (A) Pour les séquences abondantes et (B) pour les séquences rares (Archaébactéries). Base de données SILVA. Source Hugoni et al. 2013.

Les approches fonctionnelles des communautés sont mieux abordées par les approches méta-omiques, comme la méta-génomique et la méta-transcriptomique. L'ensemble des gènes fonctionnels et ribosomaux sont séquencés de façon non dirigée. Ces méthodes offrent de grandes perspectives en écologie microbienne avec à la fois un accès à la composition taxonomique et fonctionnelle des communautés. La méta-génomique n'est à l'origine pas soumise aux biais de PCR car l'ADN est séquencé directement. La surabondance des gènes ribosomaux dans un premier temps et des gènes bactériens dans un second temps demande des développements et une préparation importante en laboratoire pour l'étude fonctionnelle, notamment des

eucaryotes, qui requiert une étape de PCR. La méta-transcriptomique repose obligatoirement sur une PCR car n'est séquencé que l'ADN (rétrotranscriptase PCR pour généré des fragments d'ADN à partir des fragments d'ARN). Ces méthodes s'affranchissent du biais des amorces « universelles » et permettent de retrouver des groupes non amplifiés par PCR par les approches marqueurs moléculaires (typiquement le cas des Glomeromycètes). Toutes ces méthodes sont soumises aux mêmes biais, l'extraction d'ADN n'étant pas exhaustive.

Ces nouvelles méthodes moléculaires ont entraîné un changement radical dans l'analyse des données étant donné l'acquisition de grands jeux de données, ayant demandé un développement important des méthodes, notamment l'analyse informatique (semi) automatisées des données, et des analyses statistiques par des approches de méthodes multivariées. L'apport du séquençage a permis également d'avoir des données de distribution par « espèce » qu'il est possible alors de modéliser par les modèles de distribution d'espèces.

3. Stratégies d'échantillonnage

Le protocole d'échantillonnage est particulièrement important dans la caractérisation des communautés microbiennes et dans la description des patrons de diversité (notamment de beta diversité). Les microorganismes sont très diversifiés, il existe une relation aire-espèce et leur distribution varie à plusieurs échelles spatiales. Obtenir une liste exhaustive des organismes présents est extrêmement difficile. La variabilité intra-sites (ou intra conditions environnementales) peut diminuer l'effet inter-sites. Les tests sur cette variabilité intra et inter sites sont généralement une technique de test statistiques (principe de l'ANOVA). Cependant, cette variabilité spatiale intra-sites n'est peut-être que le résultat de la variation spatiale à échelle microscopique des microorganismes, de la limitation de la dispersion à échelle très locale, du fait de la relation aire-espèces ou d'autres facteurs complètement stochastiques. L'analyse d'échantillons composites d'un même site (pool de sol ou des ADN extraits), ou d'une même condition environnementale, permet de contourner cette limite (Schwarzenbach *et al.* 2007). A l'inverse, ne pas différencier certains habitats lors de l'échantillonnage peut amener à manquer les facteurs majeurs structurant les communautés (typiquement un sol sous influence ou non d'une plante, (Hovatter *et al.* 2011). La richesse en microorganismes dépend de l'aire d'étude. Ainsi le volume de sol, ou d'eau,

prélevé impacte le profil de la communauté caractérisée (Ranjard *et al.* 2003). Toutefois, il n'est pas nécessaire d'être exhaustif dans la description de la diversité pour mettre en évidence des patrons (notamment de beta diversité). Plusieurs études montrent que réduire les séquences ADN d'un échantillon aux séquences majoritaires suffit à révéler des patrons de beta diversité (Cordier *et al.* 2012a), les espèces dominantes d'une condition environnementale étant spécialistes de cette condition (bactéries de milieux côtiers et marins, Fortunato *et al.* 2013). Obtenir une représentativité significative de la diversité pourrait toutefois beaucoup plus dépendre de la profondeur de séquençage ou de l'effort d'extraction ADN. La relation aire-espèces chez les microorganismes à également une influence sur la caractérisation des communautés selon l'intervalle entre deux points d'échantillonnage et l'étendue de l'aire d'étude, des échelles microscopiques, locales, régionales à globales, les patrons de diversité et les facteurs structurant cette diversité ne seront pas les mêmes (Martiny *et al.* 2011).

4. Comment analyser la beta diversité : quelles méthodes pour quels objectifs ?

Les nouvelles méthodes moléculaires ont permis aux microbiologistes d'obtenir des jeux de données du même type que ce que les écologues des plantes ont pu avoir bien avant, une table sites/espèces qui décrit la présence ou l'absence des espèces dans les différents échantillons et/ou leur abondance. L'acquisition de tels jeux de données permet une analyse en détail du changement de composition entre sites, mais aussi de mettre en évidence quels sont les taxons impliqués dans ce changement de composition.

Pour rappel, la beta diversité est la variation dans l'identité des espèces entre sites. L'étude de la beta diversité est au cœur de l'écologie des communautés car elle permet de répondre à la question des facteurs qui font que les assemblages d'espèces sont plus ou moins similaires à un autre dans des localités ou des périodes différentes.

Des indices ont été développés pour mesurer la beta diversité et autant de méthodes pour l'analyser ou l'expliquer (Anderson *et al.* 2011), menant à de vifs débats. Le débat portait sur le fait d'expliquer la beta diversité à travers l'analyse de la table brute site/espèce, ou alors d'analyser la beta diversité à travers l'analyse des indices de beta diversité entre sites (Legendre *et al.* 2005). Pour une métaphore cela revient à analyser la vitesse du passage. Le but de ce paragraphe n'est pas de rentrer dans ce débat ni d'être exhaustif sur les indices et méthodes pour étudier l'assemblage des communautés

mais plutôt de présenter certaines approches qui ont été utilisées dans ce travail de thèse et les questions/objectifs relatifs à chaque approche.

Anderson (2011) distingue deux types de beta diversité (Figure 0.26). Le premier type de beta diversité est une notion de turnover (changement). L'idée est de mesurer le changement de communautés d'un site à un autre le long d'un gradient spatial, temporel ou environnemental. C'est un environnement continu. Le second type de beta diversité est une notion de variation dans la structure des communautés entre plusieurs échantillons/sites au sein d'une aire ou période d'étude, ou entre traitements expérimentaux. C'est un environnement discontinu. Suivant le design expérimental et les questions posées, il y a plusieurs possibilités d'analyses (Figures 0.27, 0.28) toutes pouvant être basées sur des méthodes multivariées ou sur une combinaison de méthodes multivariées et d'analyses univariées d'un indice multivarié (e.g. approche T2, V4). Voir Anderson (2011) pour une description détaillée de ces approches.

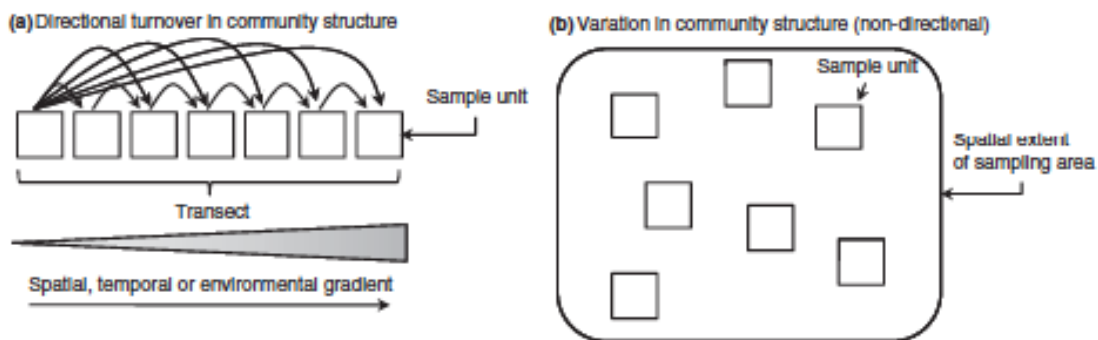


Figure 0.26. Représentation schématique de deux concepts de la beta diversité : (a) turnover de la structure des communautés le long d'un gradient environnemental et (b) variation de la structure des communautés entre échantillons dans une aire donnée. *Source Anderson 2011.*

Enfin, avec le séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires, il est possible de faire des analyses basées sur les taxons et non plus la communauté comme un tout. Cela permet de trouver des préférences d'habitat pour certains taxons par des tests d'association du type test du CHI2, des analyses de variances sur les abondances, ou encore de modéliser la présence et l'absence le long de gradient par des régressions logistiques ou les abondances par des modèles linéaires ou non-linéaires. Ces dernières approches sont mises en œuvre dans le Chapitre II, III et IV.

Objectif	Représentation schématique	Analyse
<p>T1. Mesurer le changement entre deux communautés.</p>		<p>Calcul d'un indice multivarié de dissimilarité (e.g. Bray-Curtis).</p>
<p>T2. Modéliser le changement entre deux communautés le long d'un gradient environnemental.</p>		<p>Modélisation d'un indice de dissimilarité par des méthodes univariées types régressions linéaires ou non-linéaires.</p>
<p>T3. Modéliser le changement entre toutes les communautés deux à deux en fonction de la distance environnementale, spatiale ou temporelle entre toutes les communautés deux à deux.</p>		<p>Méthodes univariées, test de Mantel, test de Mantel partiel (pour tester un effet en prenant en compte un autre), corrélogramme de Mantel (valeur de la relation en fonction des classes de distances).</p>
<p>T4. Estimer le taux de changement entre toutes les communautés deux à deux en fonction de la distance environnementale, spatiale ou temporelle entre toutes les communautés deux à deux. Très similaire à T3. L'intérêt porte sur la pente de la relation. Ici est analysée la similarité et non pas la dissimilarité.</p>		<p>Modélisation linéaire ou non-linéaire de $(1 - \Delta y)$ en fonction de Δx.</p>
<p>T5. Estimer le taux de changement entre toutes les communautés deux à deux en fonction de la distance environnementale, spatiale ou temporelle entre toutes les communautés deux à deux et le comparer entre taxons.</p>		<p>Comparer la pente (et r^2) obtenue pour deux groupes différents, $(\partial y_1 / \partial x)$ et $(\partial y_2 / \partial x)$.</p>
<p>T6. Estimer le taux de changement entre toutes les communautés deux à deux en fonction de la distance environnementale, spatiale ou temporelle entre toutes les communautés deux à deux et le comparer entre habitats ou le long d'un deuxième gradient.</p>		<p>Régressions linéaires ou non-linéaires du taux de changement $(\partial y / \partial x_A)$ vs x_B.</p>

Figure 0.27. Représentation schématique et analyses proposées de la beta diversité pour différentes questions avec un focus sur l'approche turnover. Adapté de Anderson 2011.

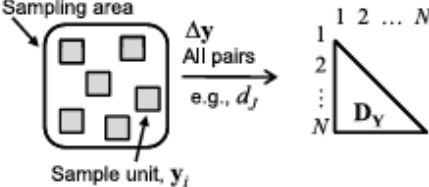
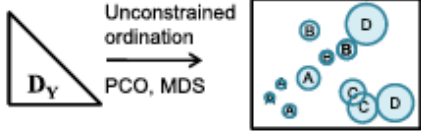
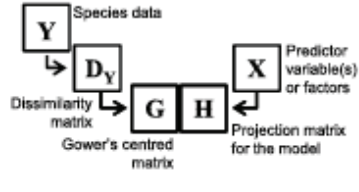
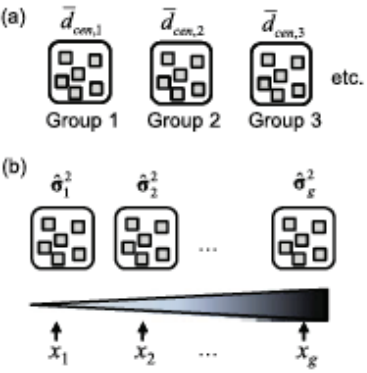
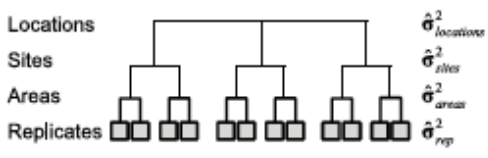

Objectif	Représentation schématique	Analyse
<p>V1. Mesurer la variation (beta-diversité) entre les échantillons/communautés d'une zone d'étude.</p>		<p>Calculer la distance moyenne au centroïde de tous les échantillons, i.e. la dispersion. Voir (Anderson et al. 2006).</p>
<p>V2. Explorer la relation entre la structure de plusieurs échantillons/communautés. Représenter les dissimilarités (e.g. Bray-Curtis) entre échantillons.</p>		<p>Ordinations sans a priori (non contraintes) type NMDS, PCoA. Visualisation des caractéristiques des échantillons par des symboles et/ou corrélation entre les distances et les caractéristiques des échantillons (e.g. envfit dans R).</p>
<p>V3. Partition de la variance contenue soit dans la matrice de distance, soit dans la table brute en fonction de facteurs spatiaux, environnementaux.</p>		<p>Données brutes : ordinations contraintes type RDA, CCA (voir Legendre & Legendre 1998). Distances : partition de variance sur matrice de distance pour tous types de distances/dissimilarités (e.g. métriques ou non). NPMA-NOVA (Anderson 2001), db-RDA (Legendre & Anderson 1999).</p>
<p>V4. Comparer la beta-diversité (dispersion, variation) entre (a) habitats discontinus (groupes a priori) ou (b) le long d'un gradient continu.</p>		<p>Calculer la dispersion (V1), puis méthodes univariées types régressions linéaires et non-linéaires, ou ANOVA si plusieurs mesures par groupe.</p>
<p>V5. Partition de variance selon une série de facteurs hiérarchiques.</p>		<p>Partition de la variance et estimation des parts de variance (voir adipart dans R).</p>
<p>V6 et V7. Comparer la part de variance selon une série de facteurs hiérarchiques entre différents habitats ou différents taxons (V7).</p>		<p>Comparaison de la partition de variance et des parts de variance expliquée.</p>

Figure 0.28. Représentation schématique et analyses proposées de la beta diversité pour différentes questions avec un focus sur l'approche variation. Adapté de Anderson 2011.

Objectifs du travail de thèse

Les microorganismes occupent une place centrale dans le fonctionnement des écosystèmes. Nous sommes encore loin d'une description complète de la diversité microbienne dans la plupart des environnements, qu'ils soient extrêmes ou non. De plus, l'écologie, la physiologie et l'histoire de vie de la plupart des taxons microbiens, même ceux qui sont abondants, restent mal comprises. Nous avons pointé le besoin i) de caractériser la diversité microbienne, ii) les facteurs contrôlant sa distribution et iii) les caractéristiques écologiques des taxons microbiens, qu'elles soient l'habitat, le mode de vie ou la stratégie évolutive. Les plantes sont un déterminant majeur de la distribution microbienne mais le couvert végétal est souvent confondant avec les variables abiotiques du sol. L'intrication des facteurs abiotiques et biotiques reste à démêler dans les études de terrain afin de connaître les facteurs environnementaux auxquels répondent les microorganismes. De plus, l'effet des facteurs biotiques est toujours rarement pris en compte dans les études d'écologie des communautés (Hanson *et al.* 2012). Enfin l'effet des facteurs environnementaux covarie avec la résolution phylogénétique des taxons, un paramètre à prendre en compte dans les études de biodiversité, que ce soit pour l'écologie des communautés ou les aspects plus évolutifs de la diversité microbienne.

La majorité des études concernant la biogéographie microbienne se sont intéressées à trouver les facteurs majeurs structurant les communautés microbiennes. Cependant il est évident que toutes les espèces composant une communauté n'ont pas les mêmes caractéristiques et besoins écologiques. La présence d'une espèce dans la communauté n'est pas la conséquence d'une réponse aux mêmes facteurs auxquels répondent les autres espèces composant la même communauté. Il est aujourd'hui nécessaire de coupler la vision communauté centrée à une vision population centrée et d'établir des guildes de microorganismes présentant les mêmes réponses aux gradients environnementaux.

D'un point de vue plus méthodologique, des incertitudes concernant la cohérence des méthodes moléculaires entre elles doivent être testées. Avec l'avènement du séquençage massif d'amplicons, il est nécessaire de faire un point sur les informations apportées par cette nouvelle approche.

Ce travail de thèse propose une contribution à cette entreprise à travers la caractérisation de la diversité bactérienne et fongique dans un environnement extrême mais représentant néanmoins un système simplifié de la biologie des sols. Certaines parties de la thèse se focalisent sur les champignons. Ce choix est orienté par i) le manque encore plus grand de connaissances concernant les champignons relativement aux bactéries dans certains domaines de la microbiologie environnementale et ii) des hypothèses spécifiques que nous souhaitons tester, en cohérence avec des résultats préliminaires ou avec les recherches au laboratoire. Nous avons soulevé les interactions qu'il existait entre les plantes et les microorganismes et les influences réciproques de chaque composante. Nous aborderons donc l'écologie des communautés microbiennes à travers les interactions plantes-microorganismes.

En pratique, les objectifs de ce travail de thèse ont été dans un premiers temps i) caractériser la diversité microbienne avec les nouvelles méthodes moléculaires, ii) analyser les patrons de beta diversité pour les bactéries et les champignons, et appréhender l'influence des plantes et les mécanismes sous-jacents et iii) découpler les effets des facteurs biotiques des facteurs abiotiques pour en tirer les facteurs majeurs contrôlant la beta diversité microbienne. Ces points sont abordés dans l'ensemble des chapitres de la thèse. Dans un second temps les objectifs sont i) de comparer les approches moléculaires (empreinte vs. séquençage) dans la description et les interprétations des patrons de beta diversité microbienne et ii) de tester les liens phylogénie-fonction à travers l'appréhension des patrons de beta diversité et de distribution de taxons à différentes résolutions taxonomiques. Ces deux points sont développés dans le Chapitre IV.

Présentation du système d'étude et démarche scientifique

I. Les plantes en coussins des milieux alpins : un modèle pour l'étude de la distribution spatiale des microorganismes

Le port en coussin des plantes est une adaptation aux climats froids et secs apparu indépendamment dans plusieurs familles au cours de l'évolution (Aubert *et al.* 2014). Elles sont retrouvées dans tous les milieux artico-alpins du globe. Le terme coussin englobe en réalité une variété de formes (Figure 0.29).

Les plantes en coussin, notamment celles qui forment de gros coussins et qui peuvent héberger des plantes en leur sein sont particulièrement intéressantes à la fois pour la compréhension de l'assemblage des communautés microbiennes et pour faire le lien entre diversité microbienne et un processus écosystémique important, la modification de l'habitat et ses conséquences en termes de construction de niche et de facilitation. Les plantes en coussin sont des espèces fondatrices, ingénieures de l'écosystème. Elles sont à la fois pionnières et climaciques dans les environnements alpins de falaises et de crêtes de haute altitude.

1. Les plantes en coussin : espèces fondatrices de l'écosystème

1.1. Le concept d'espèce ingénieure de l'écosystème

Ce concept fut proposé par Jones et collègues (Jones *et al.* 1994) dans le but d'incorporer les diverses modifications environnementales par les organismes, et leur conséquence. Un « ecosystem engineer » est un organisme qui modifie directement ou indirectement la disponibilité en ressources pour les autres espèces causant un changement dans l'environnement biotique et abiotique. Par cette activité, ils modifient ou créent des habitats. Il existe deux type d'espèces ingénieures: les espèces ingénieures allogéniques modifiant l'écosystème par leur activité (ex: les castors) et les espèces ingénieures autogéniques, modifiant l'écosystème par leur propre croissance (ex: les arbres). Plusieurs concepts tournent autour de celui d' « ecosystem engineer » (Box 8). Certains processus s'intéressent aux conséquences évolutives sur l'organisme qui crée sa niche et sur les interactions que l'espèce ingénieure entretient avec les organismes d'un niveau

trophique similaire ou différent.














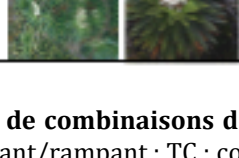
Form	Compactness	Variability	Woodyness	Succulence	Thorniness	Drawing (Rauh 1939)	Example and image
C	1	0	0	0	0		 <i>Androsace helvetica</i> (L.) All. (Primulaceae), here in the Alps at ca 2700 m
Herbaceous species with radial compact hemispherical cushion (Rauh's Vollkugelpolster)							
C	0	0	1	0	1		 <i>Onobrychis cornuta</i> (L.) Desv. (Fabaceae) here at Olang pass, at ca 2200 m, Sennan, Elburz mountains
Woody and thorny species with radial hollow hemispherical cushion (Rauh's Hohlkugelpolster)							
F	1	0	1	0	0		 <i>Silene acaulis</i> (L.) Jacq. (Caryophyllaceae) here in the Alps at ca 2700 m
Species woody at the base and with radial compact low cushion (Rauh's Vollflachpolster)							
M	0,1	0	1	0	1		 <i>Arenaria tetragyna</i> L. (Caryophyllaceae) here in the Sierra Nevada in Spain at ca 3000 m
Species with woody stock forming a semi-compact creeping cushions (Rauh's Kriechpolster)							
TC	1	0	0	0	0		 <i>Paspalanthus karriensis</i> Ruhland (Ericaceae), here in the tropical Andes of Venezuela at 3900 m
Herbaceous species forming a tufted compact cushion (Rauh's Rasenpolster)							
C	0	0	1	1	1		 <i>Austrocylindropuntia floccosa</i> (Salm-Dyck ex Winterfeld) ERHartl (Cactaceae)
Thorny succulent species forming radial hollow hemispherical cushion (Rauh's Sukkulente polsterpflanzen)							
M or C	1	1	0	0	0		 <i>Azorella selago</i> Hook.f. (Apiaceae), here in Kerguelen archipelago in communities with <i>Frigeria antillarctica</i> and <i>Festuca magellanica</i> (left) or as pioneer species (right)
Species woody at the base forming either compact mats (left) or compact hemispherical cushions (right)							
C or 0	0	2	0	0	1		 <i>Phyllactis rigida</i> (Ruiz & Pav.) Pers. (Valerianaceae) in the Piramo El Angel in Ecuador, at ca 4000 m either as a rosette cushion (left) or solitary (right)
Herbaceous thorny species growing either solitary or forming rosette cushions							

Figure 0.29. Exemple de plantes en coussins ayant une variété de combinaisons de caractères. C : coussin hémisphérique ; F : coussin plat ; M : coussin en tapis, grimpant/rampant ; TC : coussin touffu ; 0 : non considérer comme coussin. Source Aubert et al. 2014.

Box 8. Le concept d' « ecosystem engineering » et concepts apparentés

Ecosystem engineering. Se réfère aux organismes qui changent la distribution, la quantité ou la composition de l'énergie et des matériaux de l'environnement de manière non-trophique, par leur propre structure physique et activité. Ce faisant, ils créent, modifient, maintiennent ou détruisent les habitats pour les autres espèces et peuvent affecter la structure des communautés (Jones et al. 1994, 1997). Suivant cette définition, tous les organismes sont des espèces ingénieures. Cependant, bien que tous les organismes puissent changer l'environnement dans une certaine mesure, des espèces ont des impacts bien plus importants que d'autres et les « ecosystem engineer » ont un impact disproportionnée par rapport à leur biomasse (Jones et al. 1994, 1997). Les « foundation species » sont un parallèle direct aux « ecosystem engineers ».

Keystone species. Le fait que les « ecosystem engineer » soient définis comme des espèces ayant un impact bien plus important que d'autres, notamment disproportionné par rapport à leur biomasse rentre dans la définition des espèces clef de voûte. Les espèces « ecosystem engineer » sont généralement des espèces clef de l'écosystème car à l'origine de la structure physique de l'environnement et l'organisation des communautés. Cependant, toutes les espèces clef de voûte ne sont pas des espèces ingénieures, leur présence n'entraînant pas de modification environnementale, par exemple les pollinisateurs.

Facilitation. Les interactions se caractérisent généralement par la différence des coûts et bénéfices de deux espèces cooccurrentes. Les interactions positives se réfèrent au bénéfice d'au moins une espèce des deux espèces cooccurrentes sans que la deuxième ne soit affectée ou qu'elle en tire un avantage également. La facilitation a été proposée pour les interactions positives entre organismes d'un même niveau trophiques (i.e. les plantes, (Bertness & Callaway 1994; Callaway 1995), mais certains n'excluent pas que la conséquence sur l'organisme facilitateur soit négative (Schob et al. 2014). La facilitation n'était abordée que sous l'angle de l'écologie des communautés. Aujourd'hui, les conséquences évolutives sur l'organisme facilitateur (Michalet et al. 2011) et facilité (Liancourt & Tielborger 2011) sont prises en compte.

Nurse effect. L'effet protecteur est une conséquence directe de l' « ecosystem engineering ». Il se penche sur les interactions entre organismes dont l'une des parties en interaction est un « ecosystem engineer ». La question de savoir si un « ecosystem engineer » augmente la probabilité de présence d'un autre organisme, son abondance, ou sa croissance ou encore la diversité au niveau de la communauté est généralement un pré requis à parler d'un effet protecteur (Badano et al. 2006). Il implique généralement la notion de facilitation, i.e. une interaction positive. Cet effet nurse a toutefois un coût et un bénéfice pour l'espèce ingénieur (Michalet et al. 2011; Schob et al. 2014). L'effet nurse n'est pas encore bien défini notamment lorsque que les parties en interaction appartiennent à des niveaux trophiques différents.

Niche construction. La construction de niche est un processus au même titre que l' « ecosystem engineering ». Il se réfère aux organismes dont les traits (incluant l'activité, le comportement) vont déterminer l'environnement subi (Odling-Smee et al. 1996). La construction de niche peut mener à une modification de l'environnement externe, i.e. « ecosystem engineering ». Le processus de construction de niche à une dimension évolutive et se penche sur les conséquences en termes de pression de sélection et de fitness de l'organisme impliqué dans la construction de niche. La construction de niche s'intéresse à l'ensemble des traits ayant un impact sur l'environnement que l'organisme subit, sans savoir si ce trait est adaptatif.

Phénotype étendu. Le phénotype étendu décrit les effets du génotype de l'organisme sur son environnement externe (Whitham et al. 2003). C'est un trait externe à l'enveloppe physique de l'organisme. Ce concept fut proposé pour la première fois par Richard Dawkins. Ce concept diffère du concept de construction de niche car le phénotype étendu est attribuable au phénotype de l'organisme et parce que les traits sont des phénotypes étendus seulement si ce sont des adaptations (Odling-Smee et al. 2013).

L'ensemble de ces processus implique la notion de traits susceptibles de varier génétiquement.

1.2. Le cas des plantes en coussins

Les plantes en coussins sont des ingénieurs autogéniques. Elles sont caractérisées par des entre-nœuds très courts et des petites feuilles. La forme hémisphérique des coussins résulte en un rapport surface/volume très faible, limitant les pertes de chaleurs. Ainsi,

les coussins tamponnent les variations de température quotidiennes et la température à l'intérieur des coussins est plus élevée que la température de l'air extérieur (Figure 0.30; Arroyo *et al.* 2003; Cavieres *et al.* 2007).

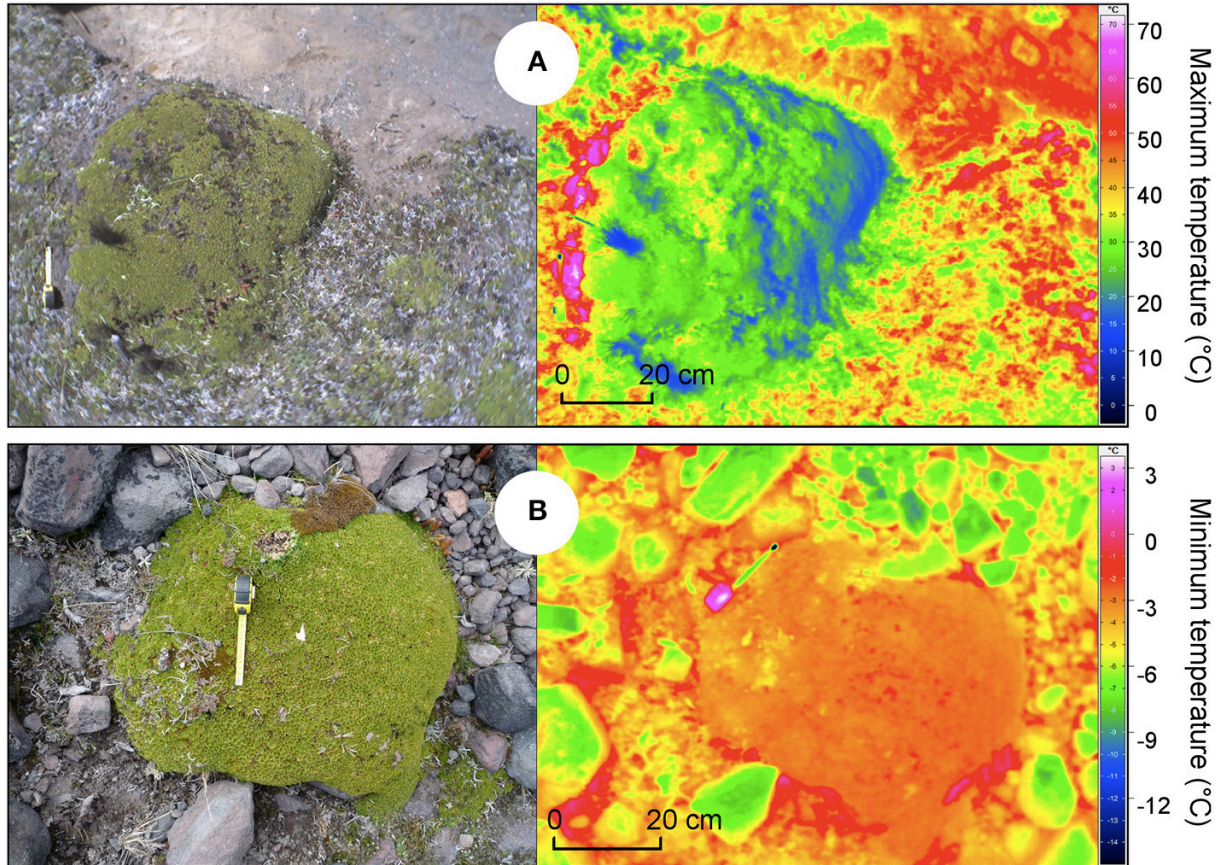


Figure 0.30. Effet tampon des plantes en coussin sur la température du sol. Cas de *Azorella aretioides* (Equateur, 4700 m a.s.l.). (A) *A. aretioides* réduit les températures maximales durant la journée. (B) *A. aretioides* augmente les températures minimales durant la nuit. Source Anthelme *et al.* 2014.

L'accumulation de matière organique mène à une plus grande quantité de nutriments dans les coussins, ainsi qu'une rétention de l'eau plus importante (Anthelme *et al.* 2012; Yang *et al.* 2010). En conséquence, les coussins entretiennent principalement des interactions positives (facilitation) avec les plantes voisines. Il a été montré que le taux de germination des plantes alpines était supérieur lorsque les graines étaient dans les coussins (Cavieres *et al.* 2007). Une plus grande diversité spécifique est ainsi généralement retrouvée dans les coussins que dans la matrice minérale extérieure (Badano & Cavieres 2006b; Badano *et al.* 2002). Certaines espèces ne sont retrouvées que dans les coussins, la présence des coussins dans l'environnement augmentant toujours le nombre d'espèce à l'échelle de la communauté totale (Cavieres & Badano 2009). La facilitation des plantes alpines par les coussins a été observée dans différents

milieux artico-alpins du monde, en Patagonie (Arroyo *et al.* 2003; Cavieres *et al.* 2002), dans les Andes du Sud (Badano & Cavieres 2006b; Cavieres & Badano 2009), dans les Andes du Nord (Anthelme *et al.* 2012; Sklenar 2009), en Himalaya (Yang *et al.* 2010), et dans l'arctique canadien (Molenda *et al.* 2012) et européen (Antonsson *et al.* 2009), bien que le phénomène soit attribué à une amélioration des conditions thermiques (Arroyo *et al.* 2003; Cavieres *et al.* 2007), ou une amélioration de la fertilité (Anthelme *et al.* 2012; Yang *et al.* 2010). Cet effet sur la structure des communautés a également été observé chez les arthropodes (Molenda *et al.* 2012; Molina-Montenegro *et al.* 2006).

1.3. Variation de l'effet ingénieur

Une question est de prédire quand les espèces ingénieures auront un impact important ou faible sur les communautés, tout en expliquant pourquoi l'impact varie en magnitude (Jones *et al.* 1997; Wright *et al.* 2006) et sur quelles caractéristiques de la communauté l'ingénieur aura un impact (Badano & Cavieres 2006a).

La magnitude de l'effet positif des coussins sur la diversité en plantes tend à augmenter avec le stress abiotique (Anthelme *et al.* 2012; Antonsson *et al.* 2009; Cavieres *et al.* 2006). Il est reconnu que plus la contrainte abiotique augmente plus les interactions seront de nature positive (Choler *et al.* 2001), « the stress gradient hypothesis » (SGH, Bertness & Callaway 1994). Cette hypothèse a cependant été affinée et prédit une prédominance des interactions négatives (compétition) aux deux extrêmes du gradient de stress (Michalet *et al.* 2006; Maestre *et al.* 2009).

2. Le système coussin des falaises d'altitude pour l'étude de l'écologie des communautés microbiennes

Les plantes en coussins ont plusieurs avantages pour l'étude de l'écologie des communautés microbiennes :

- i) La matière organique (MO) provient exclusivement de la plante. Le coussin constitue un sol organique, formé *de novo* par l'accumulation de tissus morts, sénescents et photosynthétiques (Figure 0.31). La contingence historique typique des sols développés est minimisée dans ce système.
- ii) Certaines poussent dans des systèmes très minéraux (les falaises de haute montagne, Figure 0.30) ou l'influence de la roche mère est directe. Le système peut être vu comme

un système simplifié de la biologie des sols. Ce système permet de maximiser l'effet direct du contexte abiotique local et de tester si la plante modifie cet effet.

iii) La MO provient majoritairement des tissus morts ou en sénescence (Figure 0.31). Il n'y donc pas d'influence des racines (exsudats racinaires) et nous observons ainsi l'influence de la MO aérienne seulement.

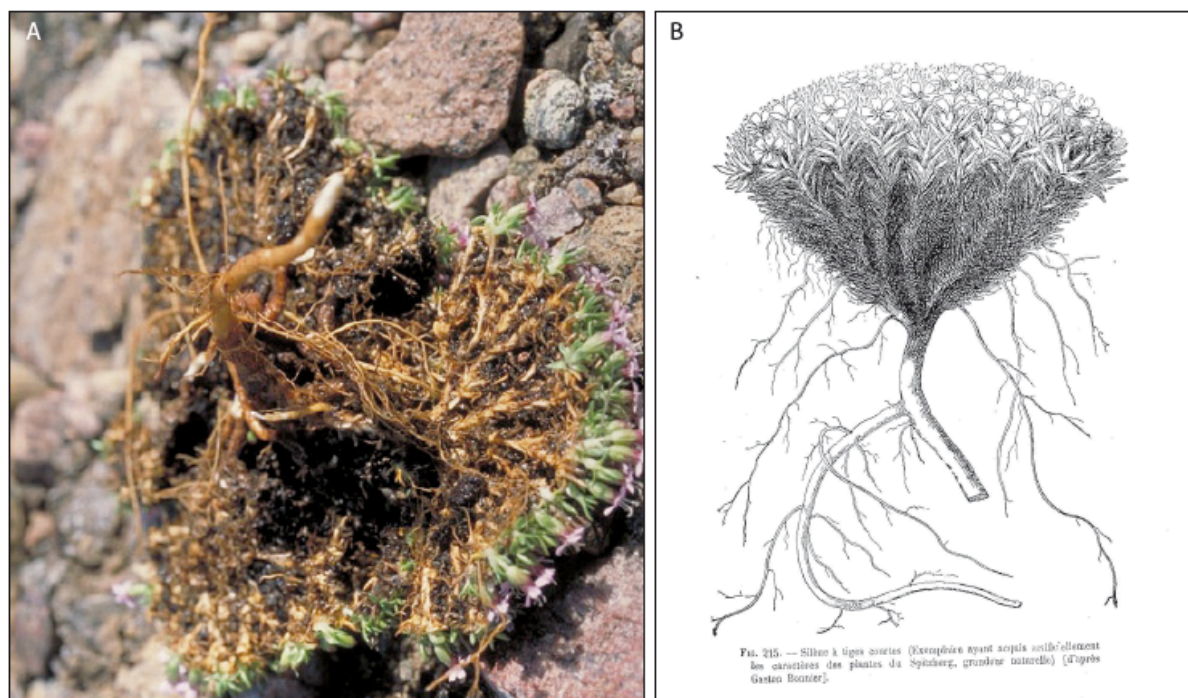


Figure 0.31. Structure détaillée d'une plante en coussin, *S. acaulis*. (A) Photo d'un coussin de *S. acaulis* retourné. On peut distinguer les tissus photosynthétiques, les tissus en sénescence et les tissus en décomposition (sol organique noir). (B) Dessin d'un coussin de *S. acaulis* d'après Gaston Bonnier.

iv) Elles sont souvent distribuées le long de gradients environnementaux. En échantillonnant les communautés à l'intérieur et en dehors des coussins (que l'on peut considérer être un contrôle), il est possible d'évaluer plusieurs aspects de l'effet des plantes sur les communautés microbiennes :

- évaluer l'influence du contexte abiotique local et de la plante (la plante en soi et à un niveau plus fin, les différents types de coussins) sur les communautés microbiennes associées aux coussins.
- évaluer l'influence de la plante sur la réponse des communautés microbiennes à des changements de conditions environnementales
- prédire la différence de composition microbienne entre habitats en fonction du contexte environnemental local ou des caractéristiques éco-physiologique de la plante (variation de l'effet ingénieur à échelle micro-locale).

v) Dans une perspective de biogéographie, le système coussin est un système insulaire où chaque coussin est séparé des autres par une matrice inhospitalière. Le suivi de la composition des communautés microbiennes au sein d'un même habitat le long d'un gradient géographique est particulièrement approprié pour étudier l'effet de l'isolement géographique sur l'assemblage des communautés (Martiny *et al.* 2006).

vi) Dans une perspective fonctionnelle et évolutive, il est intéressant d'évaluer le rôle des microbes associés aux coussins comme troisième partie dans les interactions plantes-plantes (facilitation/compétition, voir Jones *et al.* 2010 pour les concepts, et Casanova-Katny *et al.* 2011 pour des résultats) et leur rôle direct dans l'environnement que les coussins subissent (effet de rétro-actions, construction de niche).

II. Présentation du système d'étude

1. Espèce modèle: *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) L.

Cette thèse s'est focalisée sur le silène acaule (*Silene acaulis* (L.) Jacq.). L'espèce forme des coussins plus ou moins compacts, ligneux à la base, pouvant atteindre 1 m de diamètre, autour d'une racine pivot (Figures 0.30, 0.31, 0.32). Il est considéré comme un « vrai » coussin (Aubert *et al.* 2014). L'espèce est gynodioïque (individus aux fleurs femelles et individus aux fleurs hermaphrodites), entomogame, anémo-barochore. Les individus ont une longue durée de vie, qui peut être supérieure à 300 ans (Morris & Doak 1998).

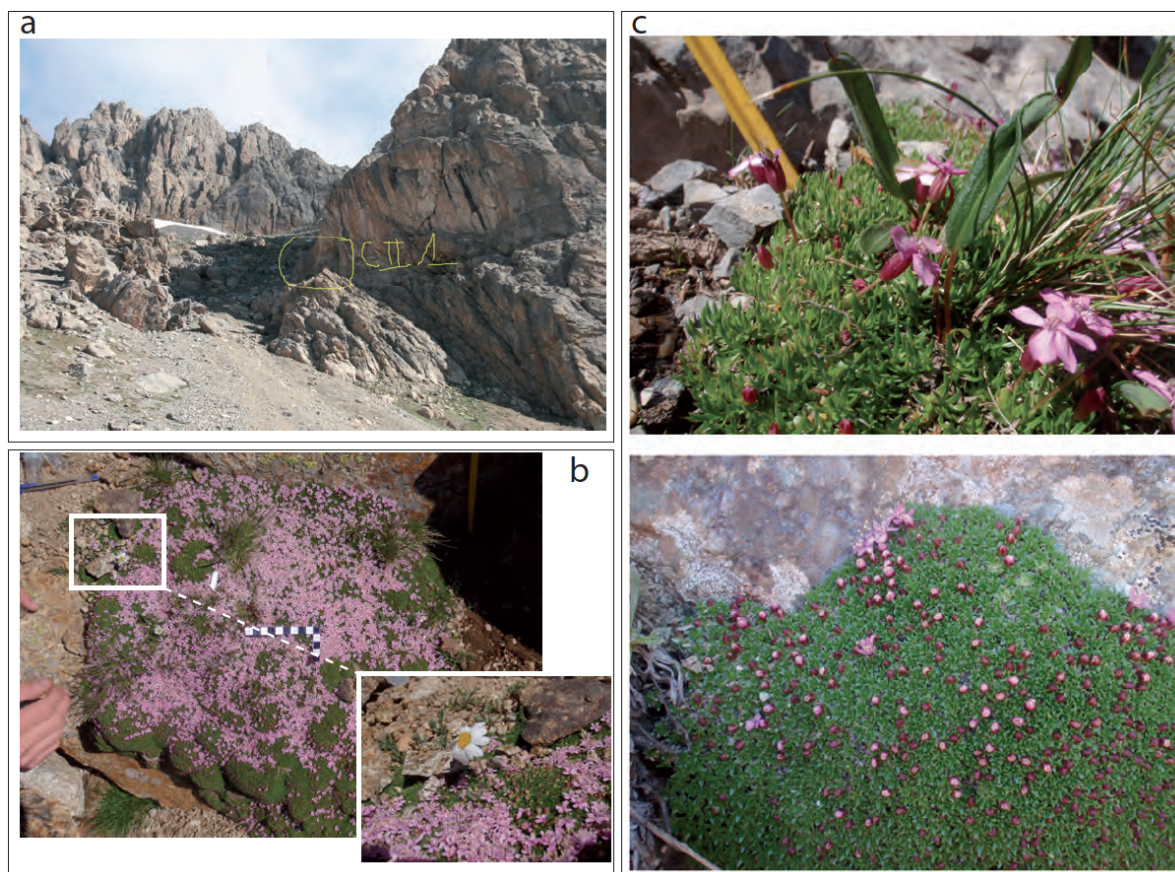


Figure 0.32. Présentation du système d'étude. (a) Falaise dans laquelle s'établissent les coussins de *S. acaulis* ; site de Roche Colombe. (b) Focus sur un coussin de *S. acaulis* ; Pointe de l'Etendard, 2900 m. La règle mesure 10 cm de long. (c) Différence phénotypique entre les coussins lâches de *S. acaulis longiscapa* (haut) et denses de *S. acaulis exscapa* (bas). Photos : équipe Ecologie Verticale.

L'espèce est arctico-alpine. *Silene acaulis* est en réalité un taxon comprenant une grande diversité de sous-espèces (Bock 1983). Plusieurs sont retrouvées dans les Alpes (Figure 0.32, 0.33) où le taxon *S. acaulis* subit une divergence en cours. Ces sous-espèces

sont définies sur la base de la morphologie, des composés secondaires qu'elles produisent et de leur localisation géographique. Cependant, aucune analyse moléculaire confirmant une base génétique à cette divergence n'a été conduite jusque là (voir Chapitre II). Une synthèse de la systématique de l'espèce dans les Alpes propose deux sous-espèces correspondant à un phénotype plutôt lâche (*longiscapa*) établi sur roche mère calcaire, et un phénotype dense, très compact (*exscapa*), principalement sur roche mère siliceuse (Bock 1983).

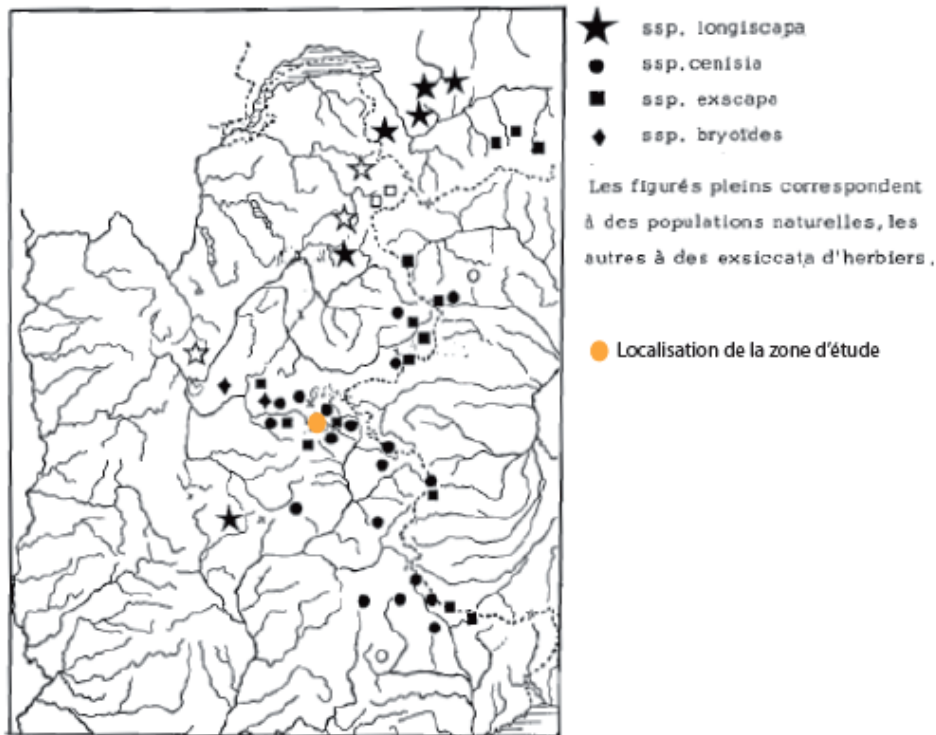


Figure 0.33. Distribution des différentes sous-espèces de *Silene acaulis* dans les Alpes françaises et localisation de la zone d'étude (Lautaret). Source Bock 1983.

2. Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage

La zone d'étude se situe dans la région du Lautaret, dans les Hautes-Alpes (05). L'échantillonnage a été effectué dans deux massifs montagneux aux différences géologiques marquées, le massif des Cerces et le massif du Combeynot respectivement au Nord et au Sud de la vallée de la Guisane qui les sépare, entre le col du Lautaret et Briançon. La géologie de la région (Debelmas 1974) est complexe particulièrement dans le massif des Cerces. Grossièrement, le massif des Cerces est un massif calcaire avec des zones composées de calcaire dolomitique et d'autres zones à dominance de calcschistes (Figure 0.34). Le massif du Combeynot est siliceux, à dominante granite et gneiss.

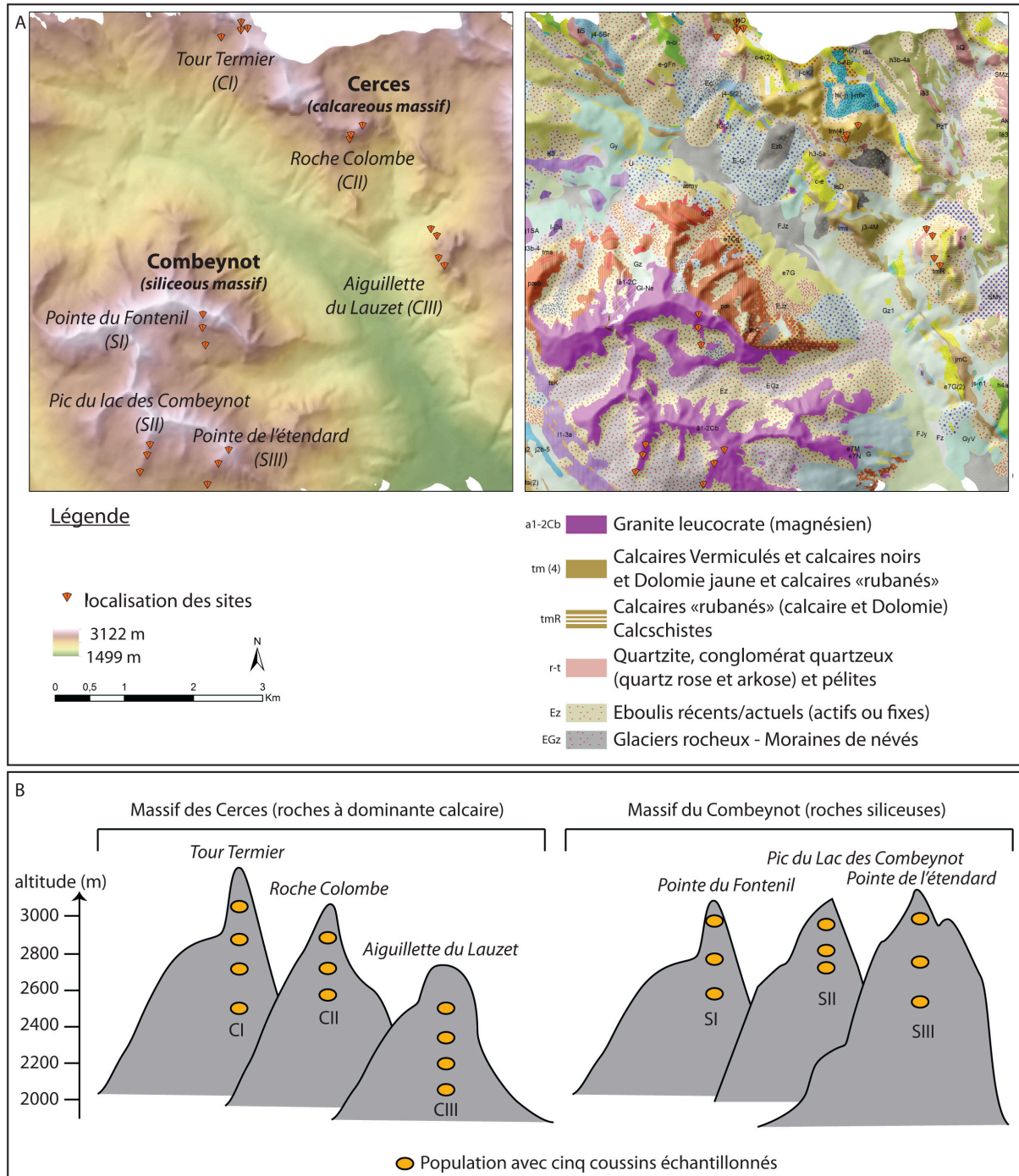


Figure 0.34. Localisation des sites d'échantillonnage. (A) Carte topographique et carte géologique caractérisant le système étudié. (B) Représentation schématique de l'échantillonnage selon les gradients d'altitude.

Pour caractériser l'effet de la plante et du contexte abiotique, nous avons échantillonné du sol formé *de novo* constituant les coussins de *Silene acaulis* et le sol extérieur. En répliquant et reproduisant cet échantillonnage par paire le long de gradients environnementaux de roche mère et d'altitude, il est alors possible de caractériser de manière précise l'effet de la plante et de découpler les effets de la plante

des effets purement liés au contexte local. Précisément, nous avons échantillonné du sol de coussins et du sol extérieur (distant de 10 à 20 cm des coussins) pour trois populations de cinq coussins réparties le long d'un gradient d'altitude. Trois extraits de sols par coussin et par sol extérieur ont été poolés. Les gradients d'altitude ont été répliqués trois fois dans deux massifs qui diffèrent par leur géologie, le massif des Cerces (Tour Termier, Roche Colombe, Aiguillette du Lauzet) et le massif du Combeynot (Pointe du Fontenil, Pic du Lac, Pointe de l'Etendard). Deux populations supplémentaires sur quartzite ont été échantillonnées au bas des gradients Tour Termier et Aiguillette du Lauzet (Figure 0.34).

Ce travail de thèse porte un regard sur les interactions plantes-microorganismes d'un point de vue de la microbiologie environnementale mais aussi d'un point de vue de l'écologie fonctionnelle et évolutive des plantes.

D'un point de vue de la microbiologie environnementale, nous étudierons et discuterons les forces à l'origine de la structure des communautés microbiennes le long des gradients environnementaux, notamment le rôle de la plante.

D'un point de vue de l'écologie fonctionnelle et évolutive des plantes, nous étudierons les conséquences de la divergence en cours au sein du taxon *S. acaulis* sur la structure et le fonctionnement des communautés subordonnées. Nous ferons également une comparaison de l'effet des coussins sur la diversité végétale et microbienne, à différentes échelles spatiales, du patch aux massifs montagneux. Pour cela, nous nous appuyerons sur la bibliographie pour la comparaison concernant l'effet des coussins sur la diversité végétale, les communautés végétales associées aux coussins n'ayant pas été analysées dans la thèse.

A ce jour, peu d'études ont caractérisé la diversité microbienne associée aux plantes en coussins. Ces plantes sont cependant emblématiques des milieux de montagnes et soutiennent tout un écosystème. Elles font l'objet d'étude depuis longtemps (Aubert *et al.* 2014; Benoist 1935; Heilborn 1925) tant par leur effet sur les écosystèmes que de par leur diversité et leur statut de plante emblématique des milieux de haute montagne.

Chapitre I. Structuration des communautés bactériennes et fongiques par *Silene acaulis*: l'importance de l'effet ingénieur

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte général

En dépit des récentes informations sur les facteurs biotiques et abiotiques corrélés à la composition des communautés microbiennes (Zinger et al., 2011) et les processus biogéographiques qui structurent les communautés sous la plante et dans le sol nu (Hovatter *et al.* 2011), trois problèmes principaux empêchent notre compréhension des processus sous-jacents : (i) la complexité des systèmes analysés, composés de multiples espèces végétales et/ou de sols matures, (ii) le lien fort entre les caractéristiques du sol et les caractéristiques végétales et (iii) le manque d'analyses comparatives le long de gradients spatiaux et/ou environnementaux explicites qui permettraient d'évaluer comment les processus écologiques sont affectés par le changement des variables abiotiques.

2. Objectifs et démarche de l'étude

L'objectif de cette étude a été de caractériser l'effet d'une plante sur la structure des communautés microbiennes le long de forts gradients environnementaux. Nous souhaitons savoir (i) si la plante modifie la réponse des communautés microbiennes aux gradients environnementaux (effet biotique plus fort qu l'effet abiotique) et (ii) si la sélection des microorganismes par la plante est affectée par le changement de conditions abiotiques. Ce point est encore mal caractérisé bien qu'il soit essentiel à la fois dans le contexte actuel de changements globaux et dans la compréhension de la biogéographie microbienne. Pour cela nous avons caractérisé dans quelle mesure la plante modifie les caractéristiques abiotiques et biotiques du sol adjacent le long de gradients d'altitude et selon la roche mère et identifier les variables clés déterminant la réponse des communautés à la plante le long des gradients environnementaux, en faisant une emphase sur le rôle de la plante. Dans ce but, 90 coussins de *S. acaulis* ont été sélectionnés pour l'échantillonnage de sol intérieur et extérieur au coussin. Plusieurs caractéristiques abiotiques ont été mesurées et les communautés

bactériennes et fongiques ont été caractérisées par profilage moléculaire CE-SSCP de la région V3-V4 de l'ARNr 16S et de l'ITS1 pour les bactéries et champignons respectivement.

II. Contribution

Article I.

Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities

Julien Roy, Cécile Hélène Albert, Philippe Choler, Jean-Christophe Clément, Sébastien Ibanez, Sébastien Lavergne, Patrick Saccone, Lucie Zinger and Roberto Alejandro Geremia

Frontiers in Microbiology, 4 :64



Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities

J. Roy^{1*}, C. H. Albert^{1†}, S. Ibanez^{1†}, P. Saccone^{1†}, L. Zinger¹, P. Choler^{1,2}, J.-C. Clément¹, S. Lavergne¹ and R. A. Geremia¹

¹ UMR CNRS-UJF 5553, Laboratoire d'Ecologie Alpine, Université de Grenoble, Grenoble, France

² UMS CNRS-UJF 3370, Station Alpine J. Fourier, Université de Grenoble, Grenoble, France

Edited by:

Jeanette M. Norton, Utah State University, USA

Reviewed by:

Jeanette M. Norton, Utah State University, USA

Christopher Blackwood, Kent State University, USA

Maja Sundqvist, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

*Correspondence:

J. Roy, Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS-UJF 5553, Université de Grenoble, 2233 Rue de la Piscine, 38041 Grenoble Cedex 09, France. e-mail: royju@mail.ujf-grenoble.fr

† Present address:

C. H. Albert, McGill University, Department of Biology, Montreal, QC, Canada;

S. Ibanez, Swiss Federal Research Institute WSL, Ecosystem Boundaries Research Unit, Bellinzona, Switzerland;

P. Saccone, Department of Biology, University of Oulu, Box 3000, FI-90014 Oulu, Finland.

Plants affect the spatial distribution of soil microorganisms, but the influence of the local abiotic context is poorly documented. We investigated the effect of a single plant species, the cushion plant *Silene acaulis*, on habitat conditions, and microbial community. We collected soil from inside (In) and outside (Out) of the cushions on calcareous and siliceous cliffs in the French Alps along an elevation gradient (2,000–3,000 masl). The composition of the microbial communities was assessed by Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP). Univariate and multivariate analyses were conducted to characterize the response of the microbial beta-diversity to soil parameters (total C, total N, soil water content, N – NH₄⁺, N – NO₃⁻, and pH). Cushions affected the microbial communities, modifying soil properties. The fungal and bacterial communities did not respond to the same abiotic factors. Outside the cushions, the bacterial communities were strongly influenced by bedrock. Inside the cushions, the bacterial communities from both types of bedrock were highly similar, due to the smaller pH differences than in open areas. By contrast, the fungal communities were equally variable inside and outside of the cushions. Outside the cushions, the fungal communities responded weakly to soil pH. Inside the cushions, the fungal communities varied strongly with bedrock and elevation as well as increases in soil nutrients and water content. Furthermore, the dissimilarities in the microbial communities between the In and Out habitats increased with increasing habitat modification and environmental stress. Our results indicate that cushions act as a selective force that counteracts the influence of the bedrock and the resource limitations on the bacterial and fungal communities by buffering soil pH and enhancing soil nutrients. Cushion plants structure microbial communities, and this effect increases in stressful, acidic and nutrient-limited environments.

Keywords: soil microbial communities, beta-diversity, elevation gradients, ecosystem engineering, foundation species, molecular fingerprint, alpine ecosystems, *Silene acaulis*

INTRODUCTION

Soil microbial communities are a major component of the biosphere and play a critical role in nutrient cycling and ecosystem functioning (van der Heijden et al., 2008). Consequently, identifying the key factors that control their composition is of great interest. The recent development of molecular tools has permitted a more thorough study of these communities. Abiotic factors such as soil pH and soil nutrient availability have been identified as key determinants of the richness and composition of microbial communities (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2008). The changes in these factors along elevation gradients have been shown to drive compositional changes in microbial communities (Bryant et al., 2008; Fierer et al., 2011; Singh et al., 2012; Wang et al., 2012). In addition, single plant affects the composition of soil microbial communities (Kowalchuk et al., 2002) and plant cover is known to be a central driver of the spatial distribution of soil microorganisms (Eskelinen et al., 2009; Zinger et al., 2011). This status could

result from the direct effect of species-specific mutualistic associations (Berg and Smalla, 2009; Hartmann et al., 2009) or from an indirect effect, as plants influence the physico-chemical properties of soil through litter deposition and root exudation of organic compounds (Eviner and Chapin, 2003; Bais et al., 2006). Despite recent insights into the biotic and abiotic factors affecting microbial communities (Zinger et al., 2011), three main issues impede our understanding of the underlying processes: (i) the complexity of the systems that are typically surveyed, which often involve multiple plant species and mature soils; (ii) the strong connection between soils and plant characteristics; and (iii) the lack of comparative analyses along environmental gradients that would allow us to assess how ecological processes can be affected by changes in abiotic variables.

We propose that cushion plants are an ideal model to simultaneously address these limitations and better understand how the interactions between biotic and abiotic factors may structure soil

microbial communities. Cushion plants are a common growth form in alpine ecosystems (Körner, 2003) and provide a natural system with three main characteristics: (i) they are single or very dominant plants in a highly mineral matrix and can be seen as unique fertility hotspots in the desert, particularly in rocky landscapes with alpine cliffs where plant cover is very sparse or non-existent (Körner, 2003); (ii) they present a *de novo* soil formation resulting solely from the accumulation of its own living and dead tissues, thus reducing the confounding effect of other carbon sources that occur in mature soils; and (iii) they are broadly distributed along strong environmental gradients (e.g., elevation, bedrock). High mountain environments are characterized by low air and soil temperatures, high levels of solar radiation and wind exposure and strong effects on biotic communities (Körner, 2003). Consequently, cushion plants can be studied across broad altitudinal gradients to better understand how temperature and other associated abiotic factors that change with elevation can influence community and ecosystem properties. For these reasons, cushion plants have been extensively studied to determine how a single organism may modify local habitat conditions with consequences for the distribution and performance of other organisms. This type of non-trophic ecological interaction that strongly affects the community structure is referred to as ecosystem engineering (Jones et al., 1994, 1997). The low, compact stature and thick canopy of cushion plants is known to buffer temperatures and increase nutrient availability and water content compared to adjacent open areas (Arroyo et al., 2003; Cavieres et al., 2007; Yang et al., 2010; Anthelme et al., 2012). They are known to positively affect the richness of local plant (Badano et al., 2002; Arroyo et al., 2003; Badano and Cavieres, 2006; Cavieres et al., 2006; Antonsson et al., 2009; Sklenar, 2009; Yang et al., 2010; Anthelme et al., 2012; Molenda et al., 2012) and arthropod communities (Molina-Montenegro et al., 2006; Molenda et al., 2012). For instance, by maintaining their effect on temperature and nutrients, the positive effect of cushions on neighboring plants is accentuated by environmental stress (Arroyo et al., 2003; Badano and Cavieres, 2006; Antonsson et al., 2009; Yang et al., 2010; Anthelme et al., 2012). One can assume that cushion plants should similarly structure the composition of microbial communities within cliff soils along environmental gradients. Inside the cushion, we predict a convergence of microbial communities due to the local environmental buffering that is created by the cushion plant. Outside the cushion, we anticipate contrasting communities due to their response to bedrock type and elevation.

The goal of this study was to determine the extent to which cushions affect the abiotic characteristics of the surrounding soils and the associated bacterial and fungal communities along the elevation gradient and on different bedrock types. We chose *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) as our study species. This alpine species is common in fell-fields and cliff ecosystems. It forms large cushions (up to 60 cm in diameter), occurs over a large elevation range (from nearly 2000 to 3000 masl) and is able to grow on both calcareous and siliceous bedrocks. We collected soil from inside and outside of *S. acaulis* cushions on highly rocky slopes and cliffs, along replicated elevational transects in two mountain ranges that differed in bedrock type.

MATERIALS AND METHODS

STUDY SITE AND SAMPLE COLLECTION

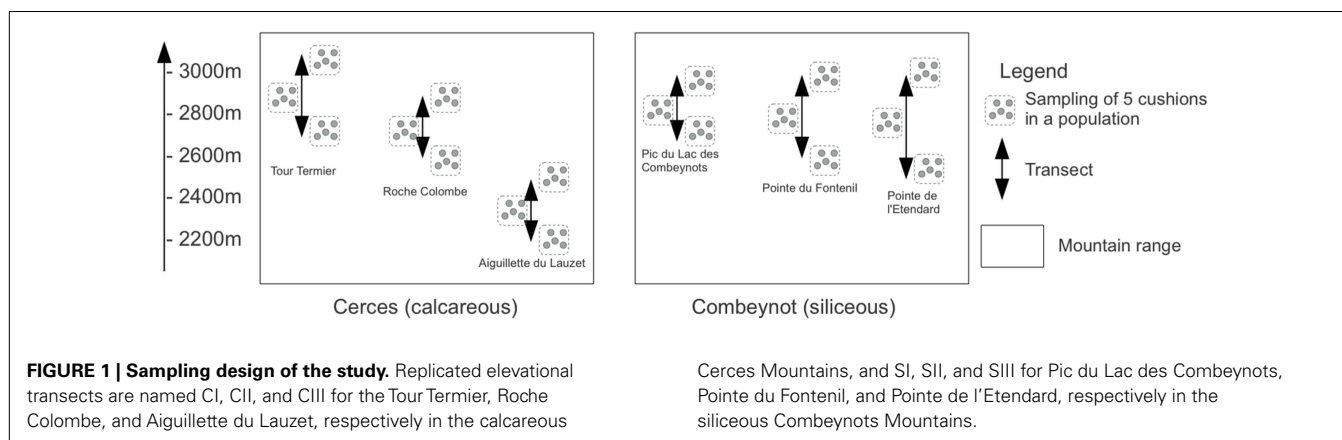
The fieldwork was conducted near the Lautaret Pass and the Station Alpine Joseph Fourier in the southern French Alps (Hautes-Alpes, 05) during September 2009. We investigated patches of cushion plants distributed along elevation gradients on steep, south-facing, rocky slopes and cliffs ranging from 2,000 to 3,000 masl. The sampling was conducted in two distinct mountain ranges: the calcareous Cerces and the siliceous Combeynots Mountains (Figure 1). In each mountain range, we selected three summits for sampling along elevation transects (summit names are indicated in Figure 1 and are referred to as CI, CII, CIII and SI, SII, SIII for calcareous and siliceous massifs, respectively). On each summit, we sampled three populations of *S. acaulis* along elevation (Figure 1). For each population, five cushions were randomly selected. For each cushion, three soil cores were sampled inside the cushion (In habitat), and three cores were collected 10–20 cm away from the cushion's edge (Out habitat). The three soil cores were pooled to yield five composite samples per habitat type and population. Soil cores were 5 cm deep and 5 cm in diameter. Due to the highly constrained sampling conditions, soil cores intended for microbial DNA analysis were conditioned in silica gel.

CHARACTERIZATION OF ABIOTIC CONDITIONS

Fresh soil sub-samples were used for measurements of the gravimetric soil water content (SWC) at 105°C and the soil pH in the water (Robertson et al., 1999). The total C and N soil contents were measured with a FlashEA 1112 CN elemental analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fresh soil sub-samples were also extracted for NO_3^- and NH_4^+ analysis by shaking for 1 h in 2 M KCl at 20°C, followed by filtration through Whatman paper. Soil extracts were analyzed for N - NO_3^- and N - NH_4^+ using standardized protocols on a Flow Solution IV colorimetric chain (OI-Analytical Corp., College Station, TX, USA).

MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS

The molecular profiles of bacterial and fungal communities were obtained by Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP), a method that does not permit the identification of microbial taxa but instead provides a high resolution, reproducible picture of microbial communities for a large number of samples (Zinger et al., 2007, 2008, 2011). Soil DNA extractions were completed with the Power-Soil Well Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratoires, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France). Because the DNA extraction kit was designed for wet soils, we performed extractions with varying masses of dry soil, followed by DNA quantification with a NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) and immediate verification by 1% agarose gel electrophoresis. Successful extraction was obtained with 0.07–0.10 g of soil. We amplified the V3 region of bacterial 16S RNA genes with the primers W49 (5'-ACGGTCCAGA CTCCTACGGG-3') and W104-FAM labeled (5'-TTACCG CGGCTGCTGGCAC-3') (Delbes et al., 2000) and the fungal ITS1 (Internal Transcribed Spacer) region with the primers ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3')



and ITS2-HEX labeled (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White et al., 1990). The PCR reactions (25 μ l) contained 2.5 mM $MgCl_2$, 1 U AmpliTaq GoldTM buffer, 20 $g\ l^{-1}$ bovine serum albumin, 0.1 mM each dNTP, 0.26 mM each primer, 2 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 10 ng DNA template. PCR was performed as follows for bacteria: an initial step at 95°C (10 min), followed by 30 cycles at 95°C (30 s), 56°C (15 s), and 72°C (20 s) and a final step at 72°C (7 min). For fungi, the PCR protocol was as follows: an initial step at 95°C (10 min), followed by 33 cycles at 95°C (30 s), 54°C (15 s), and 72°C (30 s) and a final step at 72°C (7 min). Community molecular fingerprints were obtained by submitting the PCR products to CE-SSCP analysis as previously described (Zinger et al., 2007). The fluorescence profiles corresponded to the abundance of sorted DNA fragments according to their length and nucleotide composition.

Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism analysis was performed on an ABI Prism 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) as described elsewhere (Zinger et al., 2008) and were visually checked individually. CE-SSCP profiles were normalized prior to statistical analysis.

DATA ANALYSIS

The abiotic characteristics were analyzed according to a generalized linear mixed model (Pinheiro and Bates, 2000) to account for the hierarchical sampling design and to test for the effect of the habitat type (In vs. Out), bedrock type (calcareous vs. siliceous), elevation (continuous, from approximately 2000 to 3000 m) and their interactions (“lmer” function of the “lme4” R package). Population (nested in Transect) and Transect (nested in Massif) levels were included as random factors, and elevation was defined as varying between transects. We tested the null model with random effects only and models that included all of the interactions terms for the fixed effects. The normality of the random factor and residuals were checked. The best models were selected according to AIC criteria (Akaike, 1974). The models were fitted using a maximum likelihood analysis for the comparison of nested models (Bates, 2010).

Pair-wise dissimilarities between microbial SSCP profiles were calculated with the Bray–Curtis distance (Legendre and Legendre, 1998). The resulting dissimilarity matrices were ordinated by Principal Coordinate Analysis (PCoA) (Legendre and Legendre, 1998). We used a vector-fitting approach to identify the directions in the microbial ordination space toward which a given environmental variable changed the most (Oksanen et al., 2011). To test the respective effects of habitat, elevation, and bedrock and their interactions on the microbial assemblage variation, we performed a non-parametric multivariate analysis of variance (Anderson, 2001) using the “adonis” function in the “vegan” R package (Oksanen et al., 2011). To test whether the significance of the factors changed with the spatial scale, we permuted samples between all conditions (within Population, within Transect, and within Massif) using the “strata” argument of the “adonis” function when appropriate. The non-parametric multivariate analysis was designed to test for differences in groups’ centroids, that is, a strict difference in community composition. However, the test is sensitive to differences in the multivariate dispersion from the centroid (Anderson, 2001). To disentangle both phenomena and because differences in multivariate dispersion are important for understanding the ecological effect of a factor, we tested whether the multivariate dispersion value differed between In and Out habitats (Anderson et al., 2006) using the “betadisper” function of the “vegan” R package. Multivariate dispersion is a measure of beta-diversity (Anderson et al., 2006). Mantel tests were used to assess the correlation between the dissimilarities and environmental distances of the microbial communities (Legendre and Legendre, 1998). All factors were tested for significance using the mean of 999 Monte-Carlo permutations. Finally, we measured the Bray–Curtis distance between the In and Out communities for each individual cushion according to the sampling design (hereafter, In-Out beta-diversity). We analyzed the relationship between bacterial and fungal In-Out beta-diversity and environmental dissimilarities as well as bedrock (considered as a factor with two levels) and elevation (considered as a continuous variable) using generalized linear mixed models, as described above, for the abiotic parameters.

All of the statistical analyses were conducted with R 2.13.0 software (R Development Core Team, 2011) using the packages “lme4” 0.999999-0 (Bates et al., 2011), “stats” (R Development Core Team, 2011), and “vegan” 1.17-11 (Oksanen et al., 2011).

RESULTS

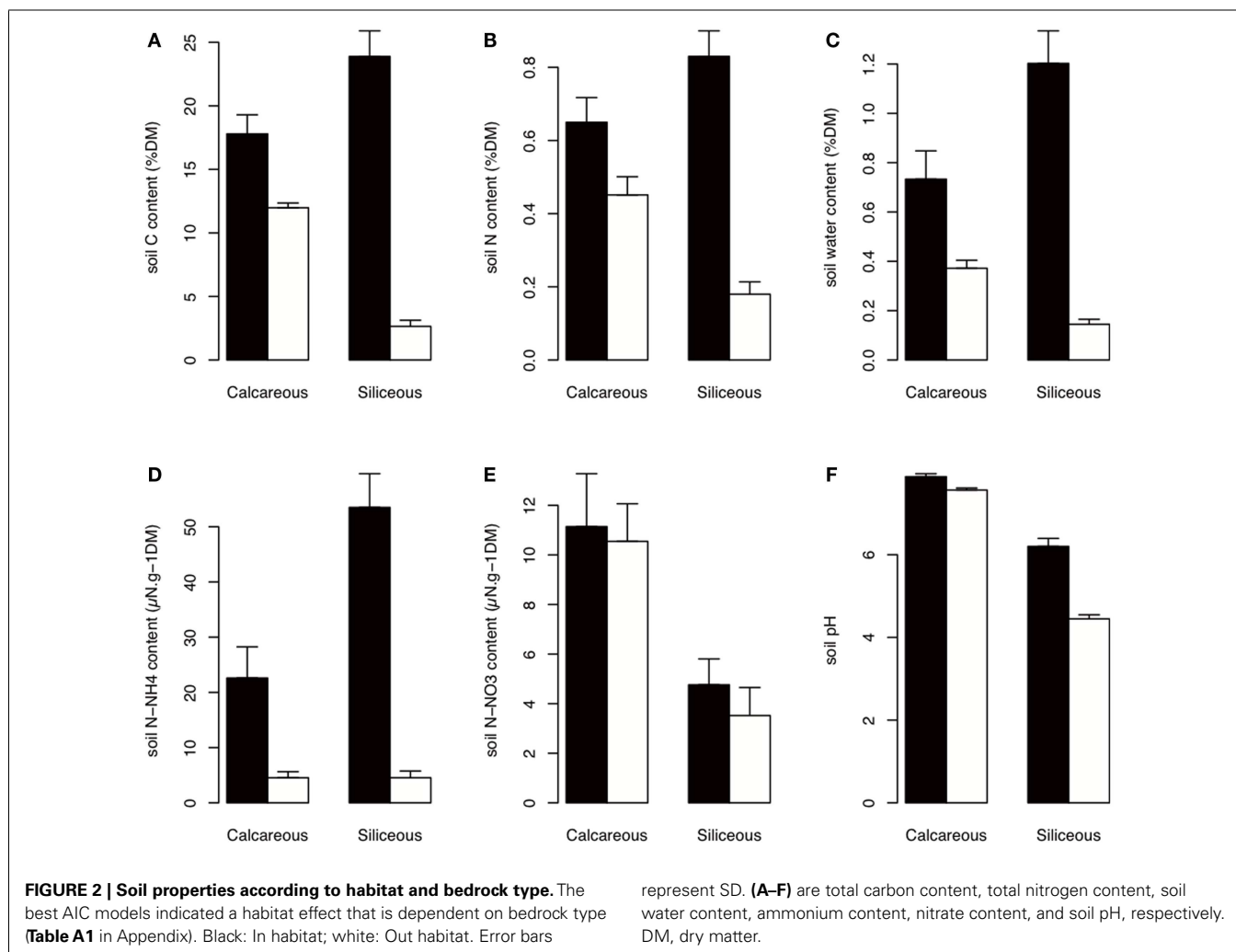
SOIL CHARACTERISTICS AND ENVIRONMENTAL CONTEXT

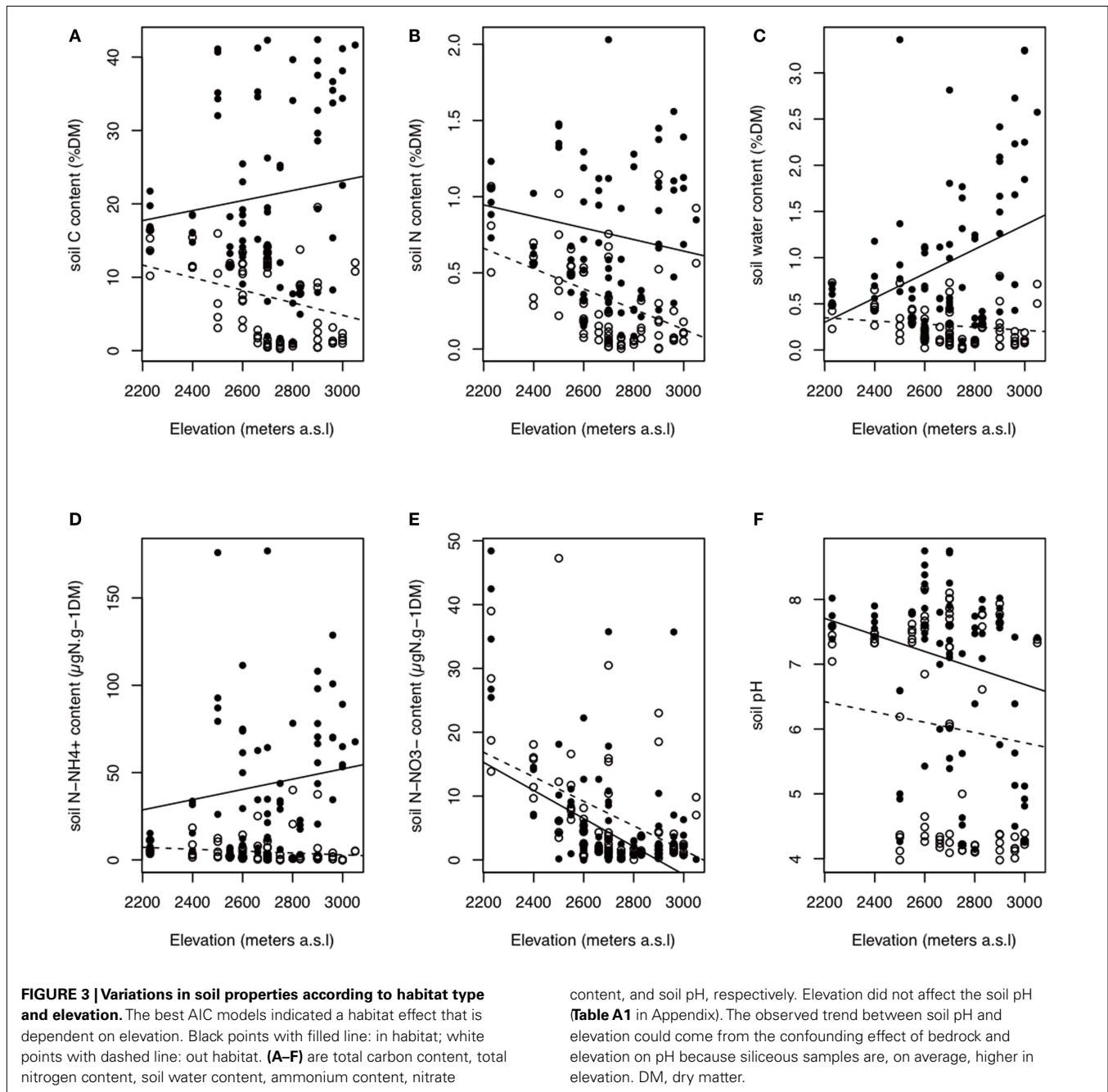
The soil nutrients were influenced by bedrock type, habitat, and elevation (Figures 2 and 3; Table A1 in Appendix). The C, N, H₂O, and N - NH₄⁺ contents of In habitat were (i) higher than those of Out habitat, (ii) higher on siliceous bedrock than on calcareous bedrock and (iii) increased with elevation (Figures 2 and 3; Table A1 in Appendix). Conversely, the C, N, and H₂O contents of Out habitat were (i) higher on calcareous than on siliceous bedrock (Figure 2) and (ii) decreased with increasing elevation (Figure 3; Table A1 in Appendix). It should be noted that in samples from the calcareous bedrock the determination of total carbon likely includes significant inorganic carbonates; although the difference in total carbon between the In and Out samples reflects primarily an increase in organic carbon for the In samples. Soil N-NO₃⁻ was highly variable (Table A1 in Appendix). Soil N-NO₃⁻ was mainly higher on calcareous bedrock and decreased with elevation (Figures 2 and 3; Table A1 in Appendix). The soil pH was strongly determined by bedrock type and was higher on calcareous bedrock. The measured differences in Out habitats between both bedrocks were strongly buffered inside cushions, with pH strongly increasing in In habitat of siliceous

bedrock (Figure 2). Soil pH was not affected by elevation (Table A1 in Appendix).

BACTERIAL PATTERNS

The bacterial communities were mainly and significantly affected by bedrock types (F -ratio = 18.262, $R^2 = 0.088$, $P = 0.001$; Table 1), as illustrated in the PCoA ordination and environmental fitting, which highlights the great dissimilarities between siliceous and calcareous Out communities along the pH gradient ($R^2 = 0.27$, $P = 0.001$). Variation partitioning revealed a significant effect of habitat on bacterial community dissimilarity variation (F -ratio = 5.902, $R^2 = 0.028$, $P = 0.001$; Table 1), regardless of the strategy that was adopted in the permutation procedure (Table A3 in Appendix). Calcareous and siliceous In communities were more similar and less variable than Out communities (avg. distance to centroid: Out = 0.09782, In: 0.07812, F -value = 17.1, $P < 0.001$; Figure 4A). Communities in In habitats displayed intermediate features along the pH gradient on the PCoA ordination and differentiated from Out communities along soil nutrient and water content gradients (N-NO₃⁻: $R^2 = 0.08$, $P = 0.002$; N: $R^2 = 0.074$, $P = 0.004$; C: $R^2 = 0.07$, $P = 0.006$; SWC: $R^2 = 0.05$, $P = 0.02$; Figure 4A). Furthermore,





the In-Out beta-diversity was related to the paired In-Out pH distance and was higher and more pronounced on siliceous bedrock (Figure 5A; Table A2 in Appendix). Finally, the bacterial communities were marginally affected by elevation, and this response was dependent on the bedrock type (Table 1). A detailed analysis using the Mantel test revealed that bacterial communities respond to elevation solely in Out habitat on siliceous bedrock (Out habitat: Spearman rank $\rho = 0.12$, $P = 0.03$ and $\rho = 0.05$, $P = 0.22$ for siliceous and calcareous bedrock, respectively; In habitat: $P > 0.05$ for siliceous and calcareous bedrock).

FUNGAL PATTERNS

The variation partitioning on fungal community dissimilarities (Table 1) revealed equal and significant effects of habitat (F -ratio = 5.004, $R^2 = 0.026$, $P = 0.001$), bedrock (F -ratio = 5.843, $R^2 = 0.030$, $P = 0.001$), and elevation (F -ratio = 6.014, $R^2 = 0.031$, $P = 0.001$) as well as a significant effect of the habitat, bedrock, and elevation interactions (F -ratio = 1.654, $R^2 = 0.009$, $P = 0.041$). The effect of habitat and elevation was significant regardless of the permutation strategy (Table A3 in Appendix). In contrast to bacteria, the fungal dissimilarities were related to SWC ($R^2 = 0.18$, $P = 0.001$), C ($R^2 = 0.12$,

Table 1 | Respective effects of habitat, bedrock, and elevation on microbial beta-diversity, as assessed by variation partitioning on Bray–Curtis dissimilarity matrices obtained from CE-SSCP profiles.

Taxa	Factors	Df	SS	MS	FR	R ²	Pr(>F)
Bacteria	Habitat	1	0.046	0.046	5.902	0.028	0.001
	Bedrock	1	0.142	0.142	18.262	0.088	0.001
	Elevation	1	0.026	0.026	3.302	0.016	0.004
	Habitat: bedrock	1	0.068	0.068	8.747	0.042	0.001
	Habitat: elevation	1	0.005	0.005	0.697	0.003	0.666
	Bedrock: elevation	1	0.015	0.015	1.876	0.009	0.070
	Habitat: bedrock: elevation	1	0.012	0.012	1.563	0.008	0.126
	Residuals	168	1.304	0.008	NA	0.806	NA
	Total	175	1.617	NA	NA	1.000	NA
Fungi	Habitat	1	0.552	0.552	5.004	0.026	0.001
	Bedrock	1	0.644	0.644	5.843	0.030	0.001
	Elevation	1	0.663	0.663	6.014	0.031	0.001
	Habitat: bedrock	1	0.259	0.259	2.353	0.012	0.002
	Habitat: elevation	1	0.137	0.137	1.244	0.006	0.199
	Bedrock: elevation	1	0.232	0.232	2.102	0.011	0.010
	Habitat: bedrock: elevation	1	0.182	0.182	1.654	0.009	0.041
	Residuals	168	18.522	0.110	NA	0.874	NA
	Total	175	21.191	NA	NA	1.000	NA

The models also include the interaction effects on the microbial assemblages. Df, degrees of freedom; SS, sum of square; MS, mean square; FR, pseudo F-ratio; R², partial variance explained by the factor, Pr(>F), P-value. Colons in factors indicate interactions. The effect of habitat type was significant regardless of the permutation strategy adopted, i.e., when samples were permuted within each Population, Transect, Massif or without strata **Table A3**.

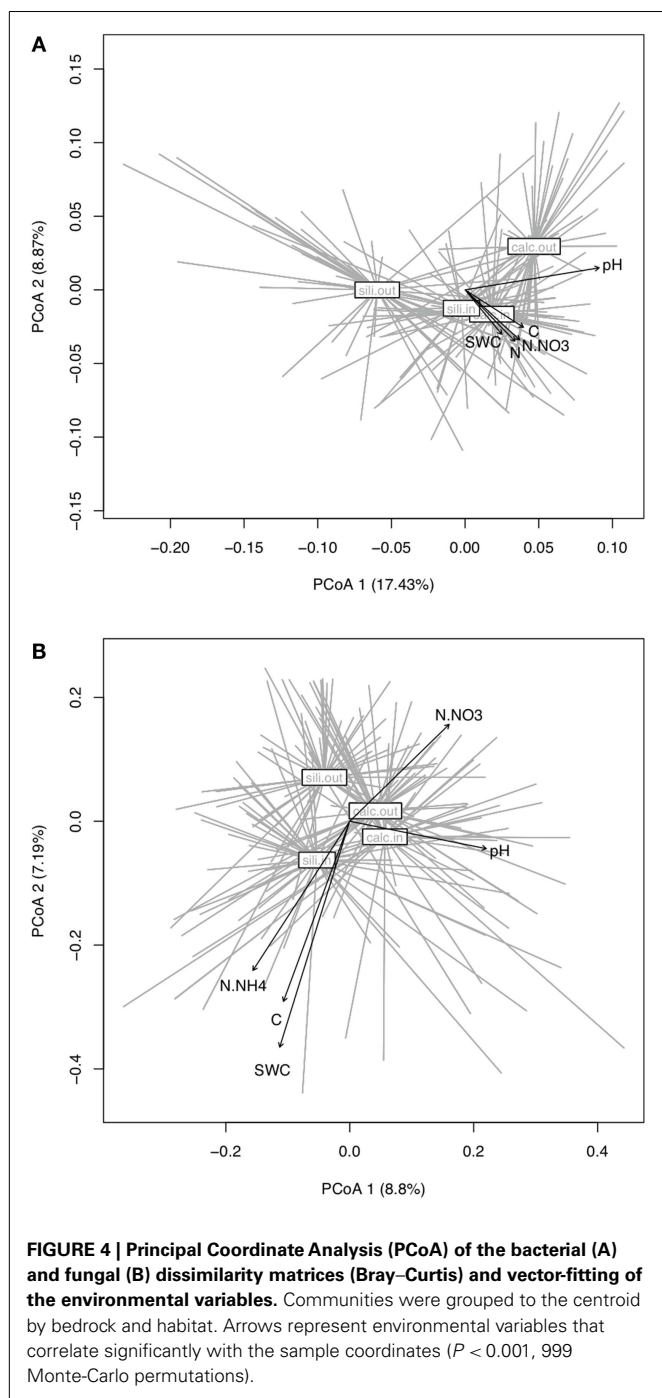
$P = 0.001$), $N-NH_4^+$ ($R^2 = 0.10$, $P = 0.001$) and, to a lesser extent, $N-NO_3^-$ ($R^2 = 0.06$, $P = 0.006$) and pH ($R^2 = 0.06$, $P = 0.007$). The compositions of fungal communities in In and Out habitats were equally variable (**Figure 4B**, avg. distance to centroid: Out = 0.3255, In = 0.3412, F -value = 3.09, $P = 0.192$). However, the beta-diversity patterns in In habitat differed from that of Out habitat, as illustrated by the direction of variation for Out and In communities between siliceous and calcareous communities (**Figure 4B**). Community dissimilarities in In habitats increased with environmental dissimilarities, particularly C, N - NH_4^+ , and SWC (Mantel test, Spearman rank $\rho = 0.27$, 0.25, 0.19 for C, SWC, N - NH_4^+ , respectively, $P < 0.005$). The Mantel correlations were still significant when controlling for geographic distances or elevation (partial Mantel test, $P > 0.05$). Community dissimilarities in In habitat also increased with differences in elevation (Spearman rank $\rho = 0.29$, $P = 0.002$ and $\rho = 0.22$, $P = 0.001$ for calcareous and siliceous bedrock, respectively). Conversely, Out community dissimilarities were only weakly correlated with soil pH (Spearman rank $\rho = 0.07$, $P < 0.001$), which is significant even when controlling for geographic distance and elevation ($P < 0.05$), but did not correlate with differences in elevation ($P > 0.05$). Finally, In-Out beta-diversity was higher on siliceous bedrock and at high elevations (**Figures 4B** and **5B,C**). However, In-Out beta-diversity did not correlate with the respective paired In-Out environmental distances (**Table A2**).

DISCUSSION

Cushion plants affect the composition of both bacterial and fungal communities weakly but significantly, despite variability in both

In and Out communities (**Table 1**; **Figure 4**). This relationship was observed regardless of the strategy that was adopted in the permutation procedure that was used for variance partitioning. This result emphasizes the multiple-scale effect of cushion plants on microbial community composition, from the population level to the scale of the whole study, which spans two mountain ranges with distinct bedrock types. Interestingly, we observed contrasting responses of the bacterial and fungal communities to the biotic and abiotic environments.

The bacterial communities in Out habitat were predominantly affected by bedrock type and, to a lesser extent, elevation. By contrast, beta-diversity in In habitat was strongly reduced, indicating a convergence of the communities under the cushions on both calcareous and siliceous bedrock and at both high and low elevation. Furthermore, the In-Out bacterial beta-diversity was correlated with pH. Soil pH was thus the best and main variable for explaining the patterns of bacterial beta-diversity among In and Out habitats. We also identified a response to elevation that may be linked to the shift in the nutrient content (**Table 1**; **Figure 3**; **Table A1** in Appendix) because the shift in community composition occurred on siliceous bedrock only. The strong bedrock effect on community composition led to the selection of different bacterial communities according to the bedrock (**Table 1**). Soil pH is a well-known key factor influencing bacterial richness and community composition (Fierer and Jackson, 2006; Hogberg et al., 2007; Zinger et al., 2011; Shahnavaz et al., 2012). On average, the soil pH varied by ~ 3.5 U (from 3.5 to 8.5) among bedrock types (**Figure 2**) but only ~ 1 U (from 6 to 8.5) among cushions that were established on calcareous and siliceous bedrock types due to an increase in the

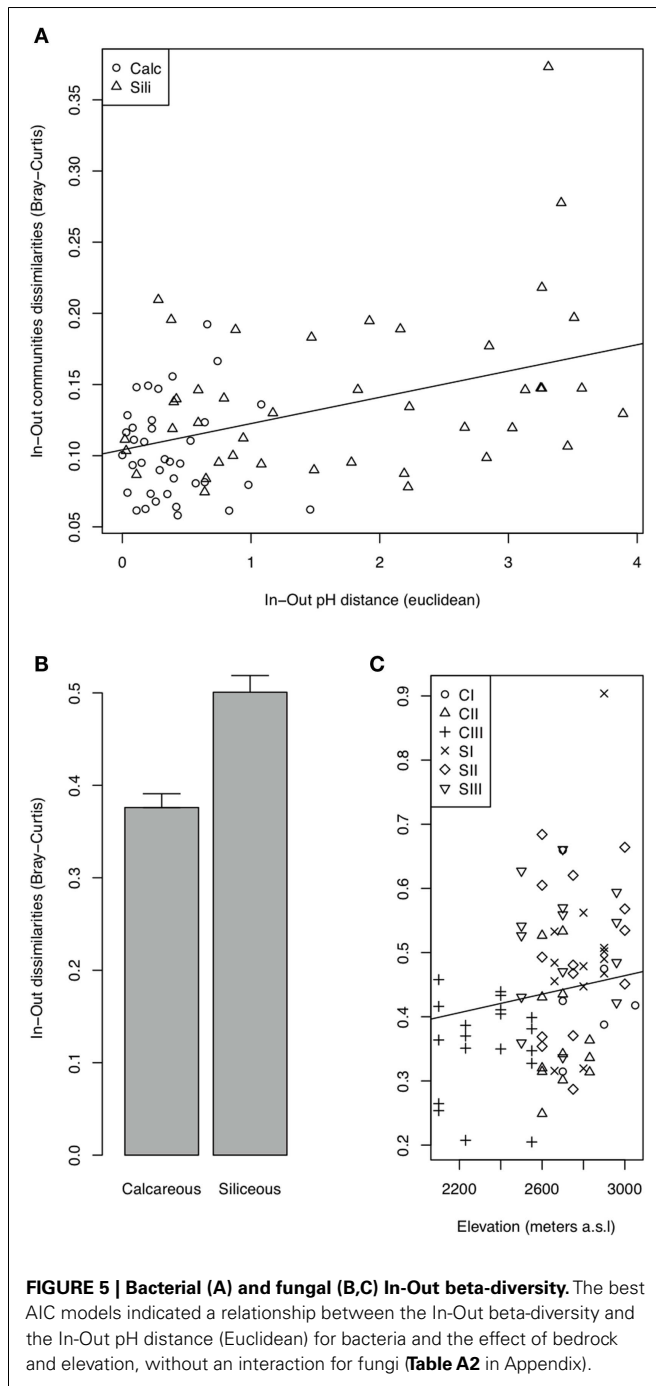


soil pH inside the cushions that were located on siliceous bedrock (Figure 2). Lauber et al. (2009) observed that the effect of pH was particularly strong in acidic conditions and, more generally, when soil pH ranged between 4 and 6, leveling off above pH 6. Our experiment was not designed to identify the source of In communities, and more information about the species distributions or dispersal would be necessary to determine their sources. However the reduction of bacterial beta-diversity, together with the similarity of certain Out and In communities that was observed in PCoA ordination (Figure 4A) and the relatively weak values

of the In-Out beta-diversity (Figure 5A), suggests that bacterial communities in In habitats are likely a subset of the bacterial communities in Out habitats. Such a feature is consistent with earlier reports suggesting that the soil surrounding plants seems to constitute the main source of rhizospheric microbial communities (Berg and Smalla, 2009). By providing a more homogeneous habitat with consistently enhanced C, N, $N - NH_4^+$, and SWC content and buffered soil pH, the cushions of *S. acaulis* act as a biotic filter on bacterial beta-diversity that counteracts the influence of the local environmental context, particularly bedrock type, likely recruiting and/or excluding bacterial taxa that contribute to the outside cushion community variability.

The patterns of the fungal communities were less obvious and much more variable than those of the bacterial communities. The fungal communities from In habitats were as variable as those from Out habitats (Figure 4B; Table 1), with several differences. The differences between Out communities were mainly but weakly related to soil pH, reflecting differences in community compositions between bedrock types (Figure 4B). By contrast, differences between In communities correlated with soil C, N - NH_4^+ , and SWC, reflecting differences between cushions established on calcareous or siliceous bedrocks and at low or high elevation (Figure 4B; Table 1). The weak effect of soil pH on fungal communities compared to that observed for bacteria has already been reported in both arable (Rousk et al., 2010) and alpine grasslands soils (Zinger et al., 2011). These studies further reveal that fungal beta-diversity is instead related to soil nutrient status, and our results confirmed this trend. The effect of pH in Out habitats is overwhelmed in In habitats by the response of fungi to nutrient content. The absence of plants in Out habitat, together with nutrient limitations and the combined disturbance of oscillating climatic extremes and soil movement typical in alpine soils (Körner, 2003), could preclude the growth and hamper the hyphal proliferation of many fungi due to their typical mycorrhizal or saprophytic status, which is supported by the difficulties we encountered in amplifying fungal DNA from these samples. Thus, we hypothesize that by providing a nutritional resource and stable substrate, cushions sustain the growth of many more fungi than do open areas. In this sense, a study in the Andean alpine ecosystem reported that cushions of *A. madreporica* contain more spores of AM fungi than retrieved on open areas (Casanova-Katny et al., 2011). Overall, there is a strong link between the soil nutritive status of cushions, the environmental context in which they established and the associated fungal communities. Furthermore, cushions counteracted the effect of pH on the fungal community composition. As observed for bacteria, fungal beta-diversity patterns in In habitats differed from the ones in Out habitats.

The higher variability observed in fungal patterns compared to bacteria and the low variability that we were able to explain could be due to several factors. We followed different molecular markers; the V3 region of the 16S rRNA gene (bacterial marker) is most likely more phylogenetically conserved than the ITS1 region (fungal marker) (Brown et al., 2005). Other studies using the same or other molecular markers have also reported that fungal community patterns are difficult to interpret, yielding minimally explanatory models (Costa et al., 2006; Mougél et al., 2006; Hovatter et al., 2011; Zinger et al., 2011), which may be due to the patchy



distribution of soil fungi (Manter et al., 2010). The response of bacteria and fungi to abiotic variables was still significant after controlling for geographic distance, which supports the link between microbial community composition and its response to environmental gradients, but key environmental variables or the appropriate spatial scale may also not have been considered for fungi.

Finally, the magnitude of the change in the microbial community composition between In and Out habitats (In-Out beta-diversity) varied along environmental gradients (Figure 5). The In-Out bacterial beta-diversity was correlated with the

modification of soil pH and was, therefore, higher on siliceous bedrock (Figure 5A; Table A2 in Appendix). Moreover, bacterial communities responded to elevation solely in Out habitat on siliceous bedrock, supporting a strong cushion effect on siliceous bedrock. Because the fungi responded more strongly to soil nutrients, the In-Out fungal beta-diversity was higher on siliceous bedrock and at high elevations (Figure 5B; Table A2 in Appendix). On siliceous bedrock and at high elevations, conditions in Out habitat were more acidic (siliceous bedrock) and nutrient-limited (siliceous bedrock and at high elevation). Interestingly, the cushions located in these constrained conditions were richer in nutrients than cushions located in less constrained conditions, and strongly modified the soil pH (Figures 2 and 3), resulting in significant and even stronger ecosystem engineering. Although the In-Out fungal beta-diversity did not correlate with the respective abiotic modifications, it was generally higher at sites where the abiotic modification was higher. The fact that we did not observe pair-wise relationships may be because different factors structured the fungal communities in In and Out habitats. Thus, our observations indicate that the link between microbes and abiotic modification depends on the intensity of the abiotic stress mitigated by engineering organisms, as concluded in earlier works (Wright et al., 2006; Navel et al., 2012), but we suggest that a plant factor could be involved, either directly (via intraspecific variability) or indirectly (via physiological response to environmental harshness). Overall, these results suggest that the selective effect of cushions on bacterial and fungal communities could be particularly strong under more extreme conditions.

There is a growing body of evidence suggesting that cushion plants represent benefactor species or “nurse plants” that facilitate the recruitment of other plants (Arroyo et al., 2003; Cavieres et al., 2006; Antonsson et al., 2009) and arthropods (Molina-Montenegro et al., 2006; Molenda et al., 2012). Several studies have reported that the magnitude of facilitation by cushion plants, including *S. acaulis*, increases with environmental stress in alpine and arctic biomes on several mountains worldwide (Arroyo et al., 2003; Cavieres et al., 2006; Antonsson et al., 2009; Yang et al., 2010; Anthelme et al., 2012). These studies note that the local amelioration of climatic variables (e.g., temperatures) is involved (Arroyo et al., 2003; Cavieres et al., 2007), although nutrient enrichment is also a factor (Yang et al., 2010; Anthelme et al., 2012) and is more pronounced under stressful conditions, as observed here for nutrients, water and microbial communities. Our study opens a new avenue to understanding the ecology of these nurse plants from a microbial perspective. Several studies have reported that microbes act as the third party in plant–plant interactions (Callaway et al., 2007). Further work is needed to establish the linkages between plant–microbe interactions and plant–plant interactions in this particular model. For instance, it has been demonstrated that native plant species growing inside cushions in Andean alpine environments display enhanced AM mycorrhizal status compared to those growing outside (Casanova-Katny et al., 2011). Different functional groups of microbes can have different roles in the functioning of the cushion system or different links with the plant species that grow inside cushions. In this study, we demonstrated that bacteria and fungi differed in their relationships to

the modification of soil abiotic properties by cushions. Additional studies are needed to disentangle the influence of microbial communities on the recruitment of taxa at higher trophic levels as well as how that recruitment influences the microbial communities that are associated with cushions. Plants growing inside cushions could influence the composition of soil microbes and their response to environmental gradients through mycorrhizal interactions or by providing new sources of organic matter.

It is possible that the cushion effect that was observed here could be applicable to other non-cushion-forming alpine plants because of possible similar abiotic modifications via organic matter deposition. Nevertheless, our results support the view that *S. acaulis* is a foundation species in the alpine ecosystem (Molenda et al., 2012) because of its effect on the structure of many trophic levels (Antonsson et al., 2009; Molenda et al., 2012). Overall, cushions constitute a unique habitat in extreme cliff ecosystems with modified local habitat conditions. Their presence significantly affects the beta-diversity patterns of bacterial and fungal communities. The bacterial and fungal communities do not respond similarly to the presence of cushions, likely because they are not sensitive to the same set of abiotic soil parameters. For both communities, the plants induce different responses to bedrock and elevation compared to the outside, but the response was inverse between bacteria and fungi; while plants had a buffering effect on bacterial communities, they exacerbated the response of fungi to bedrock and elevation. Our results support that habitat type differentially influences the distribution of soil microbes (Fierer et al., 2011; Hovatter et al., 2011) and that their response to environmental gradients depends on the taxa and microbial domain investigated

(Singh et al., 2012; Wang et al., 2012). We demonstrated that there might be fundamental differences in the mechanisms underlying these molecular diversity patterns. Dissimilarities in the bacterial and fungal community between In and Out habitats were both positively related to the magnitude of habitat modification (i.e., higher in harsher conditions). Our results stress the need for integrated studies of the nurse effect of alpine cushions in which great attention should be paid to the role of microorganisms and their distribution in determining the outcome of plant–plant interactions and the biogeochemical functioning of these islands of fertility.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was conducted at the long-term research site Zone Atelier Alpes, in the ILTER-Europe network. We are grateful to the Station Alpine Joseph Fourier (SAJF) for providing field logistics and facilities during the field campaign. We would like to thank Guillaume Côté Maurais and Fabien Quérier for their help during field sampling and Armelle Monier for her help during soil DNA extraction and PCR amplification. We thank the CNRS-LECA for providing funding to a group of young researchers to run the “Vertical Ecology” project. The ANR project Diversitalp (ANR-07-BDIV-014) also contributed to this project. We thank the three anonymous reviewers and the editor for their helpful suggestions on an earlier version of this manuscript. J. Roy received a grant from the French Ministère de la Recherche. C. H. Albert was supported by a Marie Curie International Outgoing Fellowship within the 7th European Community Framework Program (DYVERSE, no. 272284).

REFERENCES

- Akaike, H. (1974). New look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19, 716–723.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46.
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., and McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta-diversity. *Ecol. Lett.* 9, 683–693.
- Anthelme, F., Buendia, B., Mazoyer, C., and Dangles, O. (2012). Unexpected mechanisms sustain the stress gradient hypothesis in a tropical alpine environment. *J. Veg. Sci.* 23, 62–72.
- Antonsson, H., Björk, R. G., and Molau, U. (2009). Nurse plant effect of the cushion plant *Silene acaulis* (L.) Jacq. in an alpine environment in the subarctic Scandes, Sweden. *Plant Ecol. Divers. (Print)* 2, 17–25.
- Arroyo, M. T. K., Cavieres, L. A., Penalzoa, A., and Arroyo-Kalin, M. A. (2003). Positive associations between the cushion plant *Azorella monantha* (Apiaceae) and alpine plant species in the Chilean Patagonian Andes. *Plant Ecol.* 169, 121–129.
- Badano, E. I., and Cavieres, L. A. (2006). Impacts of ecosystem engineers on community attributes: effects of cushion plants at different elevations of the Chilean Andes. *Divers. Distrib.* 12, 388–396.
- Badano, E. I., Molina-Montenegro, M. A., Quiroz, C., and Cavieres, L. A. (2002). Effects of the cushion plant *Oreopolus glacialis* (Rubiaceae) on species richness and diversity in a high-Andean plant community of central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75, 757–765.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266.
- Bates, D. M. (2010). *lme4: Mixed-Effects Modeling with R*. New York: Springer.
- Bates, D., Maechler, M., and Bolker, B. (2011). *lme4: Linear Mixed-Effects Models Using Eigen and S4*. *R Package Version 0.999375-39*. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Berg, G., and Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13.
- Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I., and Fuhrman, J. A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7, 1466–1479.
- Bryant, J. A., Lamanna, C., Morlon, H., Kerkhoff, A. J., Enquist, B. J., and Green, J. L. (2008). Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 11505–11511.
- Callaway, R. M., Howard, T. G., Esser, K., Löttge, U., Beyschlag, W., and Murata, J. (2007). *Competitive Networks, Indirect Interactions, and Allelopathy: A Microbial Viewpoint on Plant Communities*. *Progress in Botany*. Berlin: Springer.
- Casanova-Katny, M. A., Torres-Mellado, G. A., Palfner, G., and Cavieres, L. A. (2011). The best for the guest: high Andean nurse cushions of *Azorella madreporica* enhance arbuscular mycorrhizal status in associated plant species. *Mycorrhiza* 21, 613–622.
- Cavieres, L. A., Badano, E. I., Sierra-Almeida, A., Gomez-Gonzalez, S., and Molina-Montenegro, M. A. (2006). Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytol.* 169, 59–69.
- Cavieres, L. A., Badano, E. I., Sierra-Almeida, A., and Molina-Montenegro, M. A. (2007). Microclimatic modifications of cushion plants and their consequences for seedling survival of native and non-native herbaceous species in the high Andes of central Chile. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 39, 229–236.
- Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., and Smalla, K. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 236–249.

- Delbes, C., Moletta, R., and Godon, J. (2000). Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction – single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, 506–515.
- Eskelinen, A., Stark, S., and Mannisto, M. (2009). Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* 161, 113–123.
- Eviner, V. T., and Chapin, F. S. (2003). Functional matrix: a conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 455–485.
- Fierer, N., and Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 626–631.
- Fierer, N., McCain, C. M., Meir, P., Zimmermann, M., Rapp, J. M., Silman, M. R., et al. (2011). Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92, 797–804.
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., and Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257.
- Hogberg, M. N., Hogberg, P., and Myrold, D. D. (2007). Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia* 150, 590–601.
- Hovatter, S. R., DeJelo, C., Case, A. L., and Blackwood, C. B. (2011). Metacommunity organization of soil microorganisms depends on habitat defined by presence of *Lobelia siphilitica* plants. *Ecology* 92, 57–65.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., and Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., and Shachak, M. (1997). Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957.
- Körner, C. (2003). *Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*. Berlin: Springer.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., De Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., and Van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 509–520.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., and Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2407–2415.
- Legendre, P., and Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Manter, D. K., Weir, T. L., and Vivanco, J. M. (2010). Negative effects of sample pooling on PCR-based estimates of soil microbial richness and community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2086–2090.
- Molenda, O., Reid, A., and Lortie, C. J. (2012). The alpine cushion plant *Silene acaulis* as foundation species: a bug's-eye view to facilitation and microclimate. *PLoS ONE* 7:e37223. doi: 10.1371/journal.pone.0037223
- Molina-Montenegro, M. A., Badano, E. L., and Cavieres, L. A. (2006). Cushion plants as microclimatic shelters for two ladybird beetles species in alpine zone of central Chile. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 38, 224–227.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C., et al. (2006). Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytol.* 170, 165–175.
- Navel, S., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Chauvet, E., and Marmonier, P. (2012). Sedimentary context controls the influence of ecosystem engineering by bioturbators on microbial processes in river sediments. *Oikos* 121, 1134–1144.
- Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., et al. (2011). *vegan: Community Ecology Package. R Package Version 1.17-6*. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pinheiro, J. C., and Bates, D. M. (2000). *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. New York: The Statistics and Computing Series, Springer-Verlag.
- R Development Core Team. (2011). “R: A Language and Environment for Statistical Computing”. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>.
- Robertson, G. P., Coleman, D. C., Bledsoe, C. S., and Sollins, P. (1999). *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. New York: Oxford University Press.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., et al. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4, 1340–1351.
- Shahnazar, B., Zinger, L., Lavergne, S., Choler, P., and Geremia, R. A. (2012). Phylogenetic clustering reveals selective events driving the turnover of bacterial community in alpine tundra soils. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 44, 232–238.
- Singh, D., Takahashi, K., Kim, M., Chun, J., and Adams, J. M. (2012). A hump-backed trend in bacterial diversity with elevation on Mount Fuji, Japan. *Microb. Ecol.* 63, 429–437.
- Sklenar, P. (2009). Presence of cushion plants increases community diversity in the high equatorial Andes. *Flora* 204, 270–277.
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., and Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310.
- Wang, J. J., Sojininen, J., Zhang, Y., Wang, B. X., Yang, X. D., and Shen, J. (2012). Patterns of elevational beta-diversity in micro- and macro-organisms. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21, 743–750.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. San Diego: Academic Press.
- Wright, J. P., Jones, C. G., Boeken, B., and Shachak, M. (2006). Predictability of ecosystem engineering effects on species richness across environmental variability and spatial scales. *J. Ecol.* 94, 815–824.
- Yang, Y., Niu, Y., Cavieres, L. A., and Sun, H. (2010). Positive associations between the cushion plant *Arenaria polytrichoides* (Caryophyllaceae) and other alpine plant species increase with altitude in the Sino-Himalayas. *J. Veg. Sci.* 21, 1048–1057.
- Zinger, L., Gury, J., Alibeu, O., Rioux, D., Gielly, L., Sage, L., et al. (2008). CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *J. Microbiol. Methods* 73, 209.
- Zinger, L., Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P., et al. (2007). Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb. Ecol.* 54, 203–216.
- Zinger, L., Lejon, D. P. H., Baptist, F., Bouasria, A., Aubert, S., Geremia, R. A., et al. (2011). Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS ONE* 6:e19950. doi:10.1371/journal.pone.0019950

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 09 November 2012; accepted: 05 March 2013; published online: 27 March 2013.

Citation: Roy J, Albert CH, Ibanez S, Saccone P, Zinger L, Choler P, Clément J-C, Lavergne S and Geremia RA (2013) Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. *Front. Microbiol.* 4:64. doi: 10.3389/fmicb.2013.00064

This article was submitted to *Frontiers in Terrestrial Microbiology, a specialty of Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2013 Roy, Albert, Ibanez, Saccone, Zinger, Choler, Clément, Lavergne and Geremia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

APPENDIX

Table A1 | Model selection of fixed effects and interactions explaining the variation in soil properties.

Soil characteristic	Model	p	AIC	deltaAIC
Soil C content	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	1102.6	0
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock	7	1103.8	1.2
	Habitat + bedrock + habitat: bedrock	4	1104.3	1.7
	Habitat × elevation × bedrock	8	1105.7	3.1
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock	5	1106.1	3.5
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock	6	1107.3	4.7
	Habitat + elevation + elevation: habitat	4	1126.1	23.5
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation	5	1126.7	24.1
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat	6	1127.7	25.1
	Habitat	2	1139	36.4
	Habitat + bedrock	3	1140.1	37.5
	Habitat + elevation	3	1140.9	38.3
	Habitat + elevation + bedrock	4	1141.8	39.2
	Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation	5	1142.8	40.2
	1	1	1220.3	117.7
	Bedrock	2	1221.8	119.2
	Elevation	2	1222.3	119.7
	Bedrock + elevation	3	1223.8	121.2
	Elevation + bedrock + elevation: bedrock	4	1225.3	122.7
	Soil N content	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	82.3
Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock		5	83.2	0.9
Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock		7	83.9	1.6
Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock		6	84.7	2.4
Habitat + elevation + elevation: habitat		4	85.3	3
Habitat × elevation × bedrock		8	85.9	3.6
Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation		5	86.6	4.3
Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat		6	88.2	5.9
Habitat + bedrock + habitat: bedrock		4	90.2	7.9
Habitat + elevation		3	90.6	8.3
Habitat + elevation + bedrock		4	92	9.7
Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation		5	93.5	11.2
Habitat		2	95.7	13.4
Habitat + bedrock		3	97.7	15.4
Elevation		2	130.4	48.1
Bedrock + elevation		3	131.6	49.3
Elevation + bedrock + elevation: bedrock		4	133.4	51.1
1		1	133.6	51.3
Bedrock		2	135.6	53.3
Soil N-NO3 content		Habitat × elevation × bedrock	8	1070.2
	Elevation + bedrock + elevation: bedrock	4	1071	0.8
	Elevation	2	1071.6	1.4
	Bedrock + elevation	3	1072	1.8
	Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation	5	1072.5	2.3
	Habitat + elevation	3	1073.2	3
	Habitat + elevation + bedrock	4	1073.6	3.4
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock	6	1074.1	3.9
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat	6	1074.2	4
	Habitat + elevation + elevation: habitat	4	1074.8	4.6
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock	5	1075.1	4.9

(Continued)

Table A1 | Continued

Soil characteristic	Model	<i>p</i>	AIC	deltaAIC
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation	5	1075.2	5
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock	7	1075.2	5
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	1076.3	6.1
	Bedrock	2	1078.2	8
	1	1	1078.8	8.6
	Habitat + bedrock	3	1079.8	9.6
	Habitat	2	1080.3	10.1
	Habitat + bedrock + habitat: bedrock	4	1081.4	11.2
Soil N-NH4 content	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	1476.3	0
	Habitat + bedrock + habitat: bedrock	4	1476.9	0.6
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock	7	1477.3	1
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock	5	1478.1	1.8
	Habitat × elevation × bedrock	8	1478.1	1.8
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock	6	1479.1	2.8
	Habitat + elevation + elevation: habitat	4	1482.6	6.3
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation	5	1482.8	6.5
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat	6	1483.7	7.4
	Habitat + bedrock	3	1489.5	13.2
	Habitat	2	1489.6	13.3
	Habitat + elevation + bedrock	4	1490.6	14.3
	Habitat + elevation	3	1490.7	14.4
	Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation	5	1491.5	15.2
	Bedrock	2	1547.6	71.3
	1	1	1548.7	72.4
	Bedrock + elevation	3	1548.8	72.5
	Elevation	2	1549.9	73.6
	Elevation + bedrock + elevation: bedrock	4	1550.1	73.8
Soil water content	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	239.8	0
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock	7	241.5	1.7
	Habitat × elevation × bedrock	8	241.8	2
	Habitat + elevation + elevation: habitat	4	242.8	3
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation	5	244.7	4.9
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat	6	246.5	6.7
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock	5	254.9	15.1
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock	6	256.6	16.8
	Habitat + bedrock + habitat: bedrock	4	257.3	17.5
	Habitat + elevation	3	268.4	28.6
	Habitat + elevation + bedrock	4	270.3	30.5
	Habitat	2	270.9	31.1
	Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation	5	272.1	32.3
	Habitat + bedrock	3	272.9	33.1
	Elevation	2	330.9	91.1
	1	1	332.9	93.1
	Bedrock + elevation	3	332.9	93.1
	Elevation + bedrock + elevation: bedrock	4	334.5	94.7
	Bedrock	2	334.7	94.9
Soil pH	Habitat + bedrock + habitat: bedrock	4	368.8	0
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock	5	370.4	1.6
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: bedrock	6	370.5	1.7
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: bedrock + elevation: habitat	6	372.4	3.6
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat + habitat: bedrock	7	372.5	3.7

(Continued)

Table A1 | Continued

Soil characteristic	Model	<i>p</i>	AIC	deltaAIC
	Habitat × elevation × bedrock	8	374.4	5.6
	Habitat + elevation + bedrock + elevation: bedrock + elevation: habitat	6	400.4	31.6
	Habitat + elevation + bedrock + habitat: elevation	5	400.6	31.8
	Habitat + bedrock	3	401.1	32.3
	Habitat + elevation + bedrock + bedrock: elevation	5	402.7	33.9
	Habitat + elevation + bedrock	4	402.9	34.1
	Habitat + elevation + elevation: habitat	4	417.8	49
	Habitat + elevation	3	419.9	51.1
	Habitat	2	420.7	51.9
	Bedrock	2	458.4	89.6
	Elevation + bedrock + elevation: bedrock	4	460.3	91.5
	Bedrock + elevation	3	460.6	91.8
	Elevation	2	476.7	107.9
	1	1	477.7	108.9

Fixed effects are the habitat (In-Out), bedrock, and elevation. Models are ordered according to the AIC statistic. *p* is the number of parameters in the model.

Table A2 | Model selection of fixed effects and interactions explaining the variation in bacterial and fungal In-Out beta-diversity.

In-Out beta-diversity	Model	<i>p</i>	AIC	deltaAIC
Bacteria	Dist.pH	2	-488.7	0
	Dist.env	2	-486.9	1.8
	Bedrock + alt	3	-483.9	4.8
	Bedrock	2	-482.9	5.8
	Alt + bedrock + alt: bedrock	4	-482.3	6.3
	Alt × bedrock	4	-482.3	6.3
	Dist.NO ₃	2	-480.9	7.8
	Dist.C	2	-475.5	13.2
	Alt	2	-475.2	13.5
	Dist.N	2	-474.7	14
	1	1	-471.8	16.9
	Dist.NH ₄	2	-470.3	18.4
	Dist.SWC	2	-469.9	18.8
	Fungi	Bedrock + alt	3	-267.1
Bedrock		2	-265.8	1.3
Alt + bedrock + alt: bedrock		4	-265.1	2
Alt × bedrock		4	-265.1	2
Dist.NO ₃		2	-258.4	8.7
1		1	-258.4	8.7
Dist.pH		2	-258.1	9
Alt		2	-258	9.1
Dist.C		2	-257.7	9.4
Dist.env		2	-257.3	9.8
Dist.N		2	-256.9	10.2
Dist.SWC		2	-256.7	10.4
Dist.NH ₄		2	-256.4	10.7

Fixed effects are the bedrock, elevation, and the dissimilarities of total carbon content, total nitrogen content, soil water content, ammonium content, nitrate content, and soil pH. Models are ordered according to the AIC statistic. *p* is the number of parameters in the model.

Table A3 | Results of the different permutation strategies used in the non-parametric multivariate analysis of variance.

		Pr(>F) no strata	Pr(>F) strata pop	Pr(>F) strata transect	Pr(>F) strata massifs
Bacteria	Habitat	0.001	0.001	0.001	0.001
	Bedrock	–	–	–	–
	Elevation	0.004	–	0.002	0.005
	Habitat: bedrock	0.001	–	0.001	0.001
	Habitat: elevation	0.666	–	0.720	0.686
	Bedrock: elevation	0.070	–	0.058	0.092
	Habitat: bedrock: elevation	0.126	–	0.122	0.131
	Residuals	NA	NA	NA	NA
	Total	NA	NA	NA	NA
Fungi	Habitat	0.001	0.001	0.001	0.001
	Bedrock	–	–	–	–
	Elevation	0.001	–	0.001	0.001
	Habitat: bedrock	0.002	–	0.003	0.002
	Habitat: elevation	0.199	–	0.192	0.182
	Bedrock: elevation	0.010	–	0.007	0.009
	Habitat: bedrock: elevation	0.041	–	0.043	0.032
	Residuals	NA	NA	NA	NA
	Total	NA	NA	NA	NA

The analysis is based on Bray–Curtis dissimilarity matrices of microbial SSCP profiles. “–” indicates meaningless permutation procedure. The samples permutation procedure did not influence the significance of the effects.

III. Discussion

1. Effet tampon de la plante sur le contexte environnemental : homogénéisation du pH du sol et apport de nutriments

Nos résultats montrent que la plante influence la réponse des communautés bactériennes et fongiques aux gradients environnementaux de roche mère et d'altitude. Cette influence est causée par la modification des caractéristiques environnementales, notamment l'homogénéisation du pH à des valeurs neutres et l'apport de nutriments. La plante constitue un habitat à part entière, à la fois en termes de caractéristiques abiotiques mais aussi biotiques minimisant l'effet direct du contexte environnemental.

La réponse à l'homogénéisation du pH est particulièrement flagrante pour les bactéries pour lesquelles l'influence du pH est reportée de manière récurrente, à différentes échelles spatiales (Fierer & Jackson 2006; Zinger *et al.* 2011b). Les communautés bactériennes diffèrent fortement entre silice et calcaire sur sol nu alors qu'on observe une convergence de composition sous la plante. De plus, la composition des communautés entre l'intérieur et l'extérieur de la plante change fortement sur silice où la modification du pH par la plante est particulièrement prononcée. Ainsi, le pH du sol semble être un des facteurs les plus déterminants de la distribution des communautés bactériennes. Le fait que cet effet soit mis en évidence à maintes reprises suggère que des effets directs sur la survie des bactéries sont impliqués.

2. Des différences inter-règnes de réponse à la plante

La réponse des champignons à la présence de la plante diffère de celle des bactéries. Il n'y a pas de convergence de composition fongique à l'intérieur de la plante illustrant clairement que ces deux règnes ne répondent pas aux mêmes variables environnementales, notamment vis à vis du pH (Rousk *et al.* 2010; Zinger *et al.* 2011b). Les communautés fongiques sous la plante sont aussi variables qu'à l'extérieur. De plus, la composition fongique est corrélée à la concentration en nutriments (contenu en carbone et en azote) et en eau des coussins. Il est possible que les champignons aient un rôle plus important que les bactéries dans les cycles des nutriments dans le système coussin. Les coussins semblent avoir un effet positif sur les champignons. A l'extérieur,

nous avons observé une forte variabilité en partie liée à la géologie des sites à travers le pH du sol. L'absence de matière organique dans les falaises rocheuses de haute montagne pourrait empêcher la croissance des champignons, en accord avec les difficultés que nous avons eu à amplifier l'ADN fongique de ces échantillons.

3. Sélection des communautés microbiennes par la plante le long d'un gradient de stress

Pour les bactéries comme pour les champignons, le changement de composition entre les coussins et l'extérieur augmente avec l'augmentation de l'effet ingénieur. Cette modification est particulièrement forte dans les situations les plus stressantes (haute altitude et sur silice). De manière intéressante, les coussins localisés dans ces conditions les plus stressantes étaient les plus riches en nutriments, en eau et modifiaient fortement le pH. Ainsi nos résultats suggèrent que la magnitude de l'effet ingénieur dépend du contexte environnemental local (ligne de base) mais aussi que des facteurs liés à la plante sont impliqués, soit directement (variabilité intraspécifique, voir Chapitre II) soit indirectement (à travers les réponses physiologiques des plantes à la contrainte environnementale). De manière générale, cette étude montre que l'effet sélectif des coussins sur les communautés bactériennes et fongiques augmente quand la contrainte et la modification environnementale augmentent.

4. Lien entre communautés microbiennes, contexte environnemental et variables abiotiques du sol des coussins

Les teneurs en nutriments dans le sol des plantes sont le produit d'interactions complexes avec les caractéristiques éco-physiologiques de la plante, le contexte environnemental, et la microflore bactérienne et fongique associée. Les études corrélatives comme celle menée ici ne permettent pas de distinguer les causes des conséquences. En fonction du contexte environnemental, de la présence des coussins et de l'interaction entre la présence des coussins et le contexte environnemental dans lequel les coussins poussent, nous avons observé des changements de composition microbienne en parallèle de changements des caractéristiques abiotiques des sols. La question reste de savoir si le contexte environnemental influence la physiologie de la plante qui influence en retour les communautés microbiennes ou si le contexte environnemental agit sur la communauté microbienne qui agit en retour sur les

caractéristiques abiotiques des coussins. Sans répondre à cette question, il est important de noter qu'un changement de composition de communautés microbiennes est lié à un changement de fonctionnement du sol quand l'on compare des conditions environnementales contrastées. Toutefois une forte variabilité de composition au sein de chaque condition est observée sans que cela soit expliqué par les caractéristiques abiotiques mesurées.

En conclusion, nos résultats montrent que les communautés microbiennes sous influence d'une plante n'ont pas la même structure spatiale à échelle régionale que les communautés hors de l'influence de la plante, en dépit d'être séparées par seulement quelques centimètres. La plante est un filtre biotique qui agit comme un tampon sur l'effet direct du contexte environnemental local à travers la modification des caractéristiques abiotiques du sol, recrutant une communauté différente de la communauté retrouvée dans le sol adjacent, cette sélection étant d'autant plus forte que la contrainte augmente.

Chapitre II. De l'importance de la variabilité génétique et phénotypique intraspécifique des plantes sur l'assemblage des communautés microbiennes

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte général

La génétique des communautés unifie l'écologie et l'évolution par l'étude des effets des génotypes sur les interactions interspécifiques. Ce cadre de travail est particulièrement intéressant pour comprendre et/ou générer des hypothèses sur l'écologie et l'évolution des espèces et des interactions entre espèces au sein des communautés (Hersch-Green *et al.* 2011). Les études conduites dans ce cadre de travail sont un premier pas vers la caractérisation des effets de la variation intraspécifique d'une espèce fondatrice (ou d'un hôte) sur les communautés subordonnées et l'effet réciproque de ces communautés sur l'évolution de cette espèce, la construction de sa niche en quelque sorte.

Outre ce cadre théorique, les interactions plantes-communautés microbiennes ont été jusque-là majoritairement centrées sur la diversité végétale interspécifique mais l'effet de la diversité intraspécifique a récemment été démontré sur les champignons et les bactéries, en pot et sur le terrain. L'influence de la génétique des plantes sur la structure des communautés fongiques s'étend au niveau inter et intra spécifique et affecte aussi bien les communautés du sol (Bailey *et al.* 2005) que de la phyllosphère (Cordier *et al.* 2012), et les champignons saprotrophes (Bailey *et al.* 2005) comme les pathogènes (Busby *et al.* 2013). Concernant les pathogènes, l'effet génétique est plus fort en jardin commun que dans la nature (Busby *et al.* 2013). L'adaptation à différentes conditions environnementales pourrait être prédominante mais les interactions biotrophiques influencent également la distribution des espèces. Le travail présenté ici vise à caractériser l'influence réciproque des facteurs biotiques et abiotiques sur l'assemblage des communautés microbiennes par le génotypage d'individus appartenant à un même taxon, *Silene acaulis*, et la caractérisation conjointe des communautés bactériennes et fongiques. Pour rappel, notre échantillonnage comprend des coussins aux morphotypes lâches ou denses. La distribution du taxon dense sur calcaire et silice ainsi que la forte variabilité phénotypique potentiellement contrôlée par la génétique du

Silene acaulis en font un système de choix pour démêler les différents facteurs affectant les communautés fongiques. De plus, la prise en compte des communautés hors de l'habitat plante nous permet de discuter plus en détails les processus régissant l'assemblage des communautés.

Nous nous focaliserons sur les champignons du fait d'une forte structure des communautés en fonction du contenu en nutriments des sols de coussins et d'une forte variabilité non expliquée (voir Chapitre I).

2. Objectifs et démarche de l'étude

L'objectif a été de déterminer les conséquences de la divergence évolutive au sein du *S. acaulis* sur la structure des communautés fongiques associées, i) en estimant la part relative des facteurs biotiques (génétique et/ou phénotype de la plante) et abiotique (contexte environnemental abiotique comme la roche mère ou l'altitude) dans l'assemblage des communautés fongiques et ii) en identifiant les groupes fongiques responsables des changements de composition des communautés. Dans ce but, 90 coussins de *S. acaulis* ont été génotypés par AFLP et les communautés bactériennes et fongiques associées aux coussins et dans le sol extérieur adjacent ont été caractérisées par séquençage Illumina de l'ITS1 fongique. Nous analysons les patrons de variabilité des communautés et des taxons le long des gradients environnementaux.

II. Contribution

Article II.

Genotypic variation within an alpine cushion plant correlates with soil fungal communities

Julien Roy, Sébastien Lavergne, Philippe Choler, Roberto Geremia

In preparation

TITLE

Genotypic variation within an alpine cushion plant correlates with soil fungal communities

RUNNING TITLE

Fungal community genetic of cushion plant

AUTHORS

Julien Roy, Sébastien Lavergne, Philippe Choler, Roberto Geremia

ABSTRACT

Fungi are intimately related to plants, but the relative influence of host genetic background and abiotic environmental factors in shaping their distribution remain somehow unknown. Here we aimed at testing whether recent plant divergence in an alpine cushion foundation species differently affects soil fungal communities; if so, the composition of soil microbial communities should be correlated to plant genetic more than with the environment where plants grow. We studied within *Silene acaulis* genetic variability and its correlation with the composition of associated fungal communities. Ninety plant individuals sampled along elevation gradients from two calcareous and siliceous mountains in the French Alps were genotyped using Amplified Fragment Length Polymorphism. Soil fungal communities within and outside cushions were characterized by paired-end Illumina sequencing of ITS1 amplicons. Population genetic analysis of *S. acaulis* revealed 3 genetic groups of which two belong to a loose and one to a dense morphotype. Loose cushions occurred only on calcareous bedrock while dense cushions occurred on both bedrocks. The fungal community composition correlated to plant genetic. The composition was mainly dependant of the plant's morphotype and this effect predominates over environmental context. Fungal lineages with biotrophic strategies were the most sensitive to plant divergence. We identified OTUs mostly found

in one plant genotype cluster, of which some are closely related. Our results suggest substantial intraspecific genetic variation in plant traits impacting soil fungi. We discuss to what extent fungal response to plant divergence could be predicted by life-style.

KEY WORDS

Molecular diversity, community ecology, community genetic, fungal communities, biotroph, alpine cushion plant, *Silene acaulis*, next generation sequencing

INTRODUCTION

Fungi are involved in organic matter decomposition and have diverse interactions with plants, ranging from mutualism to parasitism. They thus may have profound effect on the ecology and fitness of plant, affecting terrestrial ecosystem functioning and plant productivity (van der Heijden *et al.* 2008). They could be of major importance for foundation species involved in niche construction and ecosystem engineering that structure subordinate species community.

A growing body of evidence suggests that plant species identity as well as plant growth strategy strongly alter rhizospheric fungal communities (Bouasria *et al.* 2012; Mouhamadou *et al.* 2013), and this plant effect has been shown to structure soil fungal communities more than environmental conditions (Becklin *et al.* 2012). Since many fungi are saprobic, involved in plant organic matter (OM) degradation, or affected by plant rhizodeposition, changes in the composition or quantity of the OM and secretions may select for the more adapted fungi. Alternatively, many fungi are biotrophs involved in direct interaction with plant through mycorrhiza or pathogen attack.

Most of these studies have focused on plant interspecific variation affecting soil fungi. However there is increasing evidence that intraspecific variability of plant traits can also play a role in the community assembly of subordinate organisms. This effect on microbial communities was observed for phyllospheric bacteria in field (Koopman & Carstens 2011) and, for soil bacteria in common garden (Schweitzer *et al.* 2008) and pot experiments (Zancarini *et al.* 2013). A field study on the phyllosphere of European beech has suggested a stronger effect of intraspecific genetic variation more than of geographic distance on fungal community structure (Cordier *et al.* 2012). A study conducted in common garden with genetic manipulation of *Populus* trees also showed an effect of

tree genotype on fungal endophyte (Bailey *et al.* 2005). However, the relative importance of intraspecific genetic variation compared with other ecological factors, e.g. the environmental context (bedrock, climate) or spatial effects (distance decay of communities), in structuring microbial communities remains to be assessed (Hersch-Green *et al.* 2011).

Cushion plants are a common plant life form of extreme environments such as arctic and alpine environments (Aubert *et al.* 2014). Previous works showed that cushion plants are ecosystem engineers altering local soil conditions. Cushions enhance organic matter, nutrients and water content and may buffer temperature in the environment (Anthelme *et al.* 2012; Arroyo *et al.* 2003; Cavieres *et al.* 2007; Roy *et al.* 2013). This in turn increases plant and arthropods richness (Antonsson *et al.* 2009; Badano & Cavieres 2006; Cavieres & Badano 2009; Cavieres *et al.* 2006; Molenda *et al.* 2012). In addition, cushions are associated with distinct bacterial and fungal communities compared to surrounding bare soil (Roy *et al.* 2013). So far, it remains unknown whether the genetic variation within cushions species are likely to have effects on microbial communities and soil functioning.

S. acaulis is a common alpine cushion-forming plant. Botanists have described several subspecies that differ in their morphology, their secondary compounds and in their geographic localisation. A review of the systematic proposed two subspecies: one with a loose morphology (*longiscapa*, the “true” named *S. acaulis*), which thrives on calcareous bedrock, and one with a dense morphology (*S. exscapa*) mostly present on siliceous bedrock (Bock 1983). However there has been no study investigating whether these different phenotypes and habitat preferences correspond to distinct gene pools.

In a previous study, we showed that fungal communities within cushions were mostly affected by nutrients, while communities in the surrounding bare soil were mostly affected by pH (Roy *et al.* 2013). In this study, we examined the link between plant genetic structure and fungal community composition. *S. acaulis* cushions were sampled along elevational gradients in the calcareous and siliceous mountains of the French Alps, in sites ranging from 2100 m to 3150 m of elevation. We characterized the molecular diversity of fungal communities associated with 90 *S. acaulis* plants and with nearby soil conditions. Populations of *S. acaulis* were genotyped using AFLP. Specific questions were i) does composition of soil fungi correlate with plant genetic, and ii) if yes, does this effect predominate over environmental context in which plants grow? To

do so, we i) described patterns of variability in both fungal communities and individual taxa across environmental gradient and ii) identified fungal taxa sensitive to plant genetic.

MATERIALS AND METHODS

Sampling protocol

The fieldwork was conducted in the French Alps (Hautes-Alpes, 05) during September 2009. Briefly, we sampled three soil cores inside and outside five cushions of *S. acaulis* in three populations distributed along three distinct elevation gradients both in the calcareous Cerces and siliceous Combeynot mountains. Two other populations occurring on quartzite bedrock at the bottom of the Tour Termier and Aiguillette du Lauzet gradients were additionally sampled (Figure 1, Table1). Leaf tissues were sampled for each study cushion plant in all 20 sampling sites. Further, we measured soil contents in total C, total N, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ and water, and soil pH. Complete sampling protocol and methods to measure abiotic soil characteristics are described in Roy et al. (Roy *et al.* 2013).

Table 1. Information on study sites. Sample are named according to the site code plus a number.

Population	Mountain	Site	Site code	Bedrock characteristic	Longitude	Latitude	Elevation	Cushion's morphotype	Taxon	Genetic cluster in STRUCTURE
calc.I.Q	Cerces	Tour Termier	CIQ	calcareous	922720	2014606	2500	dense	exscapa	exscapa
calc.I.1	Cerces	Tour Termier	CI1	calcareous	923062	2014731	2700	dense	exscapa	exscapa
calc.I.2	Cerces	Tour Termier	CI2	calcareous	923178	2014763	2900	dense	exscapa	exscapa
calc.I.3	Cerces	Tour Termier	CI3	calcareous	923065	2014869	3050	dense	exscapa	exscapa
calc.II.1	Cerces	Roche Colombe	CI1	calcareous	924969	2012851	2600	loose	longiscapa	longiscapa
calc.II.2	Cerces	Roche Colombe	CI2	calcareous	924992	2012924	2700	loose	longiscapa	longiscapa
calc.II.3	Cerces	Roche Colombe	CI3	calcareous	925193	2013091	2830	loose	longiscapa	divergent
calc.III.Q	Cerces	Aiguillette du Lauzet	CI1Q	calcareous	926398	2011300	2100	loose	longiscapa	longiscapa
calc.III.1	Cerces	Aiguillette du Lauzet	CI11	calcareous	926503	2011180	2230	loose	longiscapa	longiscapa
calc.III.2	Cerces	Aiguillette du Lauzet	CI12	calcareous	926536	2010797	2400	loose	longiscapa	longiscapa
calc.III.3	Cerces	Aiguillette du Lauzet	CI13	calcareous	926636	2010663	2550	loose	longiscapa	longiscapa
sili.I.1	Combeynot	Pic du Lac	SI1	siliceous	921371	2007027	2660	dense	exscapa	exscapa
sili.I.2	Combeynot	Pic du Lac	SI2	siliceous	921496	2007324	2800	dense	exscapa	exscapa
sili.I.3	Combeynot	Pic du Lac	SI3	siliceous	921543	2007504	2900	dense	exscapa	exscapa
sili.II.1	Combeynot	Pointe du Fontenil	SI1	siliceous	922493	2009245	2600	dense	exscapa	exscapa
sili.II.2	Combeynot	Pointe du Fontenil	SI2	siliceous	922440	2009545	2750	dense	exscapa	exscapa
sili.II.3	Combeynot	Pointe du Fontenil	SI3	siliceous	922445	2009779	3000	dense	exscapa	exscapa
sili.III.1	Combeynot	Pointe de l'Etendard	SI11	siliceous	922549	2006822	2500	dense	exscapa	exscapa
sili.III.2	Combeynot	Pointe de l'Etendard	SI12	siliceous	922736	2007188	2700	dense	exscapa	exscapa
sili.III.3	Combeynot	Pointe de l'Etendard	SI13	siliceous	922914	2007427	2960	dense	exscapa	exscapa

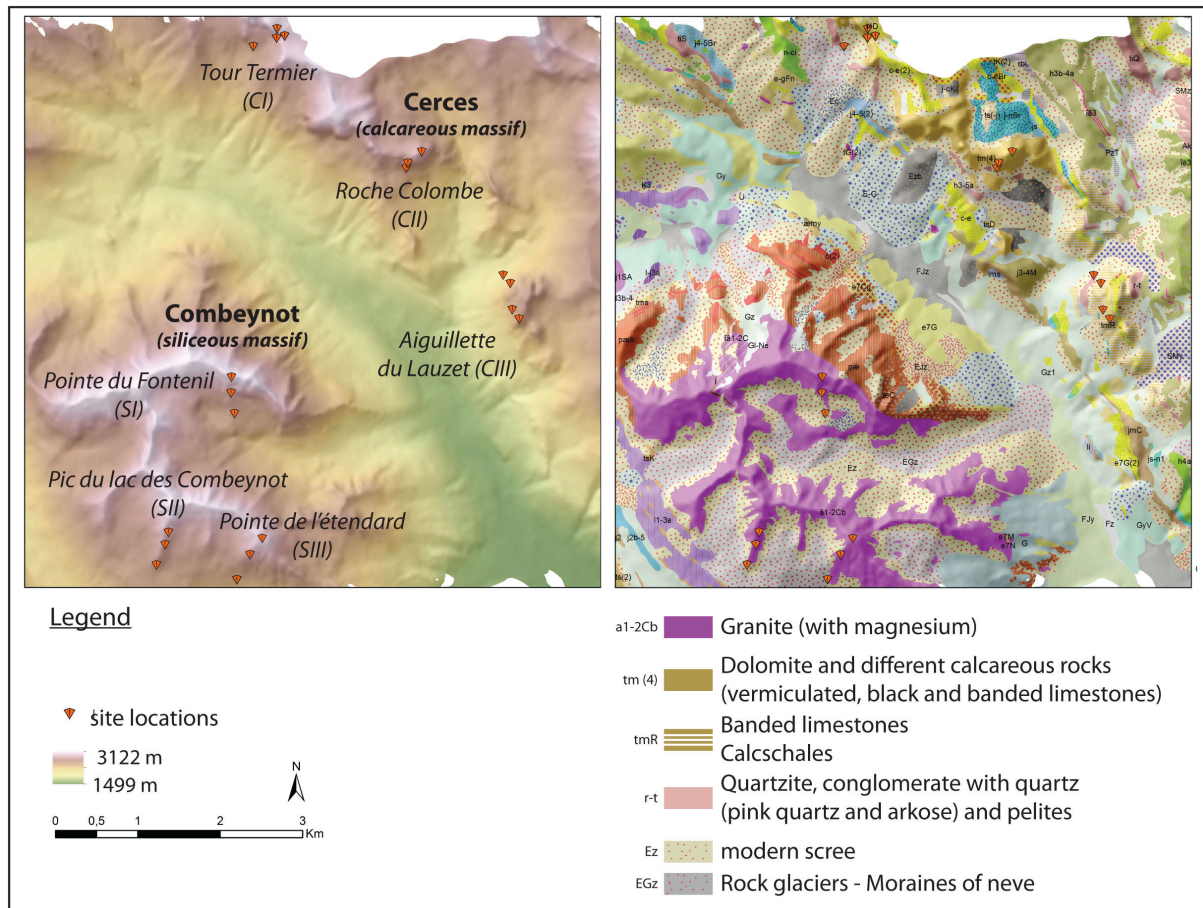


Figure 1. Topographic and geological map of the study sites.

AFLP procedure

Total DNA was extracted from leaf tissues using the DNeasy 96 plant extraction kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. We used AFLPs (Vos *et al.* 1995), a reference marker technique for genome scans (Bonin *et al.* 2007; Meudt & Clarke 2007), because AFLP loci are widely distributed across the genome. AFLP loci were generated for 110 samples. The AFLP procedure followed Vos *et al.* (1995) with minor modifications. Digestion of genomic DNA was performed for 2h at 37°C in a 20 µL mix using 2U of MseI and 5U of EcoRI (New England Biolabs). Double-stranded adaptors were then ligated to the digested DNA in a 40 µL volume for 2h at 37 °C using 1 U of T4 DNA Ligase (Roche). Dilution and pre-selective PCR after 1:10 dilution of digested ligated products, the PCR pre-selective (2 min at 72 °C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 56 °C, and 2 min at 72 °C with a final elongation of 10 min at 72 °C) was carried out in a 25 µL volume containing 3 µL digested ligated products, 2.5 µL of 1X PCR Buffer II, 1.5 µL of 2.5 mM of MgCl₂ (final concentration 1.5 mM), 2 µL of dNTP mix (final concentration

0.2 mM each), 0.5 µl of each primer (EcoRI+1/MseI+1) at 10 µM, and 0.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems). After 1:20 dilution of pre-selective PCR products the selective amplification (10 min at 95 °C, 13 cycles of 30s at 94°C, 60s at 65°C to 56°C, and 60s at 72°C, 23 cycles of 30s at 94°C, 60s at 56°C, and 60s at 72 °C with a final elongation of 10 min at 72 °C) was carried out in 12.5 µL volume containing 2.5 µL diluted pre-selective PCR product, 1X PCR Buffer II, 2.5 mM of MgCl₂, 80 µM of dNTP mix, 0.2 µM of each primer (EcoRI+3/MseI+3), 8 µg.mL⁻¹ BSA and 0.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). After preliminary tests, 2 primer combinations were chosen which resulted in clear bands of sufficient variability. PCR products of EcoRI/MseI combinations were purified using columns of half to half 5% Sephadex G50 and Sephacryl S200. PCR products from each EcoRI/MseI primer pair were run separately for fragment length analysis. For EcoRI/MseI combinations, 1.5 µL of the AM- labelled products were mixed with 10 µL of HiDi formamide and 0.1 µL Genescan ROX 500 size standard (Applied Biosystems) and electrophoresed on an ABI PRISM 3130 capillary sequencer (Applied Biosystems).

AFLP Analysis

AFLP loci were obtained using a semi-automated procedure. Detection and size attribution (in bp) of peaks of the raw AFLP electropherograms was performed using PeakScanner software (Applied Biosystem). Electropherogram for which the automated process failed in detecting peaks and/or attributing size were manually processed. All AFLP profiles were manually checked and corrected. The binning and scoring of AFLP electropherograms were done using the R program RawGeno (Arrigo *et al.* 2009). Binning was performed removing individuals out of the 5%-95% quantile confidence interval of the number of peaks and restricting AFLP peaks only to those longer than 100 bp because of high level of size homoplasy for small fragments (Arrigo *et al.* 2009), a current genotyping error (Bonin *et al.* 2004; Pompanon *et al.* 2005). To prevent analysing genotyping errors (mainly allele homoplasy and scoring errors), bins not reproducible at least once within a group of replicates (4 groups of replicates for each pair of primers, 3 to 4 replicates per group) were removed. To ensure our filtering processed was good, we calculated the 'bin content information' criterion (Arrigo *et al.* 2009) for various filtering strategies and found that our conservative strategy was that

the one retaining the greatest bin content information (not shown). A total of 90 individuals were reliably scored for the presence or absence of AFLP fragments. 345 reliable and polymorphic loci were identified from the 2 selected primers pairs of restriction enzymes and recorded in a binary matrix used in subsequent statistical analysis. All individuals exhibited unique AFLP loci composition.

Fungal DNA sequencing

Complete soil DNA extractions protocol can be found in Roy et al. (2013). Briefly, extractions were carried out with the PowerSoil Well Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratoires, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) and was considered successful when more than 10 ng.µl⁻¹ of DNA was obtained. We amplified the fungal ITS1 region by using ITS5 (5' CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT-3') and ITS2 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3'). The PCR reactions (25 µl) were 2.5 mM of MgCl₂, 1U of AmpliTaq Gold™ buffer, 20 g.l⁻¹ of bovine serum albumin, 0.1 mM of each dNTP, 0.26 mM of each primer, 2 U of AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 10 ng of DNA template. The PCR reaction was carried out as follows: an initial step at 95°C (10 min), followed by 33 cycles at 95°C (30 s), 54°C (15 s) and 72°C (30 s), and a final step at 72°C (7 min). The PCR products were then purified and mixed together (equivolume mixes) before sequencing, which was performed using an Illumina HiSeq 2000 platform (2*250 bp, paired-end reads).

Bioinformatic procedure: reproducibility of MiSeq Illumina paired-end ITS1 amplicons sequencing

Two successive Illumina 250 bp paired-end runs (hereafter Run1 and Run2) were performed on the same PCR library. Reproducibility between runs was evaluated comparing shared sequences and their count. The number of reads was 1,266,064 and 1,386,183 for Run1 and Run2, respectively. The paired-end alignment of reads in the Run2 gives a quite higher number of aligned reads (71% and 80% for Run1 and Run2 respectively). The concatenation of the two runs followed by raw reads dereplication yields 854 329 unique (dereplicated) sequences corresponding to 2 652 247 counts (reads). 44 637 dereplicated sequences (5%) were shared by the two runs,

corresponding to 1 804 364 counts (68% of the total reads). 809 692 sequences (95%) were found in only one run (run specific). Majority of these sequences were singletons (i.e. count = 1), accounting for 847 883 counts (32%). On the 44 637 shared sequences, 13 104 (30%) were singletons in both runs, corresponding to 26 208 counts (1.5%). 13 284 sequences (30%) were singletons in one run but found at least twice in the second, corresponding to 51 948 counts (3%). 18 249 of the shared sequences (41%) were not singletons in both runs, corresponding to 1 726 208 counts (96%). Hence, although the majority of sequences were run specific, the sequences shared represented the majority of reads. Sequencing was thus highly reproducible. We concatenated the two runs in the following study.

Bioinformatic procedure: sequences trimming and processing

OBITools programs were used to quality-filter, denoise, cluster and assign sequences (<http://metabarcoding.org//obitools/doc/>). 2,652,247 reads were obtained from the two runs of Illumina 250 bp paired-end ITS1 amplicons. Paired-end reads with ambiguous base calls (N), errors in the primer sequence, non-overlapping paired-end fragments and with sequences length < 68 bp (the smallest sequence length in our taxonomic reference database, see below) were removed from the data set. Raw reads were then dereplicated, and clustered into Molecular Operational Taxonomic Unit (OTU) at a threshold of 98% sequence similarity. Dereplicated sequences were aligned using a global alignment algorithm (Needleman & Wunsch 1970) running in sumatra software (available on request at eric.coissac@metabarcoding.org and documentation at <http://metabarcoding.org//obitools/doc/>). Sumatra algorithm computes all the LCS (Longest Common Subsequence) scores. Alignment scores were normalized on the alignment length of each couple. OTUs were created from the distance matrix by using the non-hierarchical clustering method MCL (Markov Clustering, van Dongen 2000) as validated in Zinger et al. (Zinger *et al.* 2009a). Abundance and presence/absence matrices of OTUs per locations at the 98% similarity thresholds was produced and used for subsequent diversity analyses. Samples with less than 1000 reads (n=10) were removed.

A reference database was created from the fungal nucleotide sequences available in UNITE (release 18.12.2012, (Koljalg *et al.* 2013). A custom fungal database was built

using ecoPCR program (<http://metabarcoding.org//obitools/doc/>) by selecting sequences flanked by our two primers. This database resulted in 13,470 entries corresponding to 7,055 defined species. Taxonomy was finally manually curated. The five most represented sequences of each OTU were then aligned against this custom database using the “fasta35” algorithm (Pearson 2000) included in ecotag program (<http://metabarcoding.org//obitools/doc/>). This script uses the path along the UNITE taxonomic tree to assign sequences to a given taxon. The program first searches the reference database for the reference sequence(s) (hereafter referred to as 'primary reference sequence(s)') showing the highest similarity with the query sequence. Then it looks for all other reference sequences (hereafter referred to as 'secondary reference sequences') whose similarity with the primary reference sequence(s) is equal or higher than the similarity between the primary reference and the query sequences. Finally, it assigns the query sequence to the most recent common ancestor of the primary and secondary reference sequences. Similarity between the query and the reference sequences was fixed at a minimum of 80% to a query be assigned. To take into account taxonomic variability within OTUs, we applied a second Last Common Ancestor procedure between the five most represented sequences of each OTU with a threshold of four same assignments for attributing a common consensus taxon.

Population genetic statistical analysis

We used STRUCTURE version 2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000) to determine *a posteriori* genetic groups in *S. acaulis*. We used an admixture model without a priori knowledge on the geographic provenance of individuals. Likelihood of the number of a priori groups (K) was estimated for K ranging from 1 to 22 (the total number of populations). Five runs were done per K using 50 000 burn in periods followed by 50 000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions.

Microbial community statistical analysis

The sample-OTUs matrix obtained was rarefied to 950 reads per sample. Abundance > 1/950 was additionally required for an OTU to be considered as present in a sample. First, we calculated the Bray-Curtis pair-wise dissimilarities between all samples,

cushions samples and outside samples. We tested the correlation between fungal community structure and plant genetic using partial Mantel test taking into account geographic position and the composition of communities in the outside. Further community structure within and outside cushions was represented using non-metric multidimensional scaling (NMDS). Abiotic soil characteristics were fitted into the ordination using the *envfit* function in the vegan R package (Oksanen *et al.* 2011). We calculated the pure part of explained variance in fungal communities dissimilarities between plant genetic cluster, bedrock and elevation using non-parametric multivariate analysis of variance (Anderson 2001) by implementing type III test in the *adonis* function in vegan (Oksanen *et al.* 2011). Further, to evaluate whether the relationship with plant genotype differed across fungal trophic strategies, we also performed Mantel test for 9 of the most diverse and abundant lineages found in the study, and which have relatively distinct trophic strategies. We identified OTUs that occurred more frequently in any of the plant genetic cluster, using CHI2 test of independence with the *chisq.test* R function. P-values were obtained through Monte-Carlo permutations of the original matrix (setting *sim=T* in the *chisq.test* function, Chessel 2006) and corrected for multiple testing with False Discovery Rate (Benjamini& Hochberg 2000). Standardized residuals > 1.96 or < -1.96 indicate whether significant OTUs display positive or negative association respectively with any of the plant genetic cluster. To test whether OTU richness were influenced by plant genetic cluster, bedrock or elevation, we performed *anova* as implemented in R (R Development Core Team 2012).

All statistical analyses were conducted with the R software (R Development Core Team 2012) using *vegan* (Oksanen *et al.* 2011), *ade4* (Dray& Dufour 2007) and base packages.

RESULTS

1. Population genetic structure of S. acaulis

Results from STRUCTURE indicate a maximal increase of likelihood for two genetic clusters (K=2) and reached a plateau at K=3 (Fig. 2A). At K=2, the two clusters corresponded to a loose (, CII-CIII sites, orange, *longiscapa* taxon) and dense (CI-SI-SII-SIII sites, brown *exscapa* taxon,) morphotypes. CII31 to CII33 individuals (the highest

population of the calcareous Roche Colombe site) were assigned to both clusters (Fig. 2B). These individuals were loose morphotypes but clustered in a third genetic group at $K=3$ (red, herein referred as *divergent* group, Fig. 2C); further, CII34, CII35, CII24, CII35 were at approximately 50% assigned to *longiscapa* and *divergent* cluster.

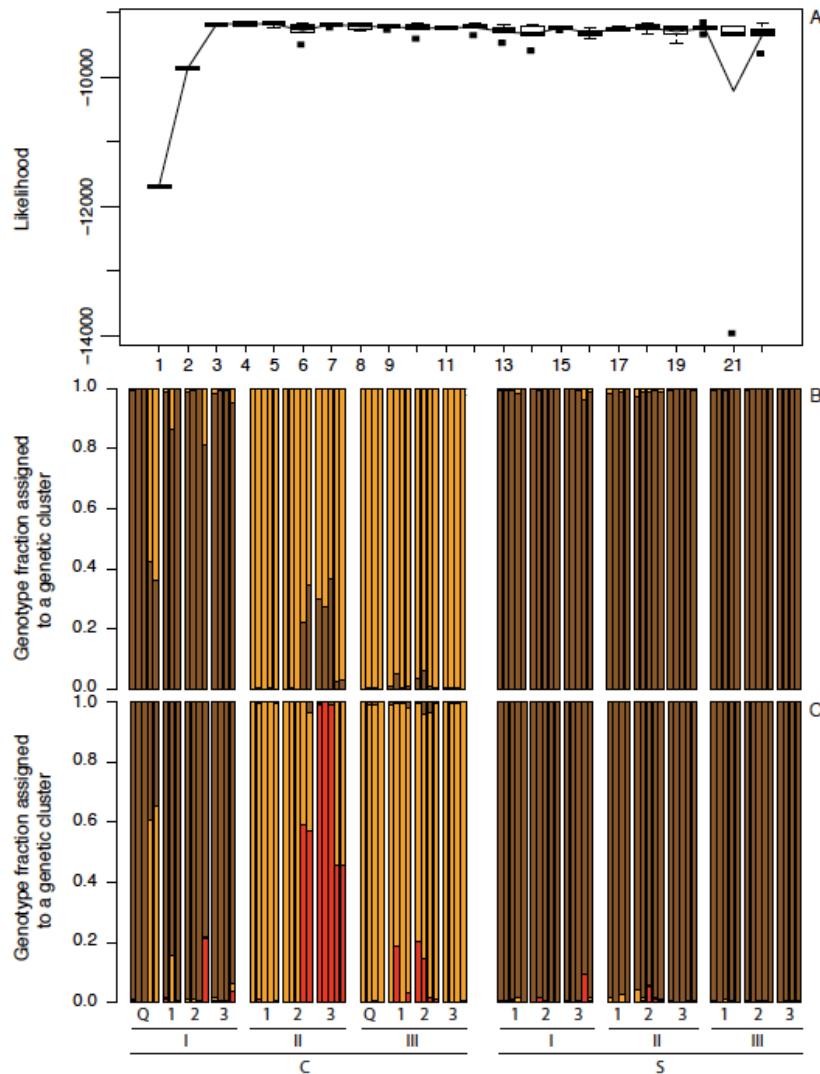


Figure 2. A) Likelihood of the number of *S. acaulis* genetic clusters (K) using STRUCTURE as inferred from AFLP fingerprints. Values are the mean of 5 runs per K , for 50 000 burn in periods followed by 50 000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions. The program was run using the admixture model. B) $K=2$ and C) $K=3$ genetic clusters of *S. acaulis* individuals as inferred from AFLP fingerprints using STRUCTURE. The y-axis describes the portion of alleles assigned to genetic clusters for each *S. acaulis* individual. Colours refer to clusters. Individuals are sorted according to their geographic locations, separated by white vertical lines. Correspondence of code according to sites is found in Table 1.

2. Paired-end fungal ITS1 dataset characteristics

Of the 2 652 247 raw reads generated, paired-end alignment, trimming and dereplicating steps resulted in 66023 non-singletons sequences (mean length = 199 ± 31) accounting for 70% of the reads (1 863 941). These sequences clustered into 11124 OTUs, at the 98% level (OTUs₉₈), of which 7133 were singletons, accounting for 0.9% of the reads. The mean number of OTUs₉₈ detected by sample is 349 ± 113 . On average, each OTU₉₈ occurred in 5.7 ± 13.2 samples but most of the OTUs₉₈ occurred in a few samples;

3446 (31%) and 3143 (28%) OTUs₉₈ occurred in one and two samples, respectively. Accumulation curves of OTUs₉₈ number vs. sampling effort did not reach a plateau, reduced neither in the In, Out habitats nor in the entire dataset (Fig. S1A). This was also true for each plant genetic cluster and its respective outside (Fig. S1B).

Table 2. Summary of the distribution of OTUs₉₈ among fungal lineages including the 10 most abundant orders detected and the families with reads abundance >0.1%. The values are relative number of reads or OTUs in the entire data set.

Pylum	Class	Order	Family	% of reads	% of OTUs
Ascomycota				55.5	51.1
	Archaeorhizomycetes			0.3	0.2
	Dothideomycetes			13.4	13.3
		Capnodiales		7.6	7.7
		Pleosporales		4.5	4.7
	Eurotiomycetes			1.5	3.5
		Chaetothyriales		1.2	2.6
	Geoglossomycetes			0.2	0.1
	Lecanoromycetes			0.2	0.4
	Leotiomycetes			12.5	12.3
		Helotiales		11.1	10.7
		Incertae_sedis	Myxotrichaceae	1.3	1.1
	Pezizomycetes			1.0	0.5
		Pezizales		1.0	0.5
	Sordariomycetes			14.9	9.7
		Hypocreales		10.2	5.1
		Magnaporthales		1.3	0.1
Basidiomycota				6.3	4.1
	Agaricomycetes			5.3	3.1
		Agaricales		1.8	0.1
		Sebacinales		1.6	0.8
	Tremellomycetes			0.8	0.5
Chytridiomycota				0.03	0.1
Glomeromycota				0.2	0.6
Incertae_sedis	Incertae_sedis	Mortierellales		7.3	6.8
Incertae_sedis	Incertae_sedis	Incertae_sedis	Pseudeurotiaceae	2.2	1.4
Incertae_sedis	Incertae_sedis	Leucosporidiales		0.2	0.3
Fungi_un				0.1	0.7
_un				28.1	34.8

Lineages abundances (reads count) and diversity (number of OTUs₉₈) were highly correlated ($r=0.98$ at the order level). Two-third of the OTUs₉₈ were successfully assigned to Fungi (Table 2). Half of the OTUs₉₈ were assigned to Ascomycota. Mortierella and Basidiomycota represented 7.3 and 4% of the OTUs₉₈ respectively, while less than 1% of the OTUs₉₈ were assigned to Glomeromycota and Chytridiomycota. The abundant and diversified orders in Ascomycota were Hypocreales, Helotiales, Capnodiales and Pleosporales. Agaricales and Sebacinales were abundant orders of Basidiomycota. Those lineages contained the 20 most abundant OTUs₉₈ (Table 3).

Table 3. Taxonomy, abundance and frequency of the 20 most abundant OTUs₉₈ of the study.

OTU id	Taxonomic identity	Count	Frequency tot (n=184)	Frequency In (n=93)	Frequency Out (n=91)
motu6	Hypocreales_un	9352	175	88	87
motu9	Nectriaceae_un	3809	155	76	79
motu8	Preussia sp PIMO_223	3557	140	57	83
motu13	Cladosporium_un	3494	66	36	30
motu4	Ascomycota_un	3341	120	63	57
motu15	Pseudeurotium bakeri	3133	97	35	62
motu1	Mortierella alpina	3117	155	82	73
motu3	_un	3109	105	49	56
motu2	Oculimacula yallundae	2867	100	61	39
motu10	Ascomycota_un	2632	118	59	59
motu7	Dermateaceae_un	2410	98	46	52
motu11	Davidiellaceae_un	1976	139	74	65
motu5	Geomyces_un	1969	116	58	58
motu28	Ascomycota_un	1671	105	48	57
motu39	Papiliotrema bandonii	1438	98	45	53
motu22	Ascomycota_un	1394	110	53	57
motu34	Mortierella elongata	1364	77	34	43
motu19	Ascomycota_un	1233	116	46	70
motu27	Helotiales_un	1195	53	18	35
motu25	_un	1182	83	38	45

4. Correlation between the structure of fungal communities and the genetic of cushions.

The structure of fungal communities outside cushions were mainly affected by bedrock and therefore by soil pH (Fig. 3A, Table 4). By contrast, within cushions, the structure of fungal communities correlated with plant genetic distance ($r=0.33$, $p<0.001$). Partial Mantel test indicated that the correlation was still significant after controlling for geographic distance between samples ($r=0.22$, $p<0.001$) or for community structure outside cushions ($r=0.28$, $p<0.001$). As shown on the NMDS, fungal communities within cushions tended to cluster according to cushion morphotype (Fig. 3B). Morphotype explained more variance in community structure than bedrock and elevation (Table 4). The change in OTUs composition was related to change in total C, total N, N-NH₄⁺ and soil water content, which were higher in dense *exscapa* cushions (not shown here). The same pattern was found when we restricted the analysis to the 30 most abundant OTUs₉₈ of each habitat type, or at the OTUs₉₀ level (Fig. S2A, B). The magnitude of the bedrock and the morphotype effect on fungal communities tended to be similar when using presence absence data but morphotype still explained more variance (Fig. S2C, Table S1).

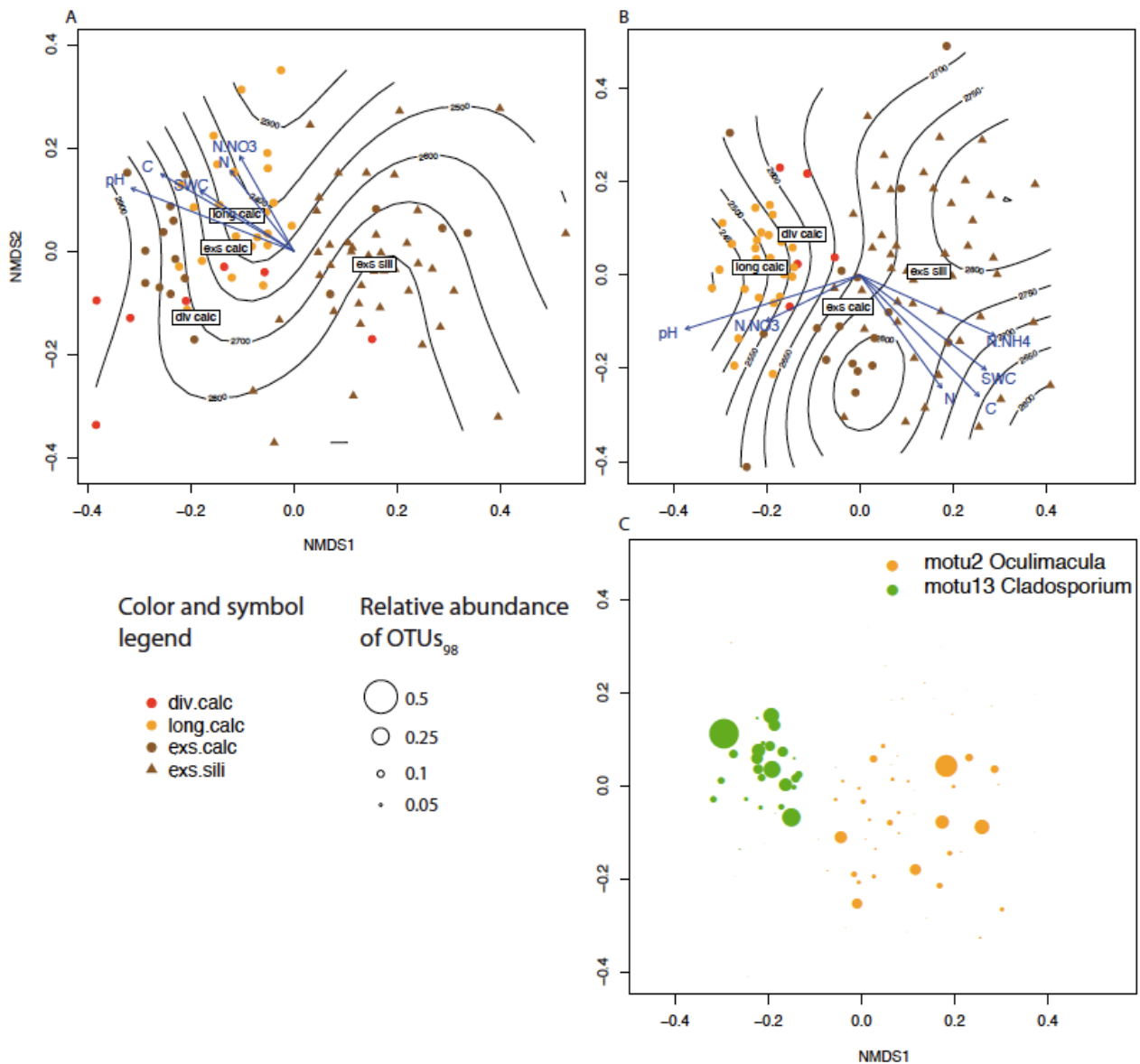


Figure 3. Community structure of fungal communities A) in the outside and B) associated with cushions represented through NMDS ordination of Bray-Curtis pairwise dissimilarities of fungal communities. Stress values are 0.20 and 0.25 for A) and B). The high stress value (>0.2) implies substantial loss of information in the 2D space. Groups' centroids of fungal communities are marked with the name of the habitat type. Arrows fitted into the ordination indicate the direction in the 2D space in which the variable most varies. Surface fitted into the ordination indicate the direction in the 2D space in which the elevation most varies. Only significant variable are represented. Variables were tested with the *envfit* function in *vegan* and 999 permutations. (C) Spatial distribution of motu2 and motu13 in each sample by relative abundance, across the ordination of the within cushions dataset. Motu2 and motu13 are respectively the most abundant OTUs₉₈ of dense and loose cushions, and are preferentially associated with each plant group.

Table 4. Effect of cushion morphotype, bedrock and elevation on OTUs₉₈ composition in outside and within cushions assessed by non-parametric analysis of variance.

		Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
IN	cushion morphotype	1	1.419	1.41902	3.8256	0.03750	0.001
	bedrock	1	0.901	0.90062	2.4280	0.02380	0.001
	elevation	1	0.681	0.6808	1.8354	0.01799	0.002
OUT	cushion morphotype	1	0.670	0.67034	1.9096	0.01926	0.002
	bedrock	1	1.511	1.51073	4.3037	0.04341	0.001
	elevation	1	0.907	0.90689	2.5835	0.02606	0.001

Correlation between plant genetic and fungal communities varied between fungal lineages. Community composition of Capnodiales and Helotiales strongly correlated with plant genetic distance (Fig. 4, Table 5). In a lesser extent, Pleosporales and Sebaciales composition also correlated with plant genetic distance (Fig. 4, Table 5). Composition of Mortierellales most correlated with plant soil pH and geographic distance while composition of Hypocreales most correlated with plant geographic distance (Fig. 4, Table 5). Composition of Sordariales and Tremellales were not correlated to any factors (Fig. 4, Table 5). Finally, OTUs₉₈ richness within cushions was lower within *exscapa* than within *longiscapa* (Fig. 5A; $P < 0.001$) but did not varied between bedrocks (Fig. 5B; $P > 0.05$).

Table 5. Correlation between fungal composition and genetic, pH and geographic distance between cushions of *S. acaulis* assessed by Mantel test (Pearson correlation), for 9 abundant fungal lineages.

	genetic distance		pH distance		geographic distance		genetic distance		pH distance		geographic distance	
	abundance	prsence/absence	abundance	prsence/absence	abundance	prsence/absence	abundance	prsence/absence	abundance	prsence/absence	abundance	prsence/absence
	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value
Capnodiales	0.36	0.001	0.37	0.001	0.16	0.003	0.16	0.001	0.18	0.001	0.18	0.001
Helotiales	0.43	0.001	0.42	0.001	0.12	0.01	0.12	0.005	0.11	0.002	0.11	0.001
Pleosporales	0.15	0.003	0.14	0.002	0.07	0.115	0.06	0.107	0.06	0.041	0.06	0.035
Hypocreales	0.005	0.453	0.01	0.4	0.02	0.36	0.02	0.323	0.12	0.001	0.11	0.001
Sordariales	0.0	0.562	0.003	0.48	0.0	0.853	0.0	0.89	0.07	0.064	0.06	0.092
Mortierellales	0.06	0.104	0.062	0.064	0.22	0.001	0.21	0.001	0.23	0.001	0.23	0.001
Sebaciales	0.17	0.001	0.17	0.001	0.09	0.019	0.08	0.026	0.16	0.001	0.14	0.001
Agaricales	0.05	0.038	0.04	0.079	0.06	0.013	0.06	0.016	0.012	0.324	0.0	0.464
Tremellales	0.14	0.046	0.11	0.056	0.0	0.802	0.0	0.806	0.0	0.889	0.0	0.832

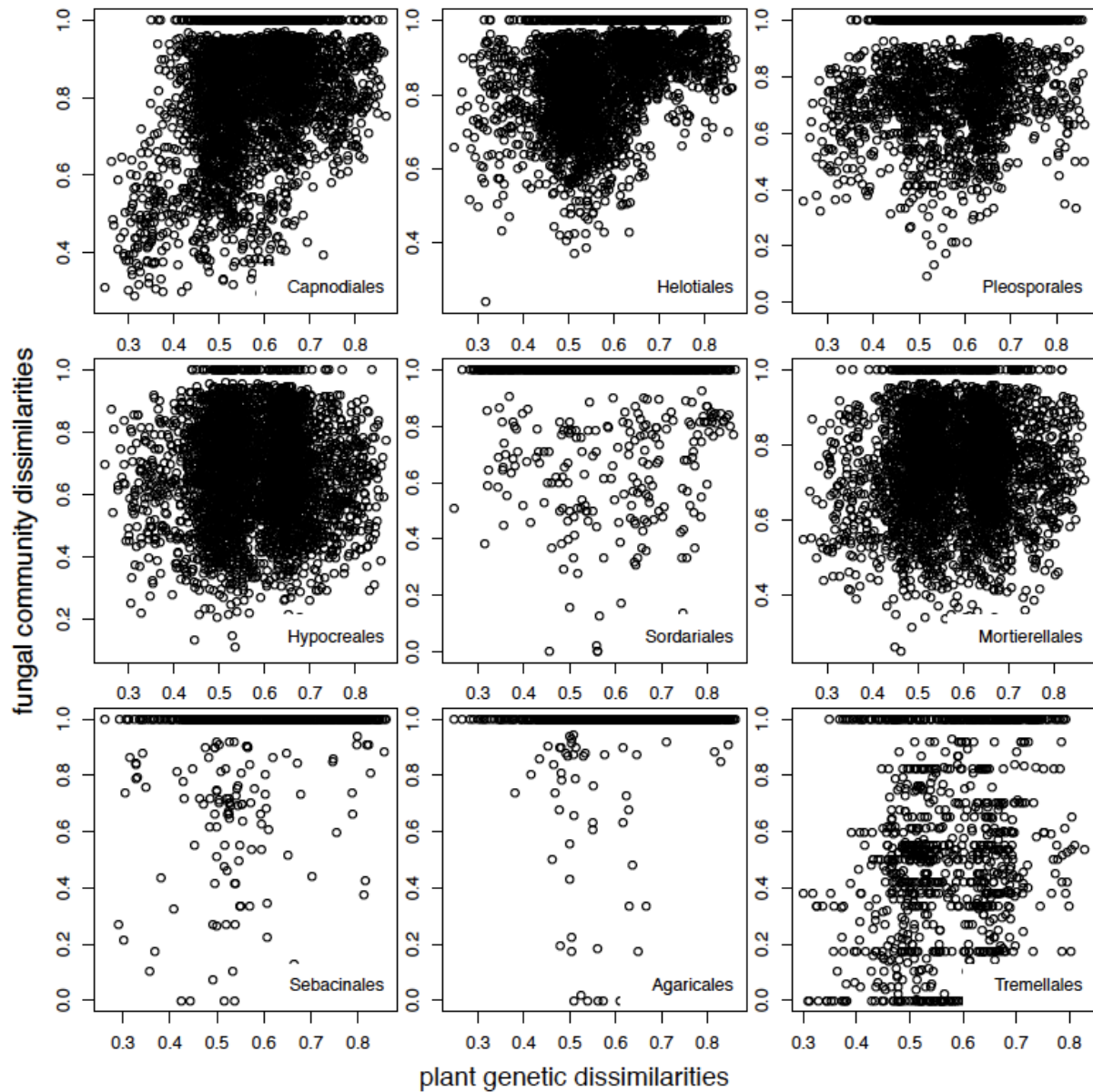


Figure 4. Correlation between fungal community dissimilarities (Bray-Curtis) and genetic distance of cushions of *S. acaulis* (Jaccard), for 9 abundant fungal lineages.

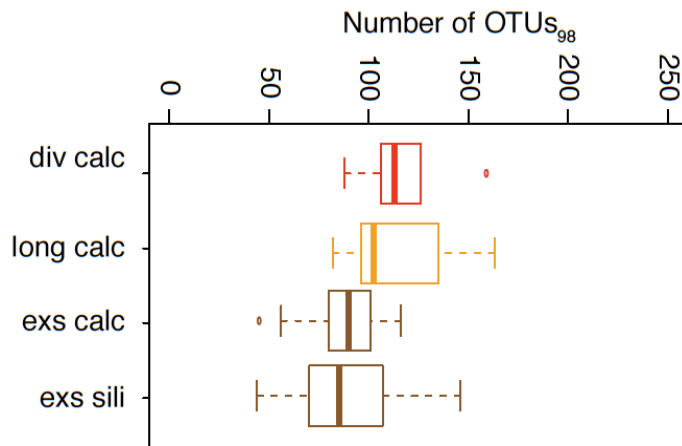


Figure 5. Per sample OTUs₉₈ richness within cushions across the four plant groups. Bars in boxes are median.

5. Association between OTUs₉₈ and plant genetic clusters

One hundred and sixty six OTUs₉₈ were significantly more frequently associated or excluded from cushions, bedrock, genetic cluster or a combination of these factors. Eighty-six of them occurred more frequently in at least *exscapa* on calcareous, *exscapa* on siliceous, *longiscapa* or *divergent* plant taxa (Fig. 6). Thirty-four of these 86 OTUs₉₈ were not assigned. Those with taxonomic affiliation mainly belonged to Helotiales (n=16) and Capnodiales (n=10) and Mortierellales (n=9). The two most abundant OTUs₉₈ from *exscapa* and *longiscapa* communities, motu2 and motu13, are respectively associated with *exscapa* and *longiscapa* (Fig. 1C; Fig. 6). Nine of the Helotiales OTUs₉₈ were assigned to Dermateaceae including 5 assigned to *Oculimacula yallundae*. Dermateaceae is a family that contains mainly plant-pathogens fungi, and *O. yallundae* is a common pathogen of wheat. Four of the Capnodiales were assigned to Mycosphaerellaceae, also a lineages of plant pathogens.

Two significant Basidiomycota OTUs₉₈ (assigned to Sebaciniales and Agaricales) were found associated with the *divergent* taxon. Noticeably, many OTUs₉₈ assigned to the same fungal taxa (e.g. within the Dermateaceae, Mortierellales and Mycosphaerellaceae) showed preferences for one plant genetic cluster or combination with bedrock. Further, some of which were found to be similar at $\leq 97\%$ of sequence identity (Fig. 7). For example motu2 significantly associated with *exscapa* on both bedrocks grouped with motu106 associated with both *longiscapa* and *divergent* genetic clusters. It is unlikely that PCR/sequencing artefacts produced this ecological signal because OTUs₉₈ are found in independent samples.

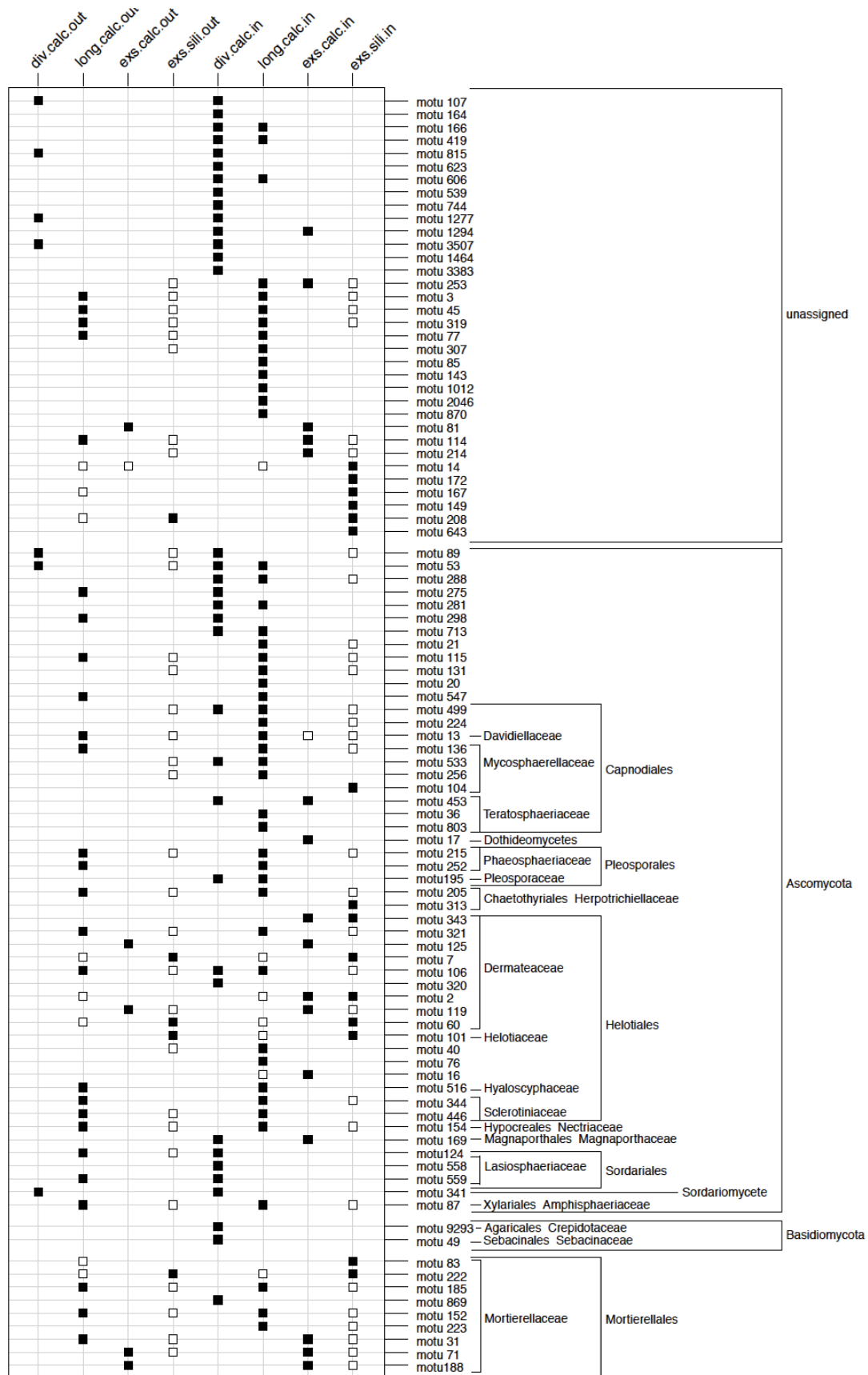


Figure 6. Pearson residuals of CHI2 for significant OTUs₉₈ that occurred more frequently in at least one group of plant (n=86). Black and white squares indicate Pearson residuals values > 1.96 or < -1.96 respectively. OTUs₉₈ are ordered according to taxonomy.

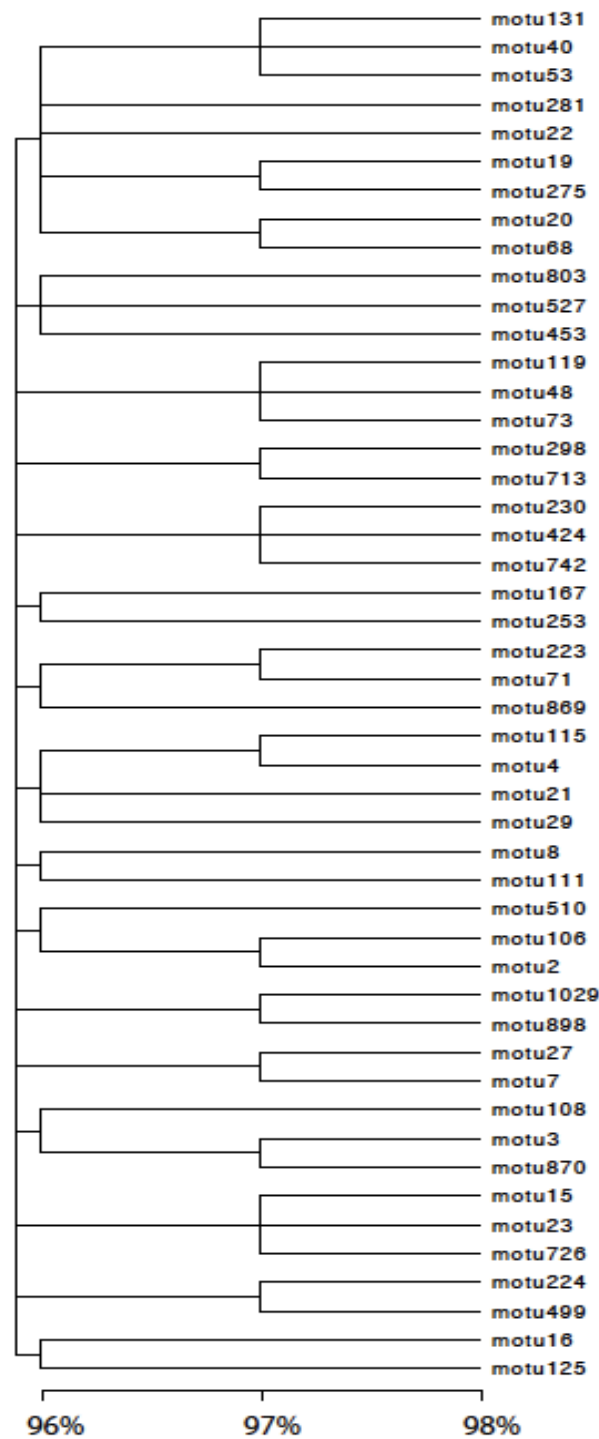


Figure 7. Similarity tree between OTUs₉₈. Two OTUs₉₈ are clustered together when their most representative sequence grouped in the same OTU at a lower similarity threshold. Two OTUs₉₈ that clustered together at a lower similarity threshold are interpreted as phylogenetically closed.

DISCUSSION

Our results show that intraspecific genetic variability affects the structure of fungal communities in one of the most important plant foundation species in the alpine

ecosystem, the cushion plant *S. acaulis*. This finding is particularly notable given that we were working with cushions distributed along strong environmental gradients and spatially isolated from each other by distance ranging from meters to kilometres between steep-sided valleys and different mountains and because of the difficulties in assessing fungal community structure. This relationship between plant genetic and fungal community structure is of particular relevance given that alpine cushion plants are foundation species involved in niche construction and ecosystem engineering that a variety of trophic levels benefits.

A plant genetic effect on the composition of fungal communities

Our result showed that the more the cushions are genetically distant, the more their associated fungal communities will differ. The effect of plant genotype on community composition and richness was mainly driven by the morphotypic difference between the loose *longiscapa* and *divergent* taxa and the dense *exscapa* taxon (Fig. 3). The effect did not own to dispersal limitation between cushions or by colonization by OTUs from the local pool and suggest plant selection of microbes from a global dispersed pool of species. Fungal communities within cushions are not a subset of the local species pool but still they could be affected by local environmental context. In this study the genetic structure of *S. acaulis* and bedrock preference are non-confounding effects and this allowed us conclude that plant genotype had a higher influence than bedrock or elevation on the composition of fungal communities. We thus conclude that the shifts in OTUs occurrence and/or abundance within cushions are directly related to plant effects (genetic and/or phenotypic) supporting the prevalence of biotic (plant species identity/plant cover composition) over abiotic parameters previously suggested (Becklin *et al.* 2012; Tejesvi *et al.* 2013; Zinger *et al.* 2011). OTUs abundance seems to be related to the changes that the plant introduced in the environment. It is conceivable that plant litter quality and quantity would be different for the two morphotypes. Indeed, soil organic matter (SOM) content, which depends on the host plant, was found to be a factor influencing fungal species distribution (Zinger *et al.* 2011). These results showed that plant features exert strong biotic selective pressure on fungal taxa and suggest substantial intraspecific genetic variation in plant traits impacting soil fungi. These plant traits should not be reduced to quantity and quality of organic matter

because we found many specific fungi with biotrophic life-style. Further, our results provide support to the “genetic similarity rule” stating that plants with a common gene pool support similar subordinate communities (Bangert *et al.* 2006).

Overall the two most abundant plant genetic group (*exscapa* and *longiscapa*) constitute two distinct habitats for subordinate fungal communities. Low OTUs richness was particularly marked in *exscapa* cushions, suggesting a stronger selective pressure in dense morphotypes compared to loose *longiscapa* cushions. Actually, there were fewer OTUs specifically associated with *exscapa* than with the OTUs-rich *longiscapa* cushions and much more were excluded (Fig. 6). Moreover, much of the OTUs specifically associated with *exscapa* were absent from the outside showing the strong engineering capacity of this plant genetic group, in contrast to *longiscapa*.

Response of fungal taxa to plant genetic: the importance of plant-associated biotrophs

The plant genetic effect on fungal communities includes changes in OTUs abundance and identity. Further plant genetic differentially affects fungi with relatively distinct life-style strategies. There are main piece of evidence supporting this hypothesis. The analysis of variance using abundance data reveals a plant morphotype effect higher than those of environmental context (bedrock and elevation), while when using occurrence data the environment and plant morphotype effects are equivalent (Table 4, Table S2). This suggested that large part of the plant genetic effect is to modulate the abundance of shared OTUs between cushions but plant genetic cluster and the environmental context also acts on OTUs occurrence. Accordingly, 34 fungal OTUs occurred more frequently associated or were excluded from a plant genetic cluster or the bedrock where plants grow (Fig. 6). Noticeably, most of these OTUs were assigned to Helotiales and Capnodiales lineages, both known to contain plant-associated biotrophs, for instance the family Dermateaceae and Mycosphaerellaceae respectively (James *et al.* 2006). The list of putative pathogens further extends to Magnaporthaceae and Sclerotiniaceae, supporting that plant-associated biotrophs are involved a species-specific fungi-plant interaction as expected for pathogenic interactions and that change in OTUs identity mainly pertains for biotrophs fungi while plant genetic affect the abundance of saprotrophs fungi. Further, a stronger correlation between fungal composition and plant

genetic distance was observed for the Helotiales and Capnodiales lineages, disregarding the use of abundance or presence absence data. Inversely, the distribution of OTUs₉₈ within Mortierellales, known to be saprotrophs polymer-degrading fungi (James *et al.* 2006), was mainly dependant of cushion soil pH (but see below for an example of specificity of three Mortierellales OTUs for each genetic clusters). Our results accord with recent finding that plant and fungal richness is positively correlated in Amazon forest for lineages with strong plant associations but not for saprotrophs lineages (Peay *et al.* 2013). We thus show that plant differently impacts fungi according to their lifestyles and suggest that response to plant genetic could be roughly predicted by broad fungal trophic strategies.

Response of fungal taxa to plant genetic and environmental context. Fine-tuning and fungal adaptation?

The sampling design and the geographical isolation of cushions also provide an interesting frame to study genetic variation between the fungal phylotypes at different habitats. ITS1 size-polymorphism impairs a robust phylogenetic analysis, while a finer taxonomic assignation of OTUs is precluded because of the limitations of databases, the limited predictive power of a single molecular marker and the exotic environments studied. The only possible way is to determine whether the OTUs obtained at 98% of similarity, do coalesce at lower similarities. We have found this feature for several of specific OTUs₉₈ (Fig. 7). For example, the couples 223-71-869 (Mortierellales), 2-106 (*Oculimabula yallundae*), 253-167 (unassigned), which are clustered in the same OTU at 97 and/or 96% of similarity, display specificity to either the dense and loose morphotypes (2-106), for either calcareous *longiscapa*, *divergent* or *exscapa* (223-71-869), or to either bedrocks (253-167) (Fig. 7). While these results should be cautiously interpreted, it is tempting to speculate that each of these couples shared a common ancestor. These common ancestors may have evolved to better fit in the new habitat or to better interact with a specific plant genetic cluster. Specifically, the two putative biotrophs phylotypes motu2 and motu106 might have co-specified with *S. acaulis longiscapa* and *exscapa* divergence. Further, motu320 also assigned to *Oculimacula yallundae* was associated with the *divergent* genetic cluster. Similarly, the Mortierellales motu223, motu71 and motu869 might have specialized to the three plant genetic

clusters but on calcareous bedrock only, supporting the influence of pH in their distribution.

Conclusion

Our study supports the importance of plant genetic variation on soil fungal communities assembly. We identified key abundant fungal taxa varying in abundance and occurrence according to plant genotype. Further, response of fungal taxa to plant divergence could be predicted by life-style strategies. Specifically, each plant genetic clusters are associated with specific biotrophs fungi. The observation of distinct fungal assemblages associated with different close relatives plant taxa is of particular relevance in the light of niche construction, ecosystem engineering and nurse effect by foundation species. Our results showed that these plant taxa experience a biotic environment mainly dependent of their genetic background. It would be of particular value to assess the degree of functional redundancy between fungal species associated with each plant genetic cluster.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was conducted at the long-term research site Zone Atelier Alpes, in the ILTER-Europe network. We are grateful to the Station Alpine Joseph Fourier (SAJF) for providing field logistics and facilities during the field campaign. We acknowledge Laure Gallien for her help in filtering AFLP data. We acknowledge Lucie Zinger and Damien Georges for help on R scripting. The CNRS-LECA provides fundings to run the “Vertical Ecology” project. The ANR project METABAR (ANR 11 BSV7 020 01) also contributed to this project. J. Roy received a grant from the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**, 32-46.
- Anthelme F, Buendia B, Mazoyer C, Dangles O (2012) Unexpected mechanisms sustain the stress gradient hypothesis in a tropical alpine environment. *Journal of Vegetation Science* **23**, 62-72.

- Antonsson H, Bjork RG, Molau U (2009) Nurse plant effect of the cushion plant *Silene acaulis* (L.) Jacq. in an alpine environment in the subarctic Scandes, Sweden. *Plant Ecology & Diversity* **2**, 17-25.
- Arrigo N, Tuszyński JW, Ehrich D, Gerdes T, Alvarez N (2009) Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *Bmc Bioinformatics* **10**, 14.
- Arroyo MTK, Cavieres LA, Penalzoza A, Arroyo-Kalin MA (2003) Positive associations between the cushion plant *Azorella monantha* (Apiaceae) and alpine plant species in the Chilean Patagonian Andes. *Plant Ecology* **169**, 121-129.
- Aubert S, Boucher F, Lavergne S, Renaud J, Choler P (2014) 1914-2014: A revised worldwide catalogue of cushion plants 100 years after Hauri and Schroter. *Alpine Botany* **124**, 59-70.
- Badano EI, Cavieres LA (2006) Impacts of ecosystem engineers on community attributes: effects of cushion plants at different elevations of the Chilean Andes. *Diversity and Distributions* **12**, 388-396.
- Bailey JK, Deckert R, Schweitzer JA, *et al.* (2005) Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **83**, 356-361.
- Bangert RK, Turek RJ, Rehill B, *et al.* (2006) A genetic similarity rule determines arthropod community structure. *Molecular Ecology* **15**, 1379-1391.
- Becklin KM, Hertweck KL, Jumpponen A (2012) Host Identity Impacts Rhizosphere Fungal Communities Associated with Three Alpine Plant Species. *Microbial Ecology* **63**, 682-693.
- Benjamini Y, Hochberg Y (2000) On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **25**, 60-83.
- Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, *et al.* (2012) Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* **21**, 1897-1908.
- Bock C (1983) Quelques aspects de la variation infraspécifique chez le *Silene acaulis* (L.) Jacq. . In: *Compt.-Rendus 108è., Congrès National Soc. Savantes, Sect. Sci., Fasc. 2* pp. 9-20, Grenoble.
- Bonin A, Bellemain E, Eidesen PB, *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-3273.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**, 3737-3758.
- Botnen S, Vik U, Carlsen T, *et al.* (2014) Low host specificity of root-associated fungi at an Arctic site. *Molecular Ecology* **23**, 975-985.
- Bouasria A, Mustafa T, De Bello F, *et al.* (2012) Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. *European Journal of Soil Biology* **52**, 59-66.
- Buee M, Reich M, Murat C, *et al.* (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* **184**, 449-456.
- Cavieres LA, Badano EI (2009) Do facilitative interactions increase species richness at the entire community level? *Journal of Ecology* **97**, 1181-1191.
- Cavieres LA, Badano EI, Sierra-Almeida A, Gomez-Gonzalez S, Molina-Montenegro MA (2006) Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion

- plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytologist* **169**, 59-69.
- Cavieres LA, Badano EI, Sierra-Almeida A, Molina-Montenegro MA (2007) Microclimatic modifications of cushion plants and their consequences for seedling survival of native and non-native herbaceous species in the high andes of central Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **39**, 229-236.
- Davey ML, Heegaard E, Halvorsen R, Kauserud H, Ohlson M (2013) Amplicon-pyrosequencing-based detection of compositional shifts in bryophyte-associated fungal communities along an elevation gradient. *Molecular Ecology* **22**, 368-383.
- Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-20.
- Hersch-Green EI, Turley NE, Johnson MTJ (2011) Community genetics: what have we accomplished and where should we be going? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **366**, 1453-1460.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818-822.
- Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, *et al.* (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* **22**, 5271-5277.
- Lentendu G, Zinger L, Manel S, *et al.* (2011) Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. *Fungal Diversity* **49**, 113-123.
- Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* **12**, 106-117.
- Molenda O, Reid A, Lortie CJ (2012) The Alpine Cushion Plant *Silene acaulis* as Foundation Species: A Bug's-Eye View to Facilitation and Microclimate. *Plos One* **7**.
- Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, *et al.* (2013) Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biology and Fertility of Soils* **49**, 1131-1139.
- Needlema.Sb, Wunsch CD (1970) A GENERAL METHOD APPLICABLE TO SEARCH FOR SIMILARITIES IN AMINO ACID SEQUENCE OF 2 PROTEINS. *Journal of Molecular Biology* **48**, 443-&.
- Oksanen J, F. Guillaume Blanchet, R. Kindt, *et al.* (2011) vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-6. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Peay KG, Baraloto C, Fine PVA (2013) Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *Isme Journal* **7**, 1852-1861.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roy J, Albert CH, Choler P, *et al.* (2013) Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Schweitzer JA, Bailey JK, Fischer DG, *et al.* (2008) Plant-soil-microorganism interactions: Heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. *Ecology* **89**, 773-781.

-
- Tejesvi MV, Sauvola T, Pirttila AM, Ruotsalainen AL (2013) Neighboring *Deschampsia flexuosa* and *Trientalis europaea* harbor contrasting root fungal endophytic communities. *Mycorrhiza* **23**, 1-10.
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**, 296-310.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP - A NEW TECHNIQUE FOR DNA-FINGERPRINTING. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Yang Y, Niu Y, Cavieres LA, Sun H (2010) Positive associations between the cushion plant *Arenaria polytrichoides* (Caryophyllaceae) and other alpine plant species increase with altitude in the Sino-Himalayas. *Journal of Vegetation Science* **21**, 1048-1057.
- Zancarini A, Mougél C, Terrat S, Salon C, Munier-Jolain N (2013) Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant and Soil* **365**, 183-199.
- Zinger L, Coissac E, Choler P, Geremia RA (2009a) Assessment of Microbial Communities by Graph Partitioning in a Study of Soil Fungi in Two Alpine Meadows. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 5863-5870.
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, *et al.* (2011) Contrasting Diversity Patterns of Crenarchaeal, Bacterial and Fungal Soil Communities in an Alpine Landscape. *Plos One* **6**.
- Zinger L, Shahnava B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009b) Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *Isme Journal* **3**, 850-859.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

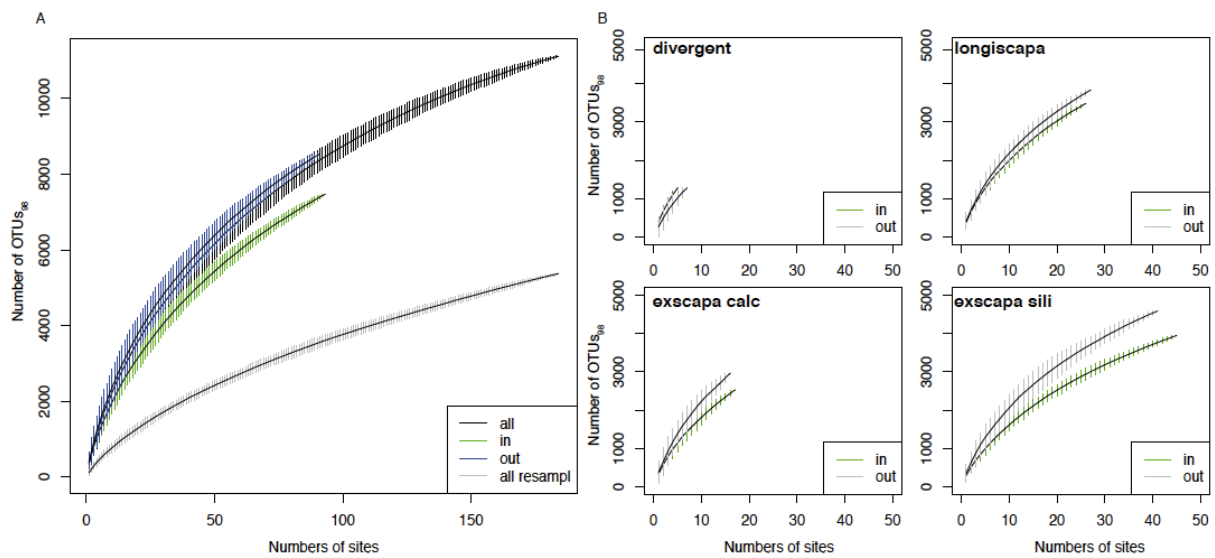


Figure S1. A) Accumulation curves of OTUs₉₈ richness vs. sampling effort for entire, outside and inside cushion habitats. B) Accumulation curves of OTUs₉₈ richness vs. sampling effort for each plant group.

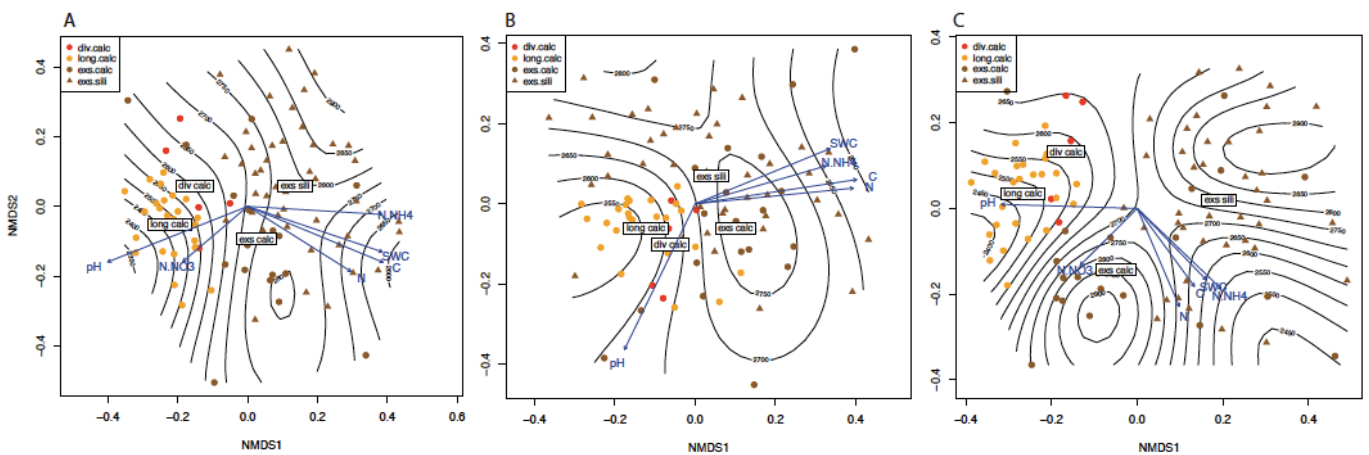


Figure S2. Community structure of fungal communities associated with cushions A) for the combinations of the 30 most represented OTUs₉₈ by habitat type, B) for OTUs₉₀ and C) for presence absence data of the rarefied matrix, represented through NMDS ordination of Bray-Curtis pairwise dissimilarities of fungal communities. Stress values are 0.25 and 0.25 and 0.25 for A), B) and C). The high stress value (>0.2) implies substantial loss of information in the 2D space. Groups' centroids of fungal communities are marked with the name of the habitat type. Arrows fitted into the ordination indicate the direction in the 2D space in which the variable most varies. Surface fitted into the ordination indicates the direction in the 2D space in which the elevation most varies. Only significant variable are represented. Variables were tested with the *envfit* function in *vegan* and 999 permutations.

Table S1. Effect of cushion morphotype, bedrock and elevation on OTUs₉₈ composition in outside and within cushions assessed by non-parametric analysis of variance using presence/absence data.

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
cushion morphotype	1	1.419	1.41902	3.8256	0.03750	0.001
bedrock	1	0.901	0.90062	2.4280	0.02380	0.001
elevation	1	0.681	0.6808	1.8354	0.01799	0.002

III. Discussion

1. Sur la diversité génétique au sein de *S. acaulis*

La différence phénotypique observée entre les deux taxons de *S. acaulis* proposés à une base génétique. De manière intéressante, un troisième groupe génétique émerge au sein des individus au phénotype lâche (*divergent*). Il pourrait correspondre à la sous-espèce *cenisia* dont la présence est observée dans la région du Lautaret (Bock 1983) et dont les caractéristiques morphologiques sont intermédiaires entre *exscapa* et *longiscapa*. Les différentes sous-espèces proposées pourraient correspondre à des taxons génétiques ayant des caractéristiques écologiques propres (voir ci-dessous). Il est intéressant de noter que nous retrouvons peu d'hybrides entre les groupes, particulièrement entre *exscapa* et *longiscapa*. Ces groupes peuvent être considérés comme des espèces distinctes dans la systématique du taxon. La confirmation du troisième groupe est nécessaire, avec la caractérisation génétique d'individus supplémentaires dans d'autres parties des Alpes. Les profils AFLP sont d'ores et déjà obtenus pour d'autres individus dans les Ecrins et restent à analyser.

Les environnements abiotiques diffèrent entre les trois groupes génétiques (Figure II.1). Nous confirmons la stricte préférence de roche mère pour seulement un des deux taxons. *Longiscapa*, ou du moins les individus lâches (*longiscapa* et groupe dit *divergent*) ne sont observés que sur calcaire. A l'inverse, *exscapa*, bien que retrouvé principalement sur silice, est retrouvé sur calcaire également. Il était proposé que *exscapa* ne se trouve pas sur calcaire du fait de sa façon de gérer le taux élevé de calcium comparé à *longiscapa*. *Exscapa* s'accommode des fortes teneurs en calcium par la synthèse et la sécrétion d'oxalate, coûteuse en énergie. *Exscapa* serait donc exclue sur calcaire par *longiscapa* par compétition. Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi l'on observe *exscapa* dans un massif à dominante calcaire. Premièrement *exscapa* sur calcaire se trouve dans les sites les plus haut en altitude, similaire à l'altitude d'*exscapa* sur silice, témoignant d'une adaptation aux milieux extrêmes. Cela ne se reflète cependant pas sur les variables abiotiques du sol que l'on a mesurées, invoquant des facteurs d'ordre climatique. Deuxièmement, la géologie complexe du massif. Les cartes géologiques indiquent la présence de calcschistes sur les sites où se trouvent *exscapa*, dont la teneur en silice est plus élevée que pour les calcaires dolomitiques des sites où

nous avons échantillonné *longiscapa*. De plus, il est possible que ce substrat soit moins meuble que les zones où s'établit *longiscapa*, car ce type de roche peut être métamorphisée. Un troisième hypothèse excitante, bien que peu parcimonieuse, serait le rôle des champignons pathogènes et du mécanisme d'auto-incompatibilité entre les deux taxons (voir « Du rôle des champignons pathogènes dans la spéciation des plantes »). Enfin, le système n'est peut être pas stable et la dynamique en cours peut mener à terme à l'exclusion de *exscapa* de ce site. N'ayant pas observé de coussins lâches sur ce site et étant donnée la longévité des individus, cela est peu probable. Le groupe *divergent* est également retrouvé dans un environnement différent des deux autres groupes génétiques. Dans notre étude, ce sont les seuls coussins sur un plateau venté. Ils pourraient être plus adaptés à la haute altitude que les coussins lâches de *longiscapa*, voire être une adaptation des coussins lâches à la haute altitude.



Longiscapa - calcaire (Aiguillette du Lauzet, 2550 m)



Divergent - calcaire (Roche Colombe, 2850 m)



Exscapa - calcaire (Tour Termier, 2900 m)



Exscapa - silice (Pointe de l'Etendard, 2700 m)

Figure II.1. Exemple d'habitats dans lesquels les trois groupes génétiques de *S. acaulis* révélés dans notre étude ont été observés. Photos projet ECOVER.

2. La réponse des lignées biotrophes à la divergence chez le *S. acaulis*

Nos résultats ont montré que les lignées biotrophes étaient plus sensibles à la divergence au sein de *S. acaulis* que les lignées saprotrophes. Ce résultat est logiquement en accord avec le fait que les biotrophes sont étroitement liés aux plantes du fait d'une interaction physique imposant une réponse directe de l'une ou l'autre des parties à l'influence de la première. Plusieurs MOTUs appartenant à des lignées connues pour contenir des biotrophes associés aux plantes, voire des pathogènes (Hélotiales - Dermateaceae-, Capnodiales -Mycosphaerellaceae, Davidiellaceae-) sont donc spécifiques de chaque sous-espèce, incluant les trois clusters génétiques. Certains de ces MOTUS sont potentiellement phylogénétiquement proches. De plus, les communautés de chaque morphotype sont dominées par un MOTU assigné à un champignon biotrophe/pathogène.

De manière intéressante, le lien plante-champignons biotrophes est observé dans d'autres systèmes. La distribution de champignons biotrophes reflète la dynamique de recolonisation post-glaciaire de *Carex curvula* dans les Alpes (Geremia *et al. in prep*) de la même manière que la distribution des biotrophes reflète la divergence au sein de *S. acaulis*. Également, chaque communauté d'arbre dans un écosystème tropical en Amazonie héberge des champignons biotrophes spécifiques (Peay *et al.* 2013). Ces observations posent la question de l'importance des interactions biotrophiques entre champignons et plantes longévives. La longue durée de vie pourrait entraîner une exposition longue et une accumulation de pathogènes recrutés dans le pool régional et/ou qui se sont co-spéciés lors de la divergence récente au sein du taxon ancestral de *S. acaulis* puis ayant co-évolué avec les différents taxons de *S. acaulis* tout comme durant la dynamique de recolonisation post-glaciaire chez *C. curvula*.

Nous nous attendions à retrouver également des champignons du genre *Microbotryum*. *Microbotryum violaceum* est une espèce parasite obligatoire de plusieurs espèces de Caryophyllaceae. Cette espèce constitue en réalité un complexe d'espèces cryptiques spécialisées dans l'infection de différentes espèces de Caryophyllaceae (Le Gac *et al.* 2007). Aucune séquence du jeu de donnée n'était assignée aux Microbotryomycètes ni aux Ustilaginomycètes (ancien nom du genre de l'espèce : Ustilago).

3. Génétique des communautés et construction de niche

Il est particulièrement intéressant de voir que *longiscapa* et *exscapa* constituent deux habitats contrastés. Les deux taxons génétiques *exscapa* et *longiscapa* expriment des différences morphologiques marquées, à commencer par la différence de densité des coussins. Cette divergence morphotypique est très probablement à l'origine des teneurs en nutriments et en eau, plus élevées dans les coussins denses (Figure II.2).

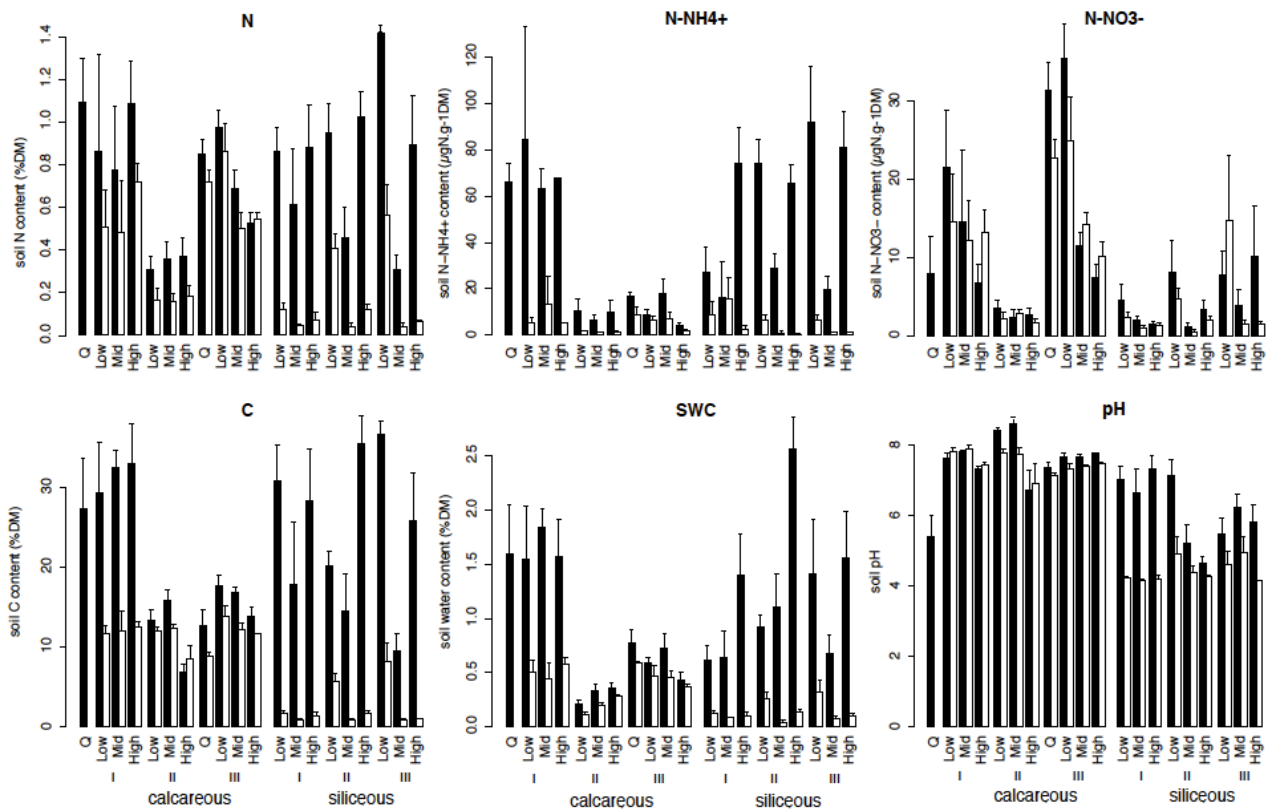


Figure II.2. Caractéristiques abiotiques des sols de coussins (noir) et extérieurs (blanc) pour chaque population. Les contenus en carbone, eau et en ammonium sont liés au phénotype des coussins.

Ces variables édaphiques reflètent probablement des caractéristiques éco-physiologiques propres à chaque sous-espèce et il est très probable que les deux taxons *longiscapa* et *exscapa* aient des stratégies écologiques différentes. La capacité à modifier l'environnement abiotique est plus importante chez *exscapa*. Cela se reflète sur l'environnement biotique. En effet, la plupart des MOTUs retrouvés préférentiellement chez *exscapa* ne sont pas retrouvés à l'extérieur, contrairement à *longiscapa*. De plus, une plus grande proportion de MOTUs sont significativement exclus de *exscapa*. Cet environnement biotique diffère entre les deux taxons. En accord avec le faible nombre

de MOTUs associés et la plus forte proportion de MOTUs exclus, la richesse en MOTUs est plus faible dans les coussins de *exscapa*. De plus, les deux taxons n'hébergent pas les mêmes champignons. Les champignons les plus abondants de *longiscapa* et *exscapa* sont respectivement assignés à *Cladosporium* (motu13) et *Oculimacula yallundae* (motu2). Ces champignons sont tous les deux décrits comme étant des pathogènes des plantes. Ils pourraient participer négativement ou positivement à l'effet facilitateur des coussins sur les autres plantes (Table II.1). Ainsi, une différence de virulence entrainerait une différence dans le pouvoir facilitateur entre espèces fondatrices. Leur rôle reste à définir afin de savoir s'il y a redondance fonctionnelle. Enfin, les Sébacinales sont plus abondants dans les coussins de *longiscapa*. Etant donné le rôle mutualiste potentiel de ces champignons, leur présence pourrait participer positivement à l'effet facilitateur des coussins sur les autres plantes (Table II.1). Ainsi, la divergence génétique au sein de *S. acaulis* se manifeste par une capacité ingénieuse et un environnement subi différent entre sous-espèces qui très probablement impacte en retour les pressions de sélection.

Table II.1. Proposition de l'influence des champignons dans les interactions plantes-plantes impliquant une plante fondatrice/nurse, en fonction du mode de vie.

Mode de vie		Effet	Mécanisme		Conséquence sur l'effet facilitateur
saprotrophe		indirect	apport nutriments pour facilité (minéralisation)		+
			retient nutriments pour facilité (immobilisation)		-
biotrophe	agoniste	direct	diminution performance du facilité		-
		indirect	diminution performance du facilitateur	espèce compétitive	+
				espèce non compétitive	-
	mutualiste	direct	augmente performance facilité		+
		indirect	augmente performance facilitateur	espèce compétitive	-
				espèce non compétitive	+
nécrotrophe		direct	mort du facilitateur		-

Il est important de noter que la présence de plusieurs champignons pathogènes sur une plante n'est possible que par une faible pathogénicité de ces microorganismes. Cela témoigne d'un changement de stratégie des champignons pour exploiter au maximum l'hôte chez les plantes longévives. Il est aussi possible que ces champignons soient des endophytes ayant complètement perdu leur pouvoir pathogène. Quel que soit le degré de parasitisme ou de mutualisme des ces champignons, si le statut biotrophe de ces champignons est avéré, ils peuvent avoir un impact sur le pouvoir facilitateur des différentes sous-espèces.

4. Du rôle des champignons pathogènes dans la spéciation des plantes

Dans cette étude, aucune des variables climatiques et topographiques ne corrélaient avec la répartition spatiale d'*exscapa* et *longiscapa* à l'échelle d'étude. Un échantillonnage et une analyse à plus grande échelle sont nécessaires. Bien que spéculatif et sans support, il est tentant d'imaginer que des facteurs biotiques tels que les champignons pourraient être impliqués dans la divergence au sein de *S. acaulis*. En effet, une nécrose chez les hybrides suite à un mécanisme d'auto-immunité, communément connue comme les incompatibilités de Dobzhansky-Müller (Orr & Turelli 2001) peut agir comme une barrière aux flux de gènes entre populations exposées à différents pathogènes (Bomblies *et al.* 2007; Bomblies & Weigel 2007; Ispolatov & Doebeli 2009). Ce processus a été montré chez *Arabidopsis thaliana* et modélisé (Ispolatov & Doebeli 2009). De manière intéressante, très peu d'hybrides ont été observés dans l'étude, ce qui pourrait supporter une valeur sélective réduite des hybrides. Cependant, il est nécessaire i) que l'assignation taxonomique soit confirmée, ii) que le statut biotrophe et la pathogénicité soient avérés et iii) de faire une analyse de génétique des populations complète à l'échelle des Alpes françaises. Ensuite, si l'hypothèse tient, il faudrait i) génotyper des individus nécrosés sur le terrain, puis ii) tester si une maladie auto-immune survient suite à un croisement entre taxons, en milieu contrôlé. La graine devrait être stérilisée si le champignon est présent au niveau du tégument.

Ainsi, ce travail montre que la caractérisation des champignons associés à différents groupes génétiques de plantes peut apporter des indices et soulever des hypothèses

quant aux conséquences écologiques et évolutives de la divergence des plantes mais aussi quant aux causes de cette divergence.

Le génotype de la plante affecte le recrutement des champignons et cet effet prédomine sur l'environnement abiotique extérieur. Dans une certaine mesure, la sensibilité de réponse aux types de plantes pourrait être prédite par des groupes fonctionnels grossiers établis sur les modes de nutriments auxquels appartiennent des champignons pourtant répartis dans des clades phylogénétiquement distants. Le génotype de la plante affecte aussi la capacité à modifier l'habitat biotique et abiotique, susceptible d'avoir des conséquences différentes sur les communautés et les écosystèmes et en retour les pressions de sélection sur la plante.

Chapitre III. Effet des plantes en coussins sur la variation des communautés microbiennes le long de gradients d'altitude

Partie I. Patrons de diversité microbienne altitudinaux

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte général

Le design expérimental du jeu de données Ecologie Verticale comprenait des gradients environnementaux croisés et hiérarchiques. Dans les deux premiers chapitres nous avons rapporté la structure générale des communautés bactériennes et fongiques et les facteurs majeurs qui les structuraient. L'altitude n'était pas un facteur majeur. Toutefois, étant donné l'engouement récent de la communauté scientifique en microbiologie environnementale pour les patrons de diversité altitudinaux, il est apparu important de les étudier plus en détail dans notre système d'étude.

L'étude des gradients altitudinaux de diversité date de l'émergence et de la fondation de la biogéographie. Il y a environ 250 ans, Carol von Linné (1781) documentait des communautés distinctes de plantes et d'animaux caractérisant la succession de zones climatiques le long des pentes de montagnes. D'un point de vue pratique, les gradients d'altitude sont caractérisés par des changements drastiques de conditions climatiques et de communautés biotiques à de faibles distances spatiales. Ils sont donc un bon proxy pour simuler un réchauffement climatique. L'étude des réponses de taxons ou de structure de communauté aux gradients d'altitude a également mené à rechercher une généralisation des patrons de biodiversité.

Les patrons altitudinaux de diversité ont été documentés pour un grand panel de groupes taxonomiques, incluant les arbres, les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les insectes et les amphibiens. De manière générale, la richesse en espèces de ces taxons soit décroît de manière monotone avec l'augmentation de l'altitude ou montre un pic de richesse à des altitudes intermédiaires.

Bien que ces patrons de diversité soient étudiés depuis plusieurs siècles pour les plantes et les animaux, ils commencent seulement à l'être pour les microorganismes. Pour les bactéries comme pour les champignons aucune grande tendance générale de richesse n'est observée. La richesse bactérienne tend à décroître dans certains cas (Bryant *et al.* 2008), ou non (Fierer *et al.* 2011), voire augmente (Wang *et al.* 2011). De manière intéressante, ces trois études ont comparé en parallèle la richesse pour certains groupes de macroorganismes et concluent que les patrons de diversité des microorganismes diffèrent fondamentalement des patrons de diversité des macroorganismes. Concernant les champignons et autres microeucaryotes, les tendances de richesse semblent également difficilement prévisibles et varient suivant le groupe taxonomique ou fonctionnel étudié (Meier *et al.* 2010; Meng *et al.* 2013).

A l'inverse, qu'il y ait des changements de richesse ou non, des patrons de beta diversité sont généralement mis en évidence (Bryant *et al.* 2008; Cordier *et al.* 2012b; Fierer *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012). Ces changements sont généralement prédictibles ; plus la différence d'altitude augmente entre communautés plus ces communautés sont différentes. Ces changements de composition sont reliés aux changements de végétation, notamment pour les bactéries de la phyllosphère (Fierer *et al.* 2011), au pH du sol pour les Acidobactéries du sol (Bryant *et al.* 2008) ou encore à l'humidité des sols pour les champignons (Gomez-Hernandez *et al.* 2012). Les quelques études ayant suivi les communautés microbiennes associées à une seule plante hôte distribuée le long du gradient d'altitude montrent un effet supposé des températures pour les champignons de la phyllosphère (Coince 2014, Cordier *et al.* 2012b), du pH pour les champignons de la rhizosphère (Coince 2014) et probablement de la végétation alentour (Davey *et al.* 2013a). Les patrons de beta-diversité semblent changer suivant l'habitat considéré (Davey *et al.* 2013a; Fierer *et al.* 2011) avec des changements plus prédictibles et plus sensibles dans un habitat qu'un autre en parallèle d'une sélection d'espèces différentes le long du gradient suivant l'habitat.

2. Objectifs et démarche de l'étude

L'objectif ici n'est pas de rajouter un patron de plus concernant les patrons altitudinaux de diversité. Aucune étude n'a testé la différence de patrons de diversité entre un habitat plante et un habitat de sol non végétalisé. Cette comparaison a le potentiel de préciser l'influence des plantes sur la structure des communautés microbiennes et leur réponse

aux changements environnementaux. Il est essentiel de prendre en compte le contexte extérieur pour espérer démêler les effets de la plante de ceux du contexte abiotique. De plus, nous avons montré que les coussins structuraient toute une communauté bactérienne et fongique. Il sera particulièrement intéressant de voir comment cet effet positif varie en fonction de la contrainte environnementale, ici l'altitude.

Pour cela, nous analysons la richesse en MOTUs et le changement de composition des communautés dans les différents habitats. Pour les champignons, nous utilisons la table site/MOTUs décrite précédemment (voir Chapitre II). Pour les bactéries, nous utilisons une table sites/MOTUs pour des MOTUs définis à 97% de similarité à partir de séquences ayant subi le même processus de filtre et en utilisant le programme *mcl* de manière similaire aux champignons (voir Article II). Cependant, nous ne passons pas par une étape de déréduplication des séquences ADN car la diversité est très grande et cette étape ne permet pas de la réduire (le nombre totales de séquences lues correspond grossièrement au nombre de séquences uniques, i.e. MOTU à 100% de similarité). Afin de prendre en compte les différences de profondeur de séquençage entre échantillons, les échantillons ayant moins de 500 séquences sont supprimés, et les échantillons restant sont rééchantillonnés à 450 séquences par échantillon. Les effets de l'altitude, de la roche mère et de la plante sur la richesse en MOTUs sont testés par modèles mixtes de la même manière que dans le Chapitre I. La significativité des patrons de beta diversité en fonction de l'altitude est testée par des tests de Mantel.

II. Résultats

La richesse en MOTUs tend globalement à décroître avec l'altitude pour les bactéries et les champignons, particulièrement à l'intérieur des coussins quelles que soient la roche mère et la sous-espèce de *S. acaulis* (Figure III.I.1, Table III.I.1). A l'échelle de chaque gradient/site, certains sites montrent un patron différent voire inverse (cas des sites CI et CII pour la richesse en champignons dans les coussins par exemple).

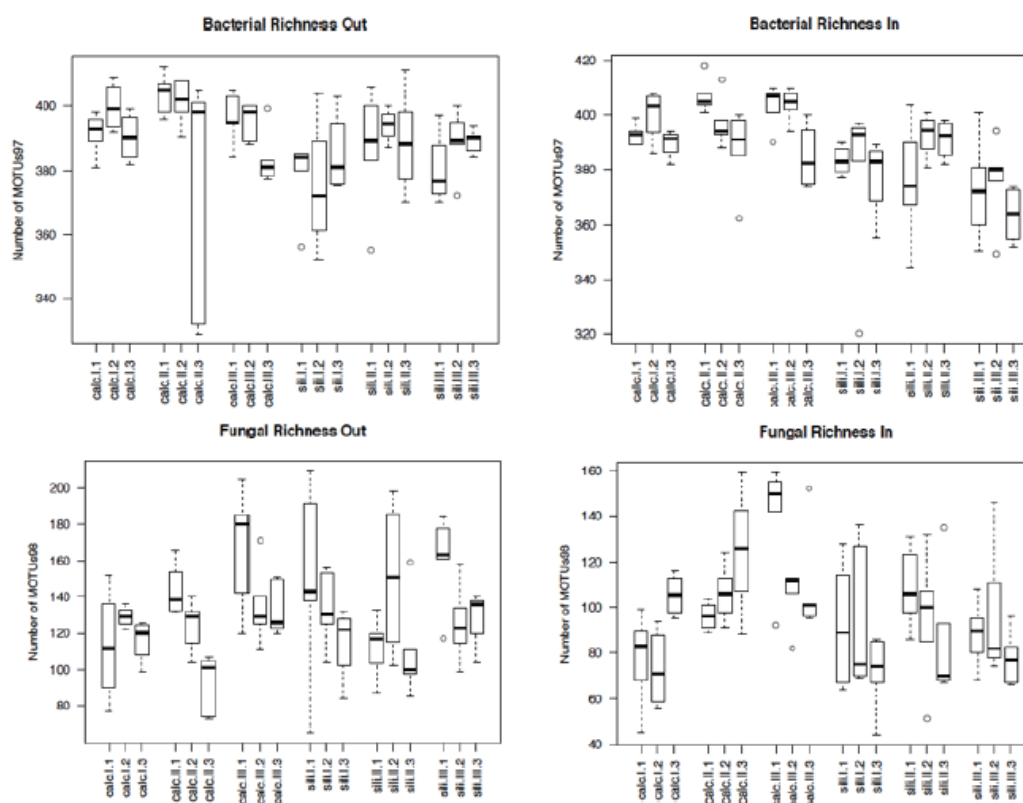


Figure III.I.1. Richesse en MOTUs pour les bactéries et les champignons le long de gradient d'altitude en fonction de l'habitat intérieur ou extérieur des coussins. Les boîtes représentent les quartiles bas, médian et haut des données brutes, avec les valeurs minimum et maximum indiquées par la ligne extérieure à la boîte. Les outliers sont représentés par des cercles ouverts.

En ce qui concerne la composition des communautés (Figure III.I.2, Table III.I.2), quel que soit l'habitat, plus l'altitude séparant les communautés fongiques est grande, plus la composition des communautés diffère. Cependant, cet effet de l'altitude varie, notamment sur silice où les communautés fongiques répondent fortement à l'altitude à l'extérieur alors que cet effet est plus faible à l'intérieur. Pour les bactéries, l'effet de l'altitude est manifeste sur silice mais pas sur calcaire. La structure des communautés

fungiques est beaucoup plus sensible à l'altitude que celle des communautés bactériennes.

Table III.I.1. Effets des coussins, du type de coussins, de la roche mère et de l'altitude sur la richesse bactérienne et fongique. Les statistiques sont issues des modèles mixtes avec les gradients en effet aléatoires. **Les p-values sont obtenues par une comparaison du modèle présenté à un modèle sans effets fixes.**

	Model	p value	Explanatory variables	Estimate	Std.Error	t value
Fungi All	cuhision*elevation	2.2e-16	(Intercept)	229.678988	31.522917	7.286
			alt	-0.049273	0.011738	-4.198
			locout	27.186619	43.490405	0.625
			alt:locout	0.002026	0.016243	0.125
Fungi In	taxon*elevation	0.003333	(Intercept)	146.29436	53.96115	2.711
			alt	-0.02053	0.01933	-1.062
			taxonlongiscapa	61.13417	81.61435	0.749
			alt:taxonlongiscapa	-0.01690	0.03091	-0.547
Fungi Out	bedrock*elevation	0.0009379	(Intercept)	2.988e+02	4.853e+01	6.156
			alt	-6.435e-02	1.826e-02	-3.525
			bedrocksili	1.257e+01	9.002e+01	0.140
			alt:bedrocksili	-9.344e-04	3.302e-02	-0.028
Bacteria All	cuhision*elevation	0.1782	(Intercept)	432.077862	20.988279	20.587
			alt	-0.016541	0.007769	-2.129
			locout	-35.902890	23.916899	-1.501
			alt:locout	0.013804	0.008950	1.542
Bacteria In	bedrock*elevation	0.006822	(Intercept)	456.71167	33.79671	13.513
			alt	-0.02269	0.01267	-1.791
			bedrocksili	-85.24860	52.98163	-1.609
			alt:bedrocksili	0.02527	0.01945	1.299
Bacteria Out	bedrock*elevation	0.149	(Intercept)	433.15552	31.58103	13.716
			alt	-0.01529	0.01185	-1.290
			bedrocksili	-82.14108	51.74333	-1.587
			alt:bedrocksili	0.02761	0.01894	1.458

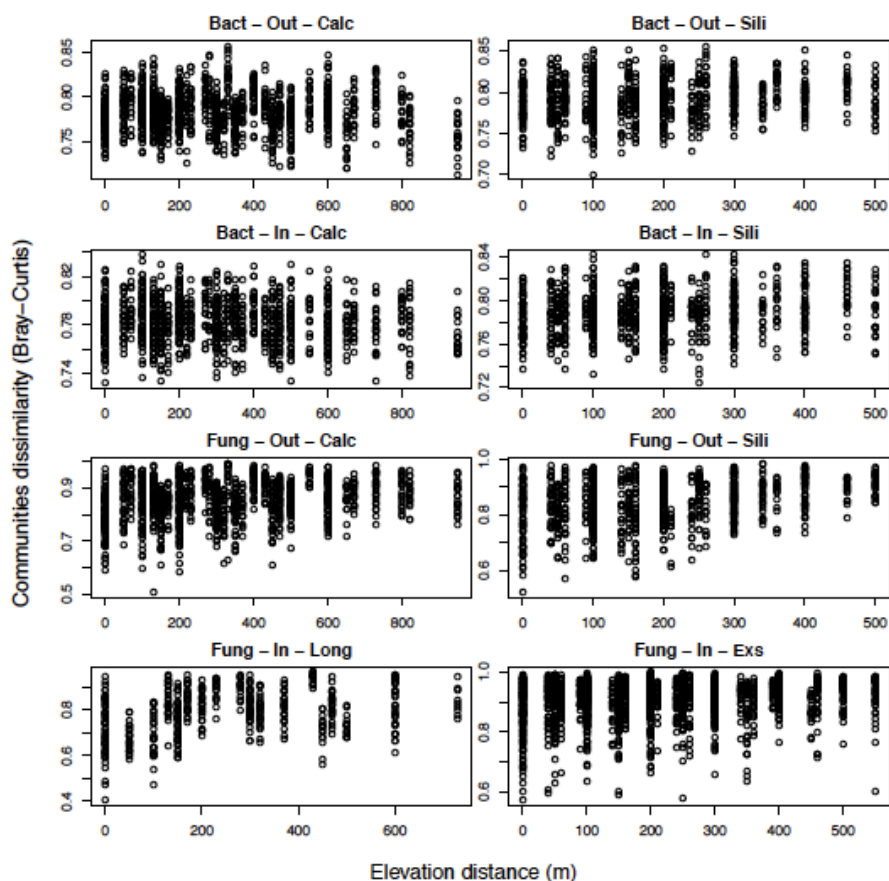


Figure III.1.2. Beta diversité altitudinale des communautés bactériennes et fongiques en fonction de l’habitat.

Table III.1.2. Corrélacion entre la beta diversité des communautés bactériennes et fongiques en fonction de la distance altitudinale. La corrélacion est testée par un test de Mantel (et test partiel de Mantel). r, coefficient de corrélacion de Pearson et P, p-value obtenues après 999 permutations.

	model	r	p value
Fungi Out sili	~alt	0.2779	0.001
	~alt geo	0.2531	0.001
	~alt env	0.2443	0.001
Fungi Out calc	~alt	0.2124	0.001
	~alt geo	0.1305	0.027
	~alt env	0.2773	0.001
Fung In long	~alt	0.2941	0.001
	~alt geo	0.2716	0.008
	~alt env	0.1908	0.03
Fung In sili	~alt	0.1902	0.001
	~alt geo	0.1756	0.001
	~alt env	0.2098	0.001
Fung In exs	~alt	0.1211	0.005
	~alt geo	0.1094	0.005
	~alt env	0.1699	0.002
Bacteria Out sili	~alt	0.1174	0.028
	~alt geo	0.1141	0.024
	~alt env	0.1156	0.033
Bacteria Out calc	~alt	-0.0567	0.8
	~alt geo	-0.0841	0.871
	~alt env	0.02731	0.328
Bacteria In sili	~alt	0.154	0.003
	~alt geo	0.153	0.006
	~alt env	0.1866	0.002
Bacteria In calc	~alt	-0.07131	0.88
	~alt geo	-0.1312	0.984
	~alt env	-0.06977	0.891

III. Discussion

Les résultats montrent un effet significatif de l'altitude sur la richesse et composition des communautés bactériennes et fongiques. L'influence de l'altitude varie cependant selon le domaine et l'habitat considéré, particulièrement pour la beta diversité.

Les patrons altitudinaux de richesse sont globalement prédictibles, caractérisés par une baisse de richesse avec l'altitude. Ce patron tient pour les bactéries et les champignons. Les patrons altitudinaux de beta diversité sont plus variables. Plus l'altitude séparant les communautés est grande, plus la composition des communautés diffère. Ce patron est surtout vrai pour les champignons. Cela peut s'expliquer par une plus grande dispersion des bactéries et par le fait que le pH est relativement homogène dans les coussins, menant à une homogénéité des communautés (Chapitre I). L'effet plus important de l'altitude sur silice sur les bactéries pourrait s'expliquer par la contrainte abiotique plus forte dans ce milieu, dans lequel les communautés seront d'autant plus sensibles à l'augmentation de l'altitude et aux variables associées. Comme pour les bactéries, l'effet de l'altitude sur les communautés fongiques est fort sur silice hors coussin, mais cet effet est tamponné à l'intérieur des coussins de *exscapa*. Cela est en accord avec un effet ingénieur plus fort de cette sous-espèce par rapport à *longiscapa*. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'effet des coussins sur la structure des communautés fongiques lorsque la contrainte augmente (voir Chapitre I). L'effet positif des coussins sur les champignons est testé et présenté dans la deuxième partie du présent chapitre.

En dépit de patrons altitudinaux de diversité microbienne significatifs, il est important de noter que l'effet de l'altitude est mineur comparé à l'effet de la sous-espèce végétale à l'intérieur des coussins ou de la roche mère à l'extérieur (voir Chapitres I et II). Cette conclusion est appuyée par les études de Davey et collègues dans lesquelles les communautés fongiques associées à des mousses distribuées le long de gradients d'altitude sont principalement structurées par l'identité de l'hôte et par le type de tissus, sénescents ou photosynthétiques (Davey *et al.* 2013a; Davey *et al.* 2013b).

Partie II. Effet positif des coussins sur la persistance des microorganismes le long de gradients d'altitude

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte général

Les gradients d'altitude sont une bonne approche pour tester l'effet positif des coussins sur les communautés microbiennes et approfondir le concept d'effet ingénieur des coussins. Plusieurs études ont montré que les interactions positives entre les plantes en coussin et les autres plantes augmentaient avec le stress abiotique (Anthelme *et al.* 2012; Antonsson *et al.* 2009; Cavieres *et al.* 2006; Molenda *et al.* 2012; Yang *et al.* 2010), et que, pour certaines espèces, les différences d'abondance ou d'occurrence entre l'habitat coussin et l'habitat extérieur augmentaient avec l'altitude, toujours positivement associées aux coussins dans la partie la plus stressante du gradient (Anthelme *et al.* 2012; Arroyo *et al.* 2003). Ces études supportent la « Stress Gradient Hypothesis (SGH) » qui prédit une augmentation des interactions positives avec le stress abiotique (Bertness & Callaway 1994).

Tester si les coussins ont un effet positif sur les champignons le long des gradients de stress permet de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans l'effet des plantes sur l'assemblage des communautés de champignons. La mise en évidence d'un tel effet et l'identification des champignons positivement affectés pourrait apporter des informations quant à l'influence des champignons sur les interactions plantes-plantes si les coussins de haute altitude hébergent des espèces ou clades de champignons auxquels les plantes sont associées à plus basse altitude. Enfin tester l'existence d'un tel effet permet de généraliser les patrons de diversité et l'effet des plantes en coussins à différents niveaux trophiques.

Les champignons sont plus sensibles que les bactéries à l'altitude. La question est de savoir si les MOTUs composant les communautés dans les coussins de haute altitude s'affranchissent des effets délétères de l'altitude subis à l'extérieur à la manière de ce qui est observé pour les plantes, menant à une augmentation de l'effet positif avec l'altitude. Théoriquement, un effet positif des coussins sur les communautés microbiennes se manifesterait par une augmentation de l'aire de distribution de certaines espèces le long d'un gradient d'altitude ou une meilleure croissance sous les coussins, particulièrement à haute altitude. En pratique, cet effet se manifesterait par le maintien (voire

l'augmentation) de l'abondance de certains champignons dans les coussins à haute altitude alors qu'ils disparaîtraient à l'extérieur.

2. Objectifs et démarche de l'étude

Un patron simple caractérisant l'effet positif des coussins sur les microbes vis à vis de l'altitude serait par exemple une diminution plus forte de l'abondance ou de la probabilité d'occurrence d'une espèce microbienne avec l'augmentation d'altitude en dehors des coussins que sous eux (voir la Figure 1 de l'Article III pour l'ensemble des patrons caractérisant l'effet positif des coussins sur les microbes vis à vis de l'altitude). Cela se caractérise statistiquement par une interaction positive sur la performance des champignons entre le fait d'être sous coussin et l'altitude. Nous avons donc adopté une approche de modélisation de la distribution d'espèces basée sur l'abondance (ou la probabilité d'occurrence) des champignons à partir de données de séquençage d'amplicons. Le nombre de séquences d'un champignon relatif au total du nombre de séquences dans l'échantillon est un proxy de la performance de ce champignon dans la communauté. L'analyse est faite à l'échelle des MOTUs et de l'ordre.

II. Contribution

Article III.

Testing the positive effect of cushion plants on fungi along elevation.

Julien Roy, Sébastien Lavergne, Roberto Geremia

In preparation

TITLE

Testing the positive effect of cushion plants on fungi along elevation

RUNNING TITLE

Positive effect of cushions on fungi

AUTHORS

Julien Roy, Sébastien Lavergne, Roberto Geremia

ABSTRACT

Alpine cushion plants are typical ecosystem engineers that modify the abiotic characteristics from the adjacent bare matrix. They exert nurse effect on neighbouring plants and arthropods, extending the distribution area of individual species and enhancing the diversity of plants and arthropods in stressful alpine ecosystem. Cushion plants also impact soil microbes. However, the positive effect of cushions on fungi remains to be characterized. We tested whether cushions could have positive effect on fungal communities along elevation. From sequencing of ITS1 amplicons, we used species distribution modelling based on read abundance to test whether there are fungal species (OTUs) for which the deleterious effect of elevation in the outside open area is minored or even inversed within the cushions habitat. We did not find any significant positive interaction of cushions on elevation effect, although trends emerged. Our results indicate that there is no increase of positive effect of cushion on fungal community assembly along elevation.

KEY WORDS

Ecosystem engineering; nurse effect; facilitation; foundation species; fungi; community assembly; elevation gradient; next generation sequencing; ITS1

INTRODUCTION

Alpine cushion plants are typical ecosystem engineers that modify the abiotic characteristics from the adjacent bare matrix. They buffer variation of temperature and increase nutrients and water availability (Anthelme *et al.* 2012; Cavieres *et al.* 2007; Roy *et al.* 2013). In consequence, cushion plants exert nurse effect on neighbouring plants and arthropods (Anthelme *et al.* 2012; Arroyo *et al.* 2003; Cavieres *et al.* 2007; Molenda *et al.* 2012; Molina-Montenegro *et al.* 2006), extending the distribution area of individual species and enhancing the diversity of plants and arthropods in stressful alpine ecosystem (Badano & Cavieres 2006b; Molenda *et al.* 2012). Whether cushions could have a positive effect on Fungi remains to be tested and characterized. A positive effect of cushions on fungi should imply a better growth and/or a probability of occurrence higher within than outside cushion especially in stressful habitat, for fungi usually found in the outside and associated with others plants.

Plant-microbes interactions differ fundamentally from plant-plant interactions. Microbes feed on plants, indirectly in the case of saprotrophes and directly in the case of obligatory biotrophs, mutualists and parasitic organisms. Moreover, fungal diversity is usually extremely high. This could have profound consequences on the effect of cushion plants on fungal community assembly compared to plant community assembly. Association between cushion plants and soil microbes, including bacteria and fungi, are very scarce in the literature. Our previous work reported change in community composition between cushions of *Silene acaulis* and outside open areas (Roy *et al.* 2013). Several fungi were preferentially found within cushions, especially putative biotrophs (Roy *et al.* in prep). Additionally, (Casanova-Katny *et al.* 2011) reported a higher rate of AM mycorrhization for plants growing within than outside cushions of *Azorella madreporica* in the Andean alpine as well as higher number of AM spores within cushions. However, the positive effect of cushions plant on microbial community structure was not explicitly tested. That is, do AM fungi in cushions are the same found in the outside but are promoted within cushions? Or, do the microbial species within cushions are protected from elevation? This could have important implication in basic ecology to compare diversity patterns of plants and microbes. Further this could have also important implication in the nurse effect of cushions on neighbour plants by providing a microbial cortege usually associated to alpine plants in lower elevation.

We tested whether positive effect of cushions could structure fungal communities along elevation. The test was based on the question: are there fungi for which the deleterious effect of elevation in the outside open area is minored or even inversed within cushions habitat? From sequencing of ITS1 amplicons data set, we used species distribution modelling based on read abundance to test whether the abundance of some fungi in communities is maintained at higher level within than outside cushion of *S. acaulis* along elevational gradient.

MATERIEL AND METHODS

Plant species model

S. acaulis is a common alpine cushion-forming plant dominant in alpine fellfields and rocky cliff in the French Alps. Our previous work revealed three genetic groups. Two genotypes correspond to a loose morphotype occurring on calcareous bedrock. This plant group is named *longiscapa* hereafter. The third genotype corresponds to a dense morphotype occurring on both calcareous and siliceous bedrocks. This plant group is named *exscapa* hereafter.

Data

All data come from Roy et al (2013, 2014). Briefly, we sampled three soil cores within and outside cushions, in population of five randomly chosen cushions along three replicated elevation gradients composed of three elevational points, both in a calcareous and siliceous mountains.

Statistics

Our aim was to find positive interaction of cushions on the abundance of fungal taxa (or MOTUs) along elevation. Figure 1 depicts the different case where we could statistically found a positive interaction of cushions. We performed regression on count data (number of reads) along elevation using generalized linear model in R to model abundance data. Deviance was much higher than degrees of freedom for most orders and OTUs (not shown) indicating overdispersion in data. We thus set family="quasipoisson" as the link function. Quasipoisson family allows to model overdispersed data. The model was $\text{no. reads} \sim \text{loc} * \text{alt}$. Loc is a fixed factor with two

levels (in and out) that corresponds to the cushion effect and alt is a fixed continuous variable that corresponds to the elevation of each sample. We assumed positive effect of cushions on fungal taxa along elevation when i) taxon response to elevation was significantly different within and outside cushion habitat and ii) a less influent, even a positive influence of elevation on taxon counts within cushions compared to outside (Figure. 1). “Out” was the reference level of the “loc” factor. Thus a positive value for the estimate of loc:alt interaction will indicate positive effect of cushion on fungi along elevation.

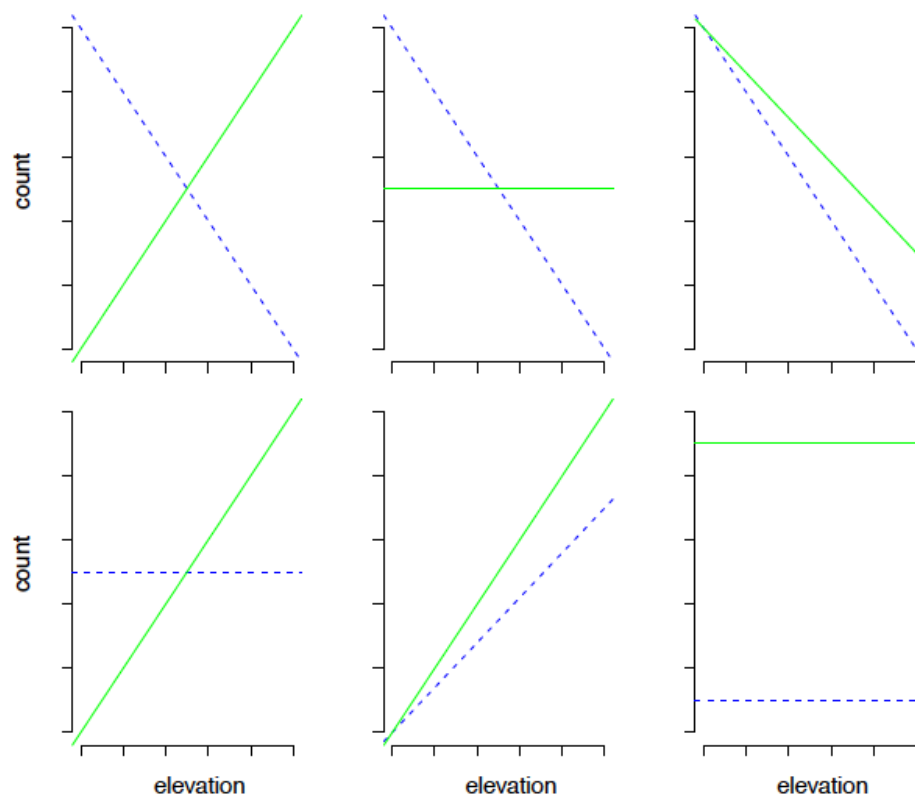


Figure 1 : Theoretical expectation to consider positive effect of cushion on fungi along elevation. Blue line : outside cushions ; green line : within cushions. Positive interaction can be found when i) abundance decreases along elevation more strongly outside than within cushions, ii) abundance increases along elevation more strongly within than outside cushions or iii) when abundance decreases along elevation outside cushions but increases within cushions. Intermediate case could be found when slope is null. Last panel pattern was not analysed in the study. Please refer to Roy et al. 2014 for consideration of such a pattern.

Several pitfalls are inherent of metabarcoding approaches. Mainly, PCR amplification can be biased towards some fungal groups or may introduce error during DNA replication, leading to inaccurate estimation of abundance of fungi in communities. However, we previously showed that abundance contain ecological information and we consider inter taxa comparison is deemed valid in beta diversity analysis (Roy et al. in

prep), despite proportion might not be conserved (Amend *et al.* 2010). Amend *et al.* (2010) however showed that intra taxa comparison are deemed valid. In consequence, we used resampled reads count as a proxy of abundance of MOTUs or orders in communities to test the effect of cushions on distribution of fungi along elevation. This taxa-based modelling approach was validated in several fungal metabarcoding studies (Cordier *et al.* 2012b; Davey *et al.* 2013a). Regressions were performed on the rarefied (to 950 reads) site-OTUs matrix. P-values were corrected for multiple testing by computing the False Discovery Rate (Benjamini & Hochberg 2000). Regressions for each OTU were performed for 100 rarefaction runs to avoid random sampling process generating the patterns. Positive effect on OTU was considered when for > 95% of the rarefaction runs the OTU met the criteria of a positive effect by cushion aforementioned. A relative abundance higher than 1/950 within cushions and an occurrence in at least 5 cushions was required for an OTU to be considered in the analysis per rarefaction run. Because we found no stochastic effect of rarefaction, order-based modelling was performed for one rarefied order-site matrix. Only the 20 most abundant orders were considered.

RESULTS

In our previous work, we revealed that fungal communities within cushions were mainly structured by plant morphotype and that fungal communities in the outside were structured by bedrock (Roy *et al.* 2013; Roy *et al. in prep*). Poisson regressions were hence divided by plant morphotype and bedrock combination. We found tendency of a positive effect of cushion plant on the response to elevation at both the OTUs (Figure 2) and order (Figure 3) level. However, we did not find any of the OTUs or orders showing a significant pattern of positive effect of cushions (all p-values > 0.05). Observed counts and predictions are shown in the supplementary Figure S1 and S2 for several example OTUs and orders respectively that were significant (after FDR multiple testing correction) without correcting for overdispersion in data. All these OTUs were abundant in cushions (Figure S3). OTUs on which cushions had positive effect along elevation are listed in Table S1.

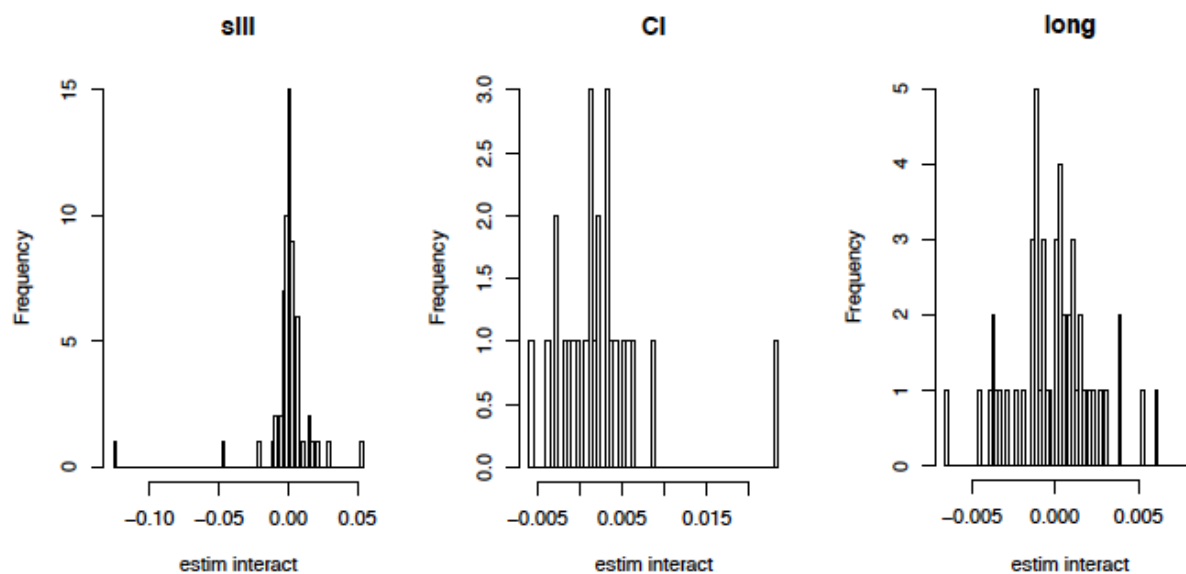


Figure 2. Distribution of the estimate of the interaction term loc:alt at the OTU level. Values used are the mean of the estimate over 100 runs of resampling. Positive values indicate positive effect of cushion on OTU's abundance along elevation.

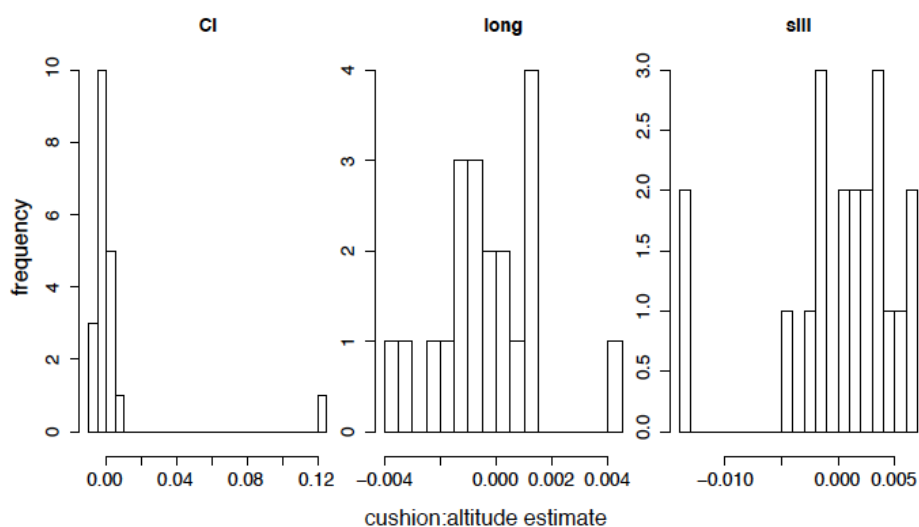


Figure 3. Distribution of the estimate of the interaction term loc:alt at the order level. Positive values indicate positive effect of cushion on order's abundance along elevation.

DISCUSSION

Positive interactions, i.e. facilitation, between plants is increasingly recognised as an important process structuring communities in stressful environments (Callaway *et al.* 2002; Choler *et al.* 2001). Cushion plants exert strong nursing effect on neighbouring plants and arthropods in the alpine (Badano *et al.* 2006; Molenda *et al.* 2012) and are thus major factor

structuring these communities (Cavieres & Badano 2009). Cushions plants are also a major factor structuring bacterial and fungal communities in the French Alps' alpine cliffs above 2000 m a.s.l. (Roy *et al.* 2013). Different processes may explain the positive effect of cushions on microbial communities that may fundamentally differ from the effect of cushions on neighbour plants. First, cushions could recruit a set of biotrophic fungi in close interaction with plant, that are not found in the outside. In that case niche-based process would structure microbial communities within cushions along elevation with the recruitment of adapted species to plant habitat and elevation of plant establishment. Second, cushions could also lodge microbial species by providing a suitable habitat that buffers the effect of elevation from its many deleterious effects but that can grow on the outside when conditions are less stringent. In that case, we interpret the community structure within cushions as the result of positive effect on un-adapted sensitive or opportunist fungi, for example by providing organic matter in low content in the outside. For both cases, we would expect that the negative effect of elevation would be minored or inversed within cushions. Statistically, positive interaction between cushion and elevation on fungal taxa abundance is the expected pattern.

Positive effect of cushions on fungi should imply a larger growth rate and/or a higher probability of establishment within than outside cushion, especially in stressful habitat. We used reads counts data as a proxy of abundance in the community (Amend *et al.* 2010) and provide the first explicit test and characterization of a positive effect by plant on the structure of fungal communities along environmental gradients, using molecular data and species distribution modelling. We did not find any significant positive interaction of cushions on elevation effect at both the OTU and order level. This is contrary to what was observed for plants. For example, several studies showed that for a given species, difference in abundance or occurrence between cushion and open areas increases with elevation, always positively associated with cushions at the end/at the most stressful part of the gradient (Anthelme *et al.* 2012; Arroyo *et al.* 2003). This effect was species-specific, as expected for fungi.

Despite no OTUs/orders showed significant positive statistical interaction of cushion on elevation effect, trends emerged. Multiples positives interactions were observed. All OTUs showing positive effect of cushion on elevation were abundant OTUs in cushions.

There was a subspecies effect on OTUs positively affected, but positive effect by both subspecies and on both bedrocks held true for many similar OTUs/orders. For example, within the calcareous massif, both *exscapa* and *longiscapa* had positive effect on OTU6 (Hypocreales), the most abundant OTU in the study. *Exscapa* on siliceous bedrock and *longiscapa* on calcareous bedrock also protected several similar OTUs (motu4, 15, 10, 28,

75). Positive effect was rather consistent within subspecies among bedrocks. Cushions of the *S. exscapa* subspecies established on siliceous and on calcareous bedrocks exhibited positive effect on several identical OTUs. Further, most of the OTUs protected against the deleterious effect of elevation or favoured are protected by the *exscapa* subspecies in accordance with its strong engineer capabilities (Roy *et al.* 2013). Similar trends were observed at the order level. Orders protected were abundant in cushions. Several similar orders benefit from cushions disregarding cushion' subspecies or bedrocks.

Interestingly, cushions had positive effect on many fungi that could be saprotrophs (e.g. Mortierella, Lasiosphaeriaceae, Nectriaceae) suggesting these fungi are un-adapted fungi that benefit from the presence of cushions that provide organic matter not found in the outside in high elevation sites. Other fungi appeared to be obligatory biotroph by definition positively affected by plant, (e.g. Capnodiales, Helotiales). Their increase in relative abundance might be the result of the compositionality effect where the decrease of one species leads to the increase in proportion of the others. Also, their infective capacity might increase as plant is exposed to more stressful abiotic conditions in high elevation. Finally, *longiscapa* subspecies positively affected Sebaciniales, known to have high mycorrhizal potential (Weiss *et al.* 2004). *S. acaulis* is not mycorrhizal (Treu *et al.* 1996). These fungi are thus not in direct interaction with the cushions and are likely to be protected from the deleterious effect of elevation by cushions through nutrient supply or selected by plants growing inside cushions. Given their putative mutualism with plants, this could have major importance in the facilitative capacity of these cushions on other plants, especially at high elevation.

Based on trends, cushions had positive effect on many fungi along elevation. Plants within cushion might thus benefit from the presence of fungi to which they usually associate at lower elevation that are not found in the outside at high elevation. That was the case in *Dryas octopetala* and *Salix reticulata* established in alpine cliff recruiting ectomycorrhizal fungi that could be source of inoculums for pioneer trees shifting in elevation due to climate change (Ryberg *et al.* 2009). But no statistical evidence was found. In our previous work, we showed that several fungi were significantly preferentially found within cushions than in the outside, disregarding elevation (Roy *et al.* in prep). Because we did not have knowledge whether those fungi (OTUs defined at the 98% level) are also present in alpine meadow below our rocky cliff study sites, we are unable to conclude whether cushions extend the distribution area of fungi or favoured/maintained maladapted fungi usually associated to alpine plants in alpine meadow towards high elevation. Partial response is raised with the Basidiomycota in our previous work (Roy *et al.* in prep). Their abundance increased within

cushions mirroring their high abundance in more developed alpine soils below our study area (Zinger *et al.* 2009b) and in alpine and arctic soils in general (Blaalid *et al.* 2012; Botnen *et al.* 2014) suggesting cushion increase the distribution area of these fungi. Extending elevational gradients might be of essential information.

Our results suggest a positive effect of cushions on fungi increasing with elevation. This effect held for both fungi involved in close interactions with plants (biotrophs) but also for fungi with looser interactions (saprotrophs). Cushions effect on fungal assembly along elevation might rely both on the selection of the best-adapted species but also by hosting species through nurse effect. Further analyses are needed to establish whether cushions could extend the distribution area of fungi along elevation by extending elevation gradient including alpine meadow. Our results have substantial implication in understanding plant-microbes interactions and microbial community assembly, especially along elevation gradient that are of crucial importance in the light of the ongoing climate change and plant upward shift.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful of Florent Mazel and Damien Georges for their help in modelling purpose and comment on the manuscript.

REFERENCES

- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**, 5555-5565.
- Anthelme F, Buendia B, Mazoyer C, Dangles O (2012) Unexpected mechanisms sustain the stress gradient hypothesis in a tropical alpine environment. *Journal of Vegetation Science* **23**, 62-72.
- Arroyo MTK, Cavieres LA, Penaloza A, Arroyo-Kalin MA (2003) Positive associations between the cushion plant *Azorella monantha* (Apiaceae) and alpine plant species in the Chilean Patagonian Andes. *Plant Ecology* **169**, 121-129.
- Badano EI, Cavieres LA (2006) Impacts of ecosystem engineers on community attributes: effects of cushion plants at different elevations of the Chilean Andes. *Diversity and Distributions* **12**, 388-396.
- Badano EI, Jones CG, Cavieres LA, Wright JP (2006) Assessing impacts of ecosystem engineers on community organization: a general approach illustrated by effects of a high-Andean cushion plant. *Oikos* **115**, 369-385.
- Benjamini Y, Hochberg Y (2000) On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **25**, 60-83.
- Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, *et al.* (2012) Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* **21**, 1897-1908.

- Botnen S, Vik U, Carlsen T, *et al.* (2014) Low host specificity of root-associated fungi at an Arctic site. *Molecular Ecology* **23**, 975-985.
- Callaway RM, Brooker RW, Choler P, *et al.* (2002) Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* **417**, 844-848.
- Casanova-Katny MA, Torres-Mellado GA, Palfner G, Cavieres LA (2011) The best for the guest: high Andean nurse cushions of *Azorella madreporica* enhance arbuscular mycorrhizal status in associated plant species. *Mycorrhiza* **21**, 613-622.
- Cavieres LA, Badano EI (2009) Do facilitative interactions increase species richness at the entire community level? *Journal of Ecology* **97**, 1181-1191.
- Cavieres LA, Badano EI, Sierra-Almeida A, Molina-Montenegro MA (2007) Microclimatic modifications of cushion plants and their consequences for seedling survival of native and non-native herbaceous species in the high andes of central Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **39**, 229-236.
- Choler P, Michalet R, Callaway RM (2001) Facilitation and competition on gradients in alpine plant communities. *Ecology* **82**, 3295-3308.
- Molenda O, Reid A, Lortie CJ (2012) The Alpine Cushion Plant *Silene acaulis* as Foundation Species: A Bug's-Eye View to Facilitation and Microclimate. *Plos One* **7**.
- Molina-Montenegro MA, Badano EI, Cavieres LA (2006) Cushion plants as microclimatic shelters for two ladybird beetles species in alpine zone of central Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **38**, 224-227.
- Roy J, Albert CH, Choler P, *et al.* (2013) Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Zinger L, Shahnava B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009) Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *Isme Journal* **3**, 850-859.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

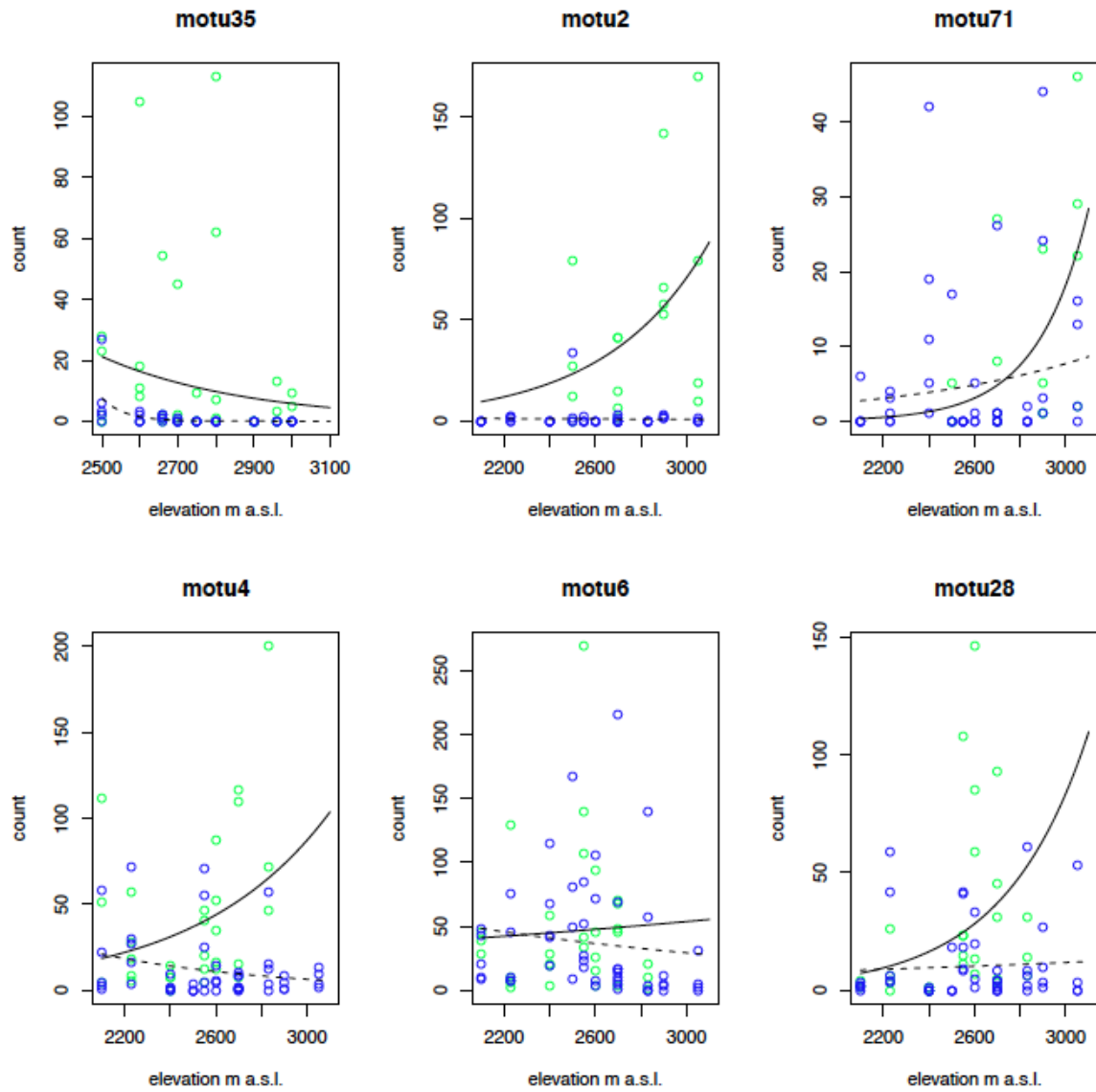


Figure S1. Observed (dots) and predicted (lines) abundance of OTUs within (green) and outside (blue) cushions along elevation. The six OTUs are example OTUs from the OTUs that were significant without taking into account overdispersion in the data.

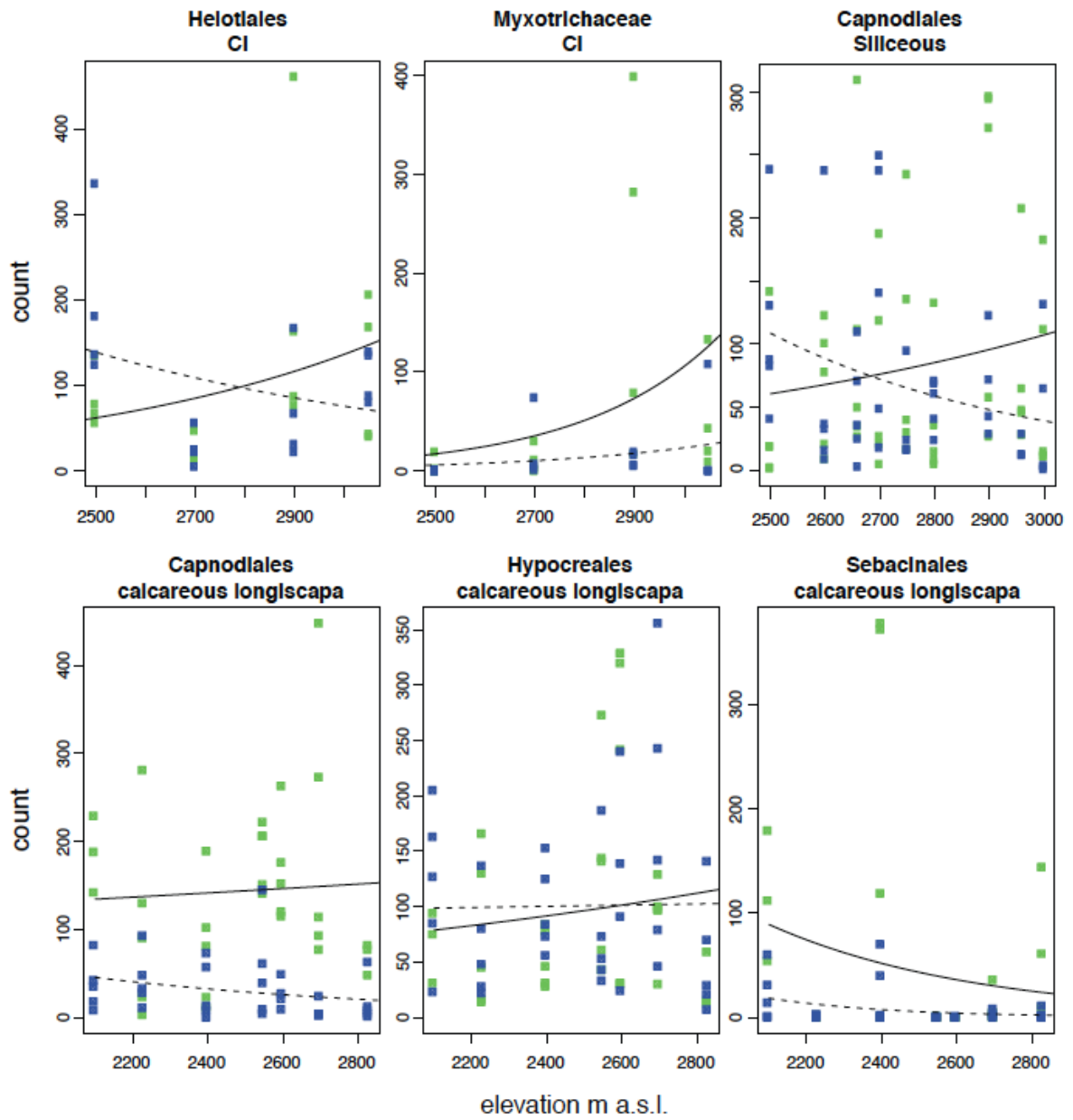


Figure S2. Observed (dots) and predicted (lines) abundance of orders within (green) and outside (blue) cushions along elevation.

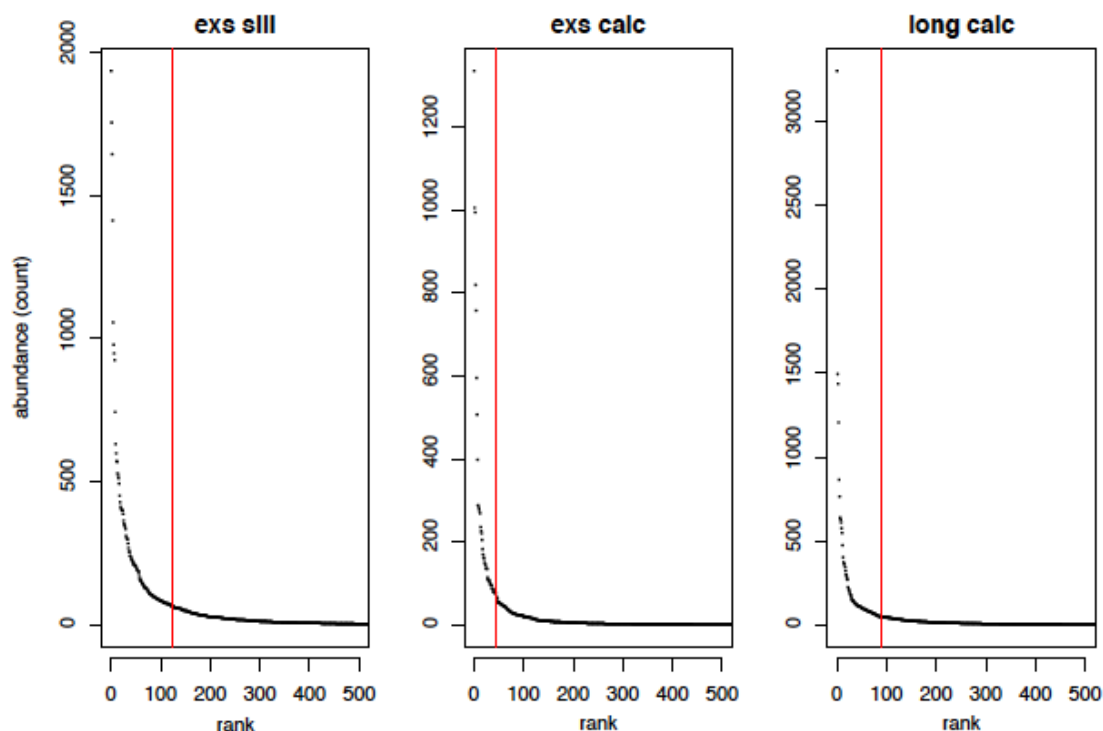


Figure S3. Rank-abundance curve for the three cushions groups defined. Vertical lines indicate the rank of the less abundant OTUs that was significantly positively affected by cushions (without taking into account overdispersion in the data).

Table S1. OTUs positively affected by cushions along elevation.

cushions group	kingdom_name	phylum_name	class_name	order_name	family_name	genus_name	species_name	scientific_name
motu4	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu15	exscapa siliceous	Fungi	Pseudeurotiaceae	Ascomycota_un	Pseudeurotiaceae	Pseudeurotiaceae	Pseudeurotium bakeri	Pseudeurotium bakeri
motu3	exscapa siliceous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Pezizomycotina
motu10	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu5	exscapa siliceous	Fungi	Leotiomyces	Myxotrichaceae	Myxotrichaceae	Geomyces	Geomyces_un	Geomyces
motu39	exscapa siliceous	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	Papillotrema	Papillotrema bandonii
exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu28	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu22	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu52	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes_un	Sordariomycetes_un	Sordariomycetes_un	Sordariomycetes_un	Sordariomycetes
motu43	exscapa siliceous	Fungi	Mortierellales	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	Mortierella	Mortierella
motu35	exscapa siliceous	Fungi	Mortierellales	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	Mortierella alpine	Mortierella alpine
motu58	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Capnodiales_un	Capnodiales_un	Capnodiales
motu75	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Teratosphaeriaceae_un	mitosporic Teratosphaeriaceae
motu95	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu102	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Magnaporthales	Magnaporthaceae	Gaeumannomyces	Gaeumannomyces cylindrosporus
motu177	exscapa siliceous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Dikarya
motu189	exscapa siliceous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Dikarya
motu206	exscapa siliceous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Nectriaceae_un	Nectriaceae
motu6	exscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_un	Hypocreales_un	Hypocreales
motu9	exscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Nectriaceae_un	Nectriaceae
motu2	exscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Leotiomyces	Helotiales	Dermateaceae	Oculimacula	Oculimacula yallundae
motu3	exscapa calcareous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Pezizomycotina
motu22	exscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu26	exscapa calcareous	Fungi	Mortierellales	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	Mortierella_un	Mortierella
motu19	exscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu25	exscapa calcareous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Sordariomycetes
motu71	exscapa calcareous	Fungi	Mortierellales	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	Mortierella_un	Mortierella
motu114	exscapa calcareous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Sordariomycetes
motu4	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu10	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu28	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	Ascomycota_un	leotiomyces
motu25	longiscapa calcareous	_un	_un	_un	_un	_un	_un	Sordariomycetes
motu36	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Teratosphaeriaceae_un	mitosporic Teratosphaeriaceae
motu124	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	Cercophora	Cercophora sp TMS_2011
motu170	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Teratosphaeriaceae	Teratosphaeriaceae_un	mitosporic Teratosphaeriaceae
motu199	longiscapa calcareous	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Dothideomycetes_un	Dothideomycetes_un	Dothideomycetes_un	Dothideomycetes

III. Discussion

1. Raisons probables d'un effet non significatif

Statistiquement parlant, nous n'avons pas trouvé d'interactions positives significatives des coussins sur la réponse des champignons à l'altitude. Ce résultat négatif est somme toute surprenant étant donné l'observation d'une diminution de la richesse en MOTUs et d'un changement de composition avec l'augmentation de l'altitude.

Plusieurs raisons peuvent expliquer le fait les tendances observées ne soient pas significatives. Peut être que l'hétérogénéité entre coussins d'une même altitude est grande, obscurcissant les différences d'abondance entre l'intérieur et l'extérieur le long du gradient d'altitude. Nous avons montré que la composition des communautés sous coussins, ainsi que l'abondance et la présence de certains MOTUs étaient fortement influencées par le phénotype des coussins de *S. acaulis*. La variation d'abondance des MOTUs parmi les coussins appartenant à un même taxon est probablement stochastique avec une forte composante spatiale. Multiplier les échantillons permettrait peut être de trouver des tendances significatives. Un autre point important est la possibilité d'une dispersion des champignons des coussins vers l'extérieur ce qui empêcherait de trouver une réponse à l'altitude différentes selon l'habitat.

L'étude de Cordier et collègues (2012) par exemple rapportait des tendances significatives de certains MOTUs fongiques vis à vis de l'altitude. A l'inverse de notre étude, leur étude montre une forte homogénéité intra site, dans un environnement continu où les effets de limitation de dispersion sont probablement beaucoup moins importants que dans un système en île comme les coussins distants et isolés les uns des autres à la fois au niveau de la population mais également (et surtout) entre populations d'altitude similaire. Nos gradients d'altitude sont relativement courts, de l'ordre de 500 mètres en moyenne, comparés aux gradients plus importants des autres études (≥ 1000 m, Cordier *et al.* 2012, Davey *et al.* 2013a, Fierer *et al.* 2011). Il y a probablement une plus grande variabilité environnementale liée à l'altitude le long de tels gradients, alors que la contrainte est relativement importante et homogène dans l'étage alpin/subnival de notre étude. Il est beaucoup plus probable également qu'il y ait une forte hétérogénéité spatiale à une même altitude par des effets de microtopographies, dans des falaises de surcroît vierges de passage ou d'activité humaine.

Enfin des biais méthodologiques peuvent être à l'origine de la variabilité du nombre de séquences observées et de la difficulté de relier l'abondance de MOTUs ou de clades fongiques à l'altitude. Du fait des biais de PCR, le nombre de lectures d'une séquence ADN n'est pas un proxy direct de l'abondance de l'organisme. Des contaminations croisées entre puits d'une plaque 96 puits pour la PCR peuvent avoir lieu. Ayant utilisé des tags différents en 5' et 3' de nos fragments d'ADN, il est possible que des erreurs d'attribution de séquences à un échantillon aient eu lieu. Pour cela il est conseillé d'utiliser le même tag en 5' et 3'. Cela revient cependant beaucoup plus cher, car limitant le nombre de combinaisons possibles surtout dans le cas d'étude avec une grande quantité d'échantillons.

2. Tendances à une augmentation de l'effet positif des coussins avec l'altitude

Des tendances à une augmentation de l'effet positif des coussins avec l'altitude ont tout de même émergé, que ce soit à l'échelle des MOTUs ou à l'échelle de l'ordre. Ces tendances sont confortées par nos premiers résultats avec la SSCP montrant que la différence de composition entre les coussins et l'extérieur augmentait avec l'altitude. La distribution des valeurs de l'estimateur de l'interaction coussin:altitude montre plus d'interactions positives que négatives, surtout pour la sous-espèce *exscapa*, alors que pour *longiscapa* les valeurs sont balancées, particulièrement à l'échelle de l'ordre. Ces résultats appuient le fort pouvoir ingénieur d'*exscapa* (voir Chapitres I et II). Inversement, il y a des interactions négatives en accord avec l'exclusion de certains MOTUs des coussins suggérant la sélection des champignons les mieux adaptés.

La plupart des MOTUs pour lesquels les coussins ont un effet positif ne sont pas assignés. Concernant les champignons assignés, certains sont probablement des biotrophes (*Papiliotrema*, *Dermateaceae*, *Nectriaceae*, *Gaeumannomyces*). L'effet positif est caractérisé par un bénéfice direct de la présence des coussins. Cependant, plusieurs champignons pourraient être des saprotrophes (e.g. *Mortierella*, *Lasiochaeriales*, *Geomyces*), pour lesquels la présence des coussins serait positive par un apport de matière organique, absente des sols de roches quasiment nues de haute altitude. Il serait possible que les coussins aient donc un effet positif sur des champignons qui ne sont pas en relation étroite avec eux.

En conclusion, l'effet positif des coussins semble augmenter avec la contrainte environnementale. Cet effet est observé pour des champignons biotrophes mais également pour des saprotrophes, suggérant un effet protecteur vis à vis de l'altitude à la fois par une interaction directe des champignons avec la plante mais également de manière indirecte par apport de matière organique. Des résultats similaires ont été observés pour les bactéries mais ne sont pas détaillés dans le manuscrit de thèse (Figure III.II.1).

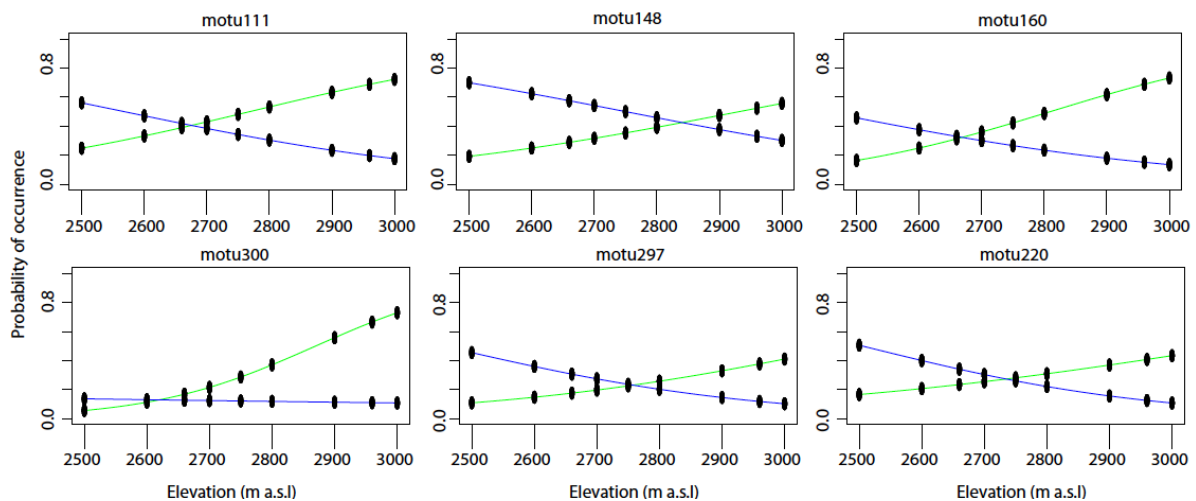


Figure III.II.1. Prédications (lignes et points) de la probabilité d'occurrence de six MOTUs bactériens le long d'un gradient d'altitude en fonction de l'habitat intérieur (vert) et extérieur (bleu) des coussins calculée par régression logistique. L'interaction coussin:altitude est significative. Ce ne sont que six MOTUs exemple.

3. Perspectives dans l'étude de la biodiversité le long de gradients d'altitude

Dans un premier temps, les analyses de cette nécessitent d'être affinées. Il serait possible de calculer une moyenne des counts par population pour chaque MOTU/ordre pour lisser les effets stochastiques à la fois écologiques (dispersion) et techniques (PCR). Il serait aussi possible de modéliser la probabilité de présence par régressions logistiques (résultats non présentés dans le manuscrit). Il serait intéressant également de voir la proportion de MOTUs positivement et négativement affectés par les coussins pour mieux comprendre les processus d'assemblages des communautés fongiques dans les coussins. Etant donné la diminution de richesse fongique (et bactérienne) avec l'altitude, il serait possible que les taxons associés aux coussins de haute altitude bénéficient tous de la présence du coussins. Il est donc particulièrement intéressant d'interpréter l'effet positif des coussins sur la base d'une analyse intégrant les patrons

de beta et alpha diversité. La comparaison avec les bactéries serait également intéressante.

Dans un second temps, il serait particulièrement intéressant d'étendre les gradients d'altitude en incluant les habitats subalpins (forêts, zone de combat de la forêt, prairies et landes), alpins (pelouse) et haut-alpin/subnival. Un tel gradient d'altitude permettrait de tester la présence de champignons dans les coussins (habitat haut-alpin/subnival) auxquels les plantes de plus basse altitude s'associent.

Enfin, il serait intéressant de revisiter les prédictions de la SGH pour les interactions plantes-microbes. L'hypothèse serait que les interactions plantes-biotrophes varient le long d'un continuum d'interactions allant du parasitisme par le champignon quand le stress abiotique est faible à une interaction mutualiste quand le stress augmente. Cette hypothèse peut être testée chez les Caryophyllaceae, plusieurs espèces se distribuant le long d'un gradient d'altitude incluant le *S. acaulis* en haute altitude.

L'altitude est un facteur mineur dans l'assemblage des communautés microbiennes quand les gradients d'altitudes sont inclus dans une aire d'étude comprenant différents habitats (plante vs. pas de plante), différentes espèces/sous-espèces végétales et différentes roche mères. Cet effet est de plus dépendant de l'habitat et du taxon considérés. La présence des plantes affecte la réponse des microorganismes à l'altitude. L'effet de la plante se caractérise par un effet tampon qui affecte positivement la persistance de champignons biotrophes et saprotrophes le long des gradients d'altitude.

Chapitre IV. Beta diversité microbienne : quid de la résolution phylogénétique et des méthodes pour l'appréhension des communautés ?

Partie I. Comparaison SSCP et séquençage

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte général

Les avancées techniques en biologie moléculaire permettent de caractériser rapidement la diversité microbienne d'un grand nombre d'échantillons, entraînant une motivation des microbiologistes à étudier la beta diversité microbienne. Nombre des études publiées au cours de la dernière décennie sont basées sur les techniques d'empreintes moléculaires et récemment sur le séquençage haut-débit. Il est alors primordial de savoir si les patrons de distribution observés sont conservés suivant la méthode utilisée, et si un gain d'information est apporté par le séquençage.

2. Objectifs et démarche de l'étude

Durant la thèse, les mêmes échantillons du projet Ecologie Verticale ont été analysés avec une méthode d'empreinte moléculaire, la CE-SSCP, et par séquençage massif Illumina. Pour les bactéries comme pour les champignons, les mêmes marqueurs ont été analysés avec les deux approches. Les mêmes amorces ont été utilisées pour les bactéries, ciblant la région V3-V4 de l'ARNr 16S. Pour les champignons, bien que l'ITS1 ait été suivi dans les deux approches, les amorces sont différentes (voir Articles I et II). Notre objectif est de tester la robustesse des patrons observés. Pour cela, les patrons de beta diversité appréhendés par l'une et l'autre des approches sont comparés. Les mêmes analyses multivariées du Chapitre I sont utilisées. Ces analyses sont complétées par des comparaisons directes de la beta diversité par des tests de Mantel.

II. Résultats

Les dissimilarités Bray-Curtis entre communautés sont plus élevées avec le séquençage (Figure IV.1). La corrélation des dissimilarités basées sur la SSCP et le séquençage est significative pour les bactéries (mantel test, $r=0.37$, $p<0.001$) et pour les champignons (mantel test, $r=0.42$, $p<0.001$). Pour les champignons, cette corrélation est plus forte pour le clustering à 98% (Figure IV.2).

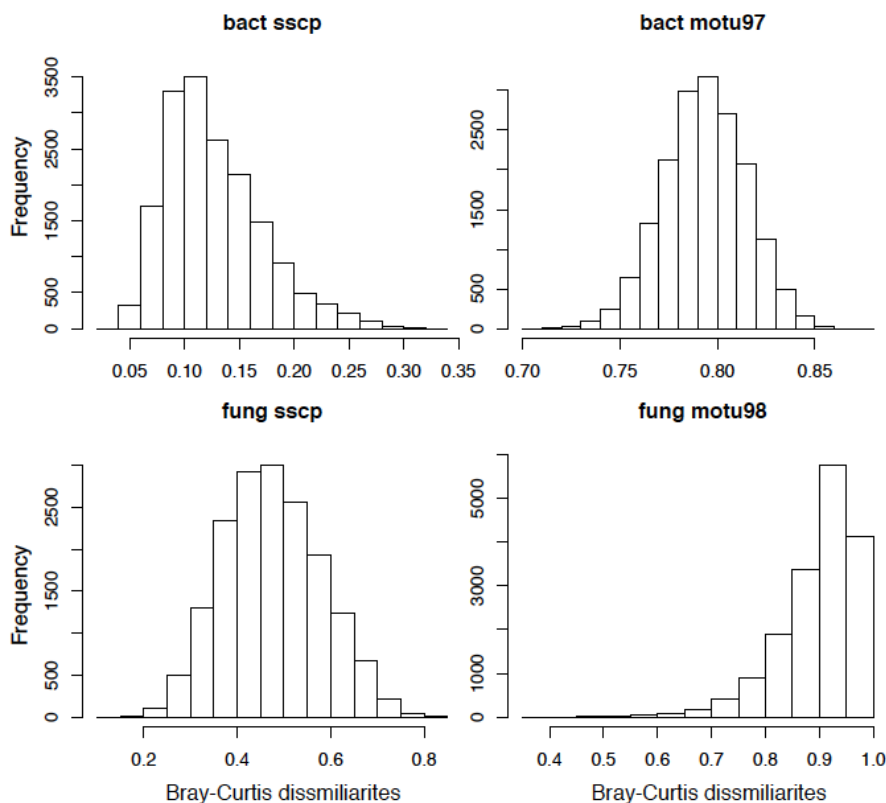


Figure IV.1. Distribution des dissimilarités Bray-Curtis entre communautés deux à deux caractérisées par SSCP et séquençage.

Pour les bactéries comme pour les champignons, la caractérisation de la diversité par séquençage entraîne un éclatement plus fort des communautés et un regroupement de ces communautés qui caractérise chaque habitat (Figure IV.3.). Cela est cohérent avec l'augmentation des dissimilarités entre échantillons et la représentation principalement des fortes dissimilarités sur la NMDS avec le séquençage (Figure IV.4.). Pour les bactéries, alors que nous observions une forte convergence de composition des communautés sous coussins, nous observons avec le séquençage une séparation entre les communautés

associées aux coussins sur calcaire et sur silice. Nous pouvons de plus observer un effet du phénotype des coussins sur la diversité bactérienne.

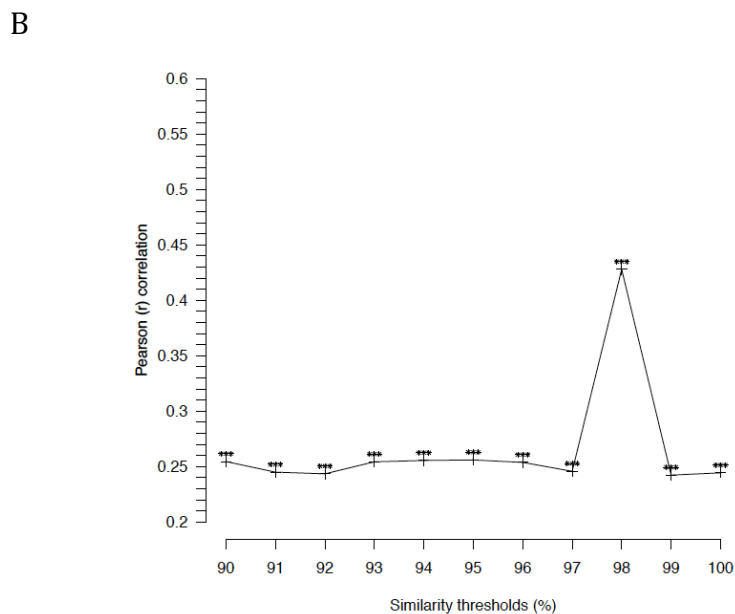
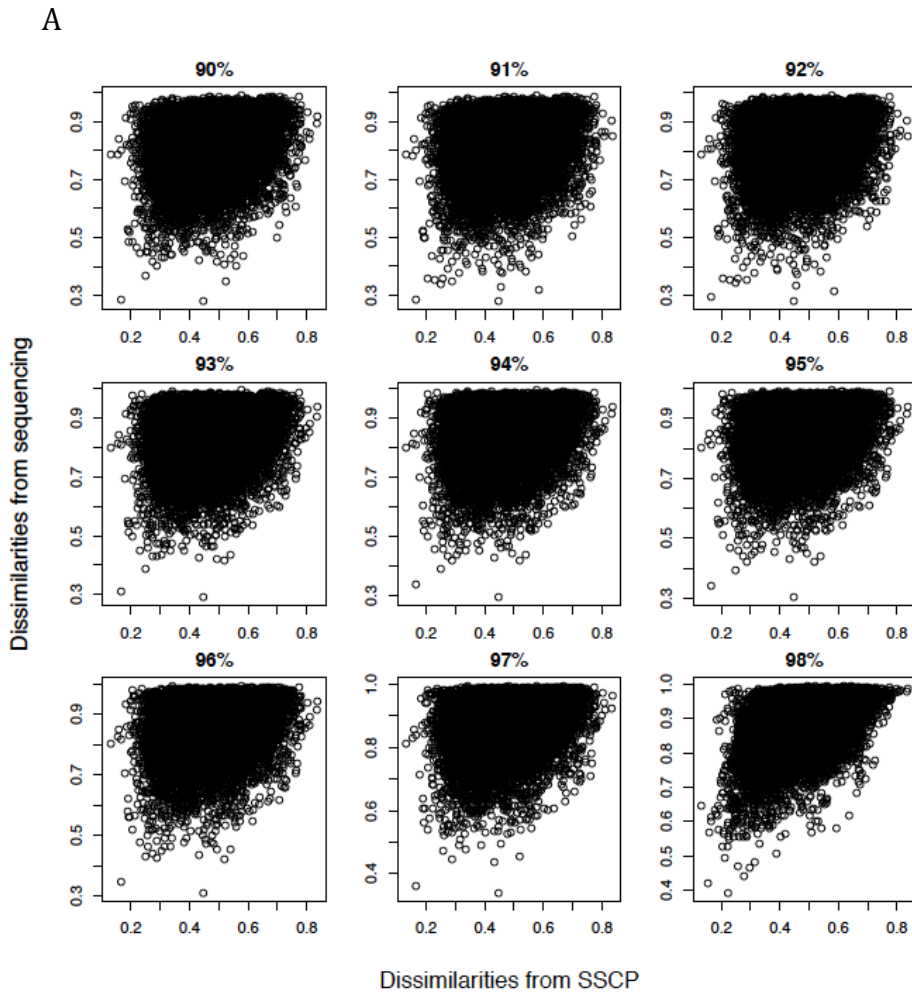


Figure IV.2. Corrélation entre les dissimilarités entre communautés fongiques caractérisées par SSCP et séquençage selon le seuil de clustering. (A) Représentation graphique. (B) Coefficient de corrélation selon le seuil de clustering.

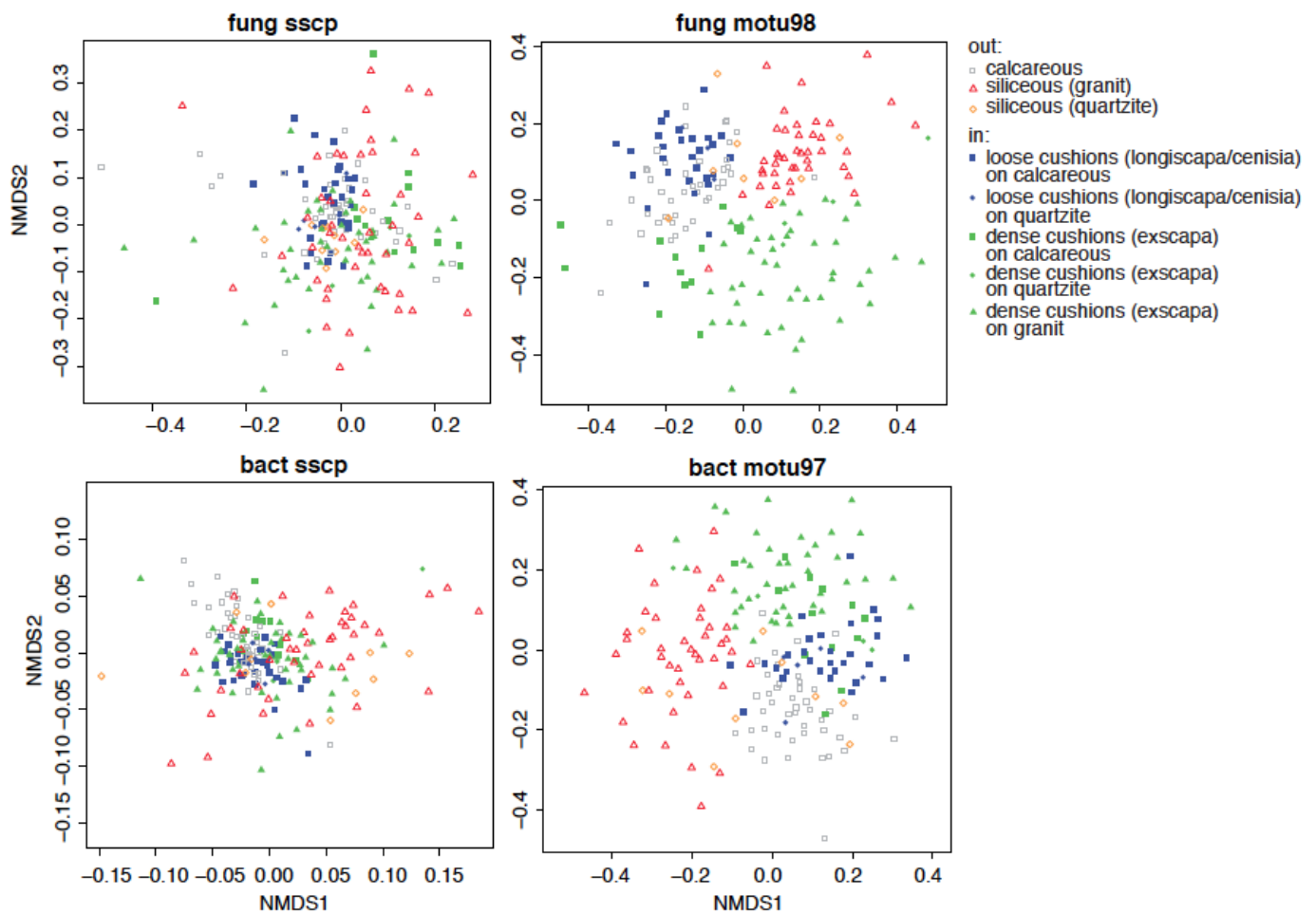


Figure IV.3. Représentation graphique par NMDS des dissimilarités Bray-Curtis entre communautés calculés à partir des profils SSCP et du séquençage, pour les bactéries et champignons. Le stress est de 0.15, 0.32, 0.24, 0.26 pour les NMDS SSCP bactéries, MOTUs97 bactéries, SSCP champignons, MOTUs98 champignons, respectivement.

La variance contenue dans la matrice de distance entre communautés deux à deux est beaucoup plus importante pour le jeu de données de séquençage, d'un facteur 30 pour les bactéries et d'un facteur 3 pour les champignons (Table IV. 1). Une plus grande part de variance est expliquée pour les données SSCP pour les bactéries, quels que soient les facteurs analysés. Pour les champignons les parts de variance expliquée dans chacun des jeux de données sont relativement identiques. Pour les communautés de bactéries et de champignons associées aux coussins, l'effet sous-espèces est plus fort que l'effet roche mère avec la SSCP. Cette différence d'effet diminue avec le séquençage, allant jusqu'à s'inverser faiblement pour les bactéries. Enfin, la distance médiane au centroïde d'un groupe environnemental *a priori*, proxy de la beta-diversité au sein de ce groupe, est plus grande avec le séquençage que la SSCP pour les bactéries et les champignons, en accord

avec la plus grande variance observée dans les jeux de données séquençage (Figure IV.5). Alors que nous observions avec la SSCP une diminution de la beta diversité bactérienne sous coussin comparée à l'extérieur (permutest, $p < 0.001$), il n'y a plus de différence significative avec le séquençage (permutest, $p > 0.05$). Pour les champignons, alors qu'il n'y avait pas de différence significative de beta-diversité entre l'habitat intérieur et extérieur aux coussins (permutest, $p > 0.05$), la beta diversité entre les coussins est significativement plus élevée qu'à l'extérieur avec le séquençage (permutest, $p < 0.001$).

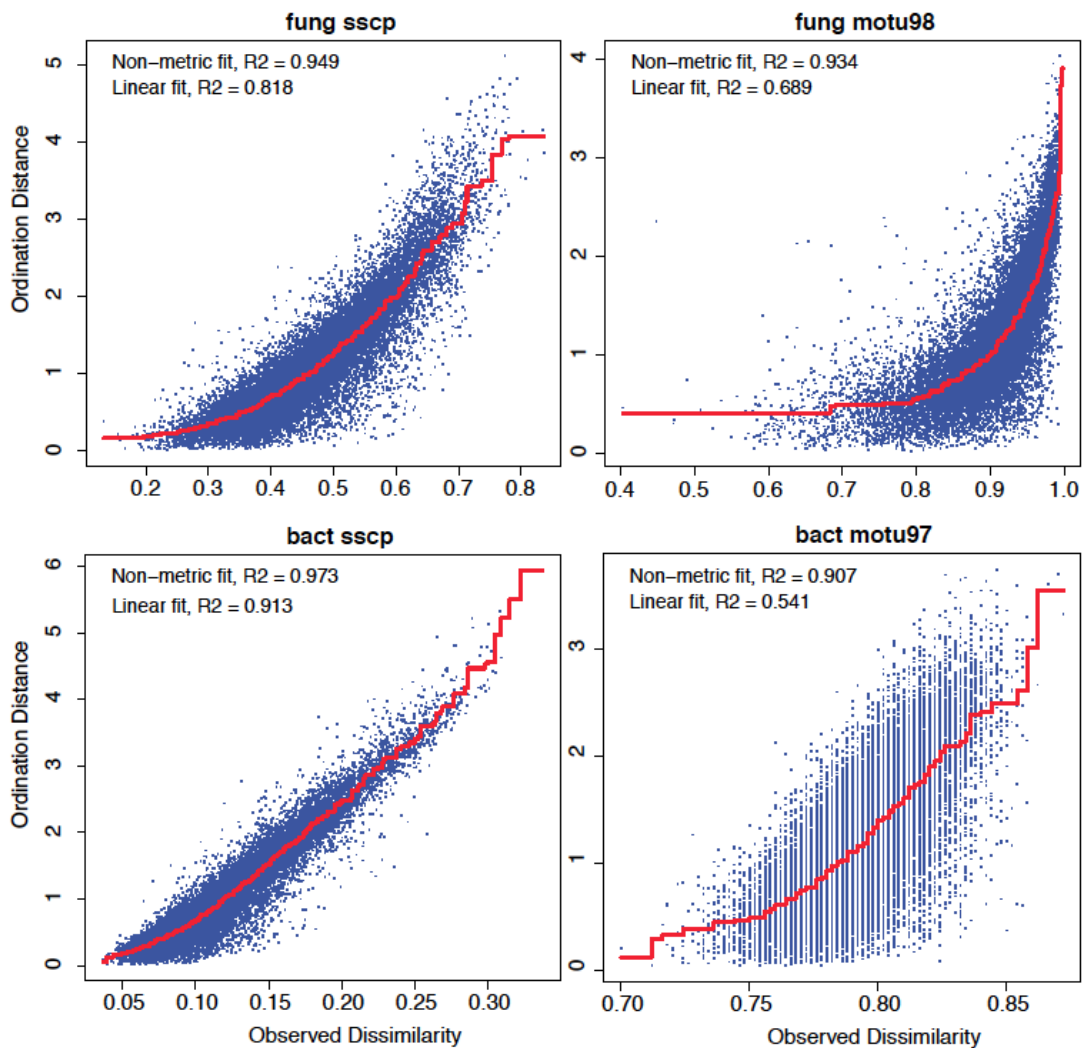


Figure IV.4. Shepard plot représentant la corrélation entre les dissimilarités observées (calculées) et les dissimilarités représentées sur la NMDS.

Table IV.1. Partition de la variance contenue dans les matrices de dissimilarités selon les jeux de données SSCP ou séquençage.

		Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Bact sscp	bedrock	1	0.11998	0.119982	14.1949	0.06515	0.001
	grad	2	0.06323	0.031615	3.7403	0.03433	0.001
	pop	3	0.06940	0.023135	2.7370	0.03769	0.001
	Residuals	188	1.58906	0.008452		0.86283	
	Total	194	1.84168	1.00000			
	loc	1	0.05144	0.051438	5.5454	0.02793	0.001
	Residuals	193	1.79024	0.009276		0.97207	
	Total	194	1.84168	1.00000			
	in taxon	1	0.03807	0.038065	6.0165	0.05854	0.001
	bedrock	1	0.01379	0.013791	2.1798	0.02121	0.030
Bact motu97	bedrock	1	0.953	0.95328	3.0661	0.01631	0.001
	grad	2	0.726	0.36279	1.1669	0.01242	0.001
	pop	3	1.111	0.37026	1.1909	0.01901	0.001
	Residuals	179	55.653	0.31091		0.95227	
	Total	185	58.442	1.00000			
	loc	1	0.744	0.74441	2.3739	0.01274	0.001
	Residuals	184	57.698	0.31357		0.98726	
	Total	185	58.442	1.00000			
	in taxon	1	0.3816	0.38161	1.2396	0.01347	0.001
	bedrock	1	0.3823	0.38226	1.2417	0.01349	0.001
Fung sscp	bedrock	1	0.5952	0.59523	5.2732	0.02551	0.001
	grad	2	0.8074	0.40368	3.5762	0.03460	0.001
	pop	3	0.7122	0.23741	2.1033	0.03052	0.001
	Residuals	188	21.2211	0.11288		0.90937	
	Total	194	23.3360	1.00000			
	loc	1	0.5925	0.59254	5.0283	0.02539	0.001
	Residuals	193	22.7434	0.11784		0.97461	
	Total	194	23.3360	1.00000			
	in taxon	1	0.7807	0.78067	7.0081	0.06682	0.001
	bedrock	1	0.2208	0.22083	1.9824	0.01890	0.014
Fung motu98	bedrock	1	3.473	3.4729	9.1019	0.04623	0.001
	grad	2	1.847	0.9233	2.4197	0.02458	0.001
	pop	3	2.265	0.7551	1.9790	0.03016	0.001
	Residuals	177	67.537	0.3816		0.89903	
	Total	183	75.122	1.00000			
	loc	1	2.477	2.47720	6.2063	0.03298	0.001
	Residuals	182	72.644	0.39914		0.96702	
	Total	183	75.122	1.00000			
	in taxon	1	1.828	1.82760	4.8818	0.04829	0.001
	bedrock	1	0.909	0.9090	2.4281	0.02402	0.001

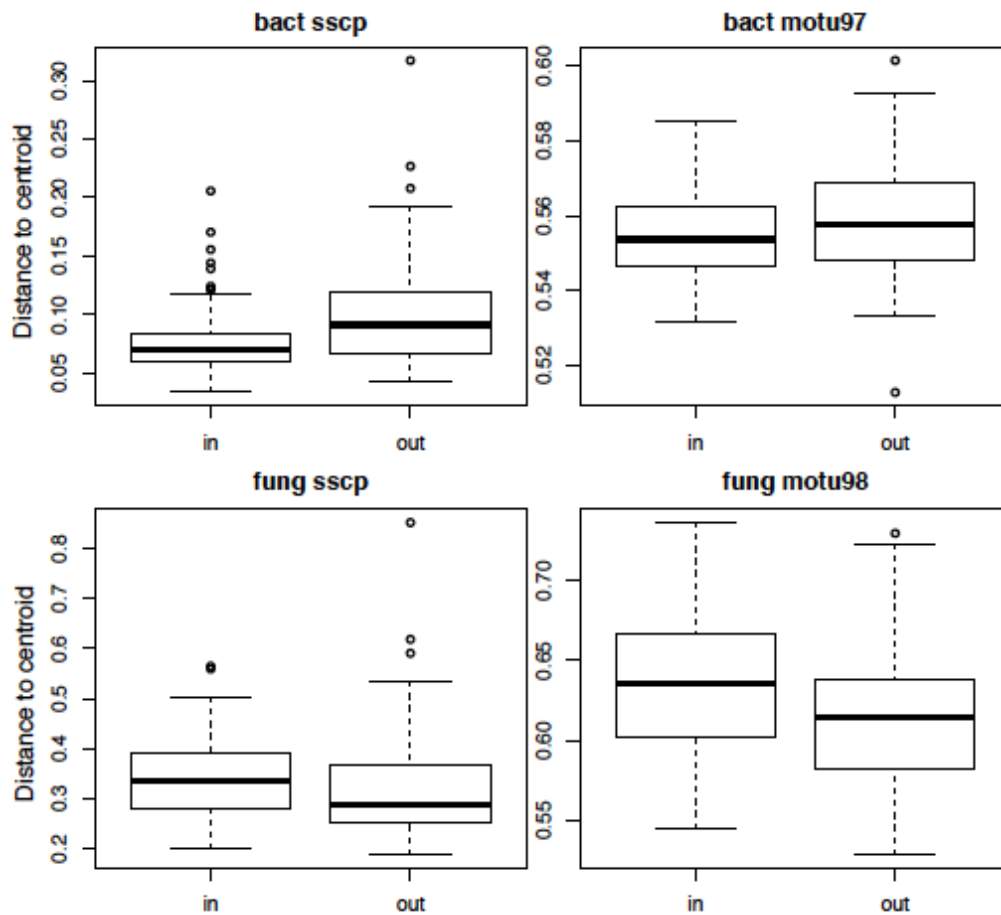


Figure IV.5. Distance au centroïde pour l'habitat sous et hors coussins pour les bactéries et pour les champignons selon la méthode SSCP ou séquençage.

IV. Discussion

L'utilisation croissante du séquençage haut-débit dans les analyses de distribution de la diversité soulève la question de son gain potentiel comparé aux techniques d'empreinte moléculaire. Grâce à un accès à la taxonomie, et à la possibilité de savoir quels OTUs varient le long des gradients environnementaux, le séquençage apporte un gain d'information sur les techniques d'empreintes moléculaire. Les communautés peuvent être caractérisées plus en profondeur.

De manière surprenante, les corrélations entre les dissimilarités des communautés caractérisées par SSCP et celles par séquençage sont plus faibles que ce que nous attendions. Cela suggère que la caractérisation des communautés par l'une ou l'autre des méthodes ne porte pas la même information et que l'augmentation des dissimilarités entre communautés avec le séquençage par rapport à la SSCP n'est pas monotone. Une résolution phylogénétique plus fine par le séquençage pourrait entraîner cette faible corrélation entre les dissimilarités calculées à partir de chaque approche et mener aux différences de patrons observées. L'augmentation des valeurs de dissimilarités peut être due à une meilleure caractérisation des communautés avec le séquençage, en accord avec l'éclatement plus prononcé comparé aux données SSCP. La variabilité du jeu de données est beaucoup plus grande avec le séquençage, ce qui peut expliquer la plus faible part de variance expliquée par les différents facteurs testés, notamment pour les bactéries. Enfin, l'importance de l'effet sous-espèce sur la structure des communautés bactériennes et fongiques associées aux coussins par rapport à l'effet de la roche mère est plus grande avec les données SSCP que les données de séquençage. Egalement, pour les bactéries, nous avons mis en évidence une convergence de la composition des communautés bactériennes sous coussins, peu flagrante et non significative avec les données de séquençage. A l'inverse, pour les champignons, nous mettons en évidence une plus grande beta diversité dans l'habitat coussin avec le séquençage, ce qui était seulement suggéré avec la SSCP.

La part de réalité de chaque approche est difficile à estimer. Le séquençage résulte en un meilleur clustering des MOTUs qui ne contiennent pas d'information chevauchantes contrairement aux empreintes moléculaires. En effet, plusieurs espèces peuvent avoir les mêmes temps de migration et appartenir à un même pic, et les individus d'une même

espèce peuvent migrer différemment (Ranjard *et al.* 2000). Cependant, une partie de la diversité, en particulier pour les champignons, peut être perdue avec le séquençage du fait d'une limite dans le nombre de bases qu'il est possible de séquencer. En effet, l'ITS1 varie en taille et peut excéder 500 pb. Ces champignons sont retrouvés avec la SSCP (pic de fluorescence à 500 bp), alors que le séquençage ne permet de séquencer que 250 bp de chaque côté donc au maximum de retrouver des champignons ayant un ITS2 inférieur à 500 bp. De plus, nous filtrons les séquences dont les deux bouts ont un faible score d'alignement. De plus, les deux approches ne caractérisent pas les communautés aux mêmes résolutions taxonomiques. La SSCP semble caractériser les communautés bactériennes à de faibles résolutions taxonomiques (corrélations entre les patrons SSCP et séquençage SANGER significatives du phylum à la famille pour les bactéries, significative à l'ordre et à la famille pour les champignons ; Zinger 2009). Le clustering à 97% de l'ARNr 16S (ou de ses régions) et à 98% de l'ITS1 correspond grossièrement au seuil de « l'espèce » (Cohan 2002b; Lentendu *et al.* 2011, ce travail de thèse). Pourtant, alors que réduire le seuil de similarité pour regrouper les séquences en MOTU est considéré comme un proxy de la résolution taxonomique, la corrélation la plus importante entre les dissimilarités de composition avec la SSCP et le séquençage est trouvée pour un seuil de 98%. Du fait que l'ITS1 ne porte pas d'information phylogénétique, il est possible qu'un clustering inférieur à 98% n'ait pas de sens biologique et que l'on perde l'information importante, telle qu'un effet subtil de la plante (voir ci-dessous « Partie II »).

Ainsi, le séquençage permet une description en profondeur de la diversité et donc un gain d'informations. Cependant, son fort pouvoir résolutif comparé aux techniques d'empreintes moléculaires, et la possibilité de perte d'une partie de la diversité du fait d'un séquençage encore limité en nombre de bases, peut, à l'inverse, brouiller des patrons forts et mener à une perte d'information écologique. Il peut être nécessaire de faire varier la résolution taxonomique à laquelle étudier la beta diversité microbienne lors de l'utilisation du séquençage haut-débit car chaque résolution porte une information écologique, ce qui est mis en évidence ici par l'analyse des communautés bactériennes.

Partie II. Séquençage et taxonomie des champignons: quels patrons pour quelle résolution taxonomique?

I. Problématique et démarche scientifique

1. Contexte scientifique

Savoir si la résolution phylogénétique reflète les modes de vie est une question centrale en écologie. Elle est d'autant plus importante pour les microorganismes qu'il est nécessaire de les inclure dans les modèles de cycles biogéochimiques au même titre que le couvert végétal. Il est donc essentiel de comprendre cette diversité, de réduire la complexité et de la classer en groupes fonctionnels. Les caractéristiques écologiques semblent grossièrement être conservées à de hauts rangs phylogénétiques chez les bactéries (Philippot *et al.* 2010). Les résultats de la première partie suggèrent cependant un lien entre la résolution taxonomique et la structure des communautés (convergence de la composition des communautés sous coussins à faible résolution taxonomique et réponse forte au type génétique/fonctionnel de coussins et leur roche mère à haute résolution). Bien que la comparaison des patrons de diversité suite à la caractérisation de la diversité bactérienne par SSCP ou séquençage ait mis en évidence un effet potentiel de la résolution taxonomique sur les patrons de beta diversité, nous nous focaliserons sur les champignons pour lesquelles ce type d'étude est quasi inexistant.

2. Objectifs et démarche de l'étude

L'objectif est de tester l'existence d'un lien entre la position phylogénétique d'un organisme et ses caractéristiques écologiques. Une approche est d'analyser la beta diversité selon la résolution phylogénétique, donc de caractériser la distribution des taxons en fonction de la résolution phylogénétique. Le marqueur utilisé pour les champignons ne permet pas d'établir une phylogénie. La taxonomie sera utilisée comme un proxy de la phylogénie. Le regroupement des séquences ITS1 à différents seuils de similarité est considéré comme un proxy de la résolution taxonomique. En parallèle, les MOTUs à 98% (le seuil classique que nous utilisons) sont assignés à un groupe taxonomique afin d'observer si des MOTUs assignés à un même groupe taxonomique montrent des préférences écologiques similaires ou différentes. Les analyses de beta

diversité sont aussi effectuées au niveau du phylum et de l'ordre, à partir des assignations taxonomiques.

Deux approches, l'une basée sur la taxonomie, l'autre sur le seuil de clustering des séquences, ont été mises en œuvre pour tester l'effet de la résolution phylogénétique sur l'appréhension de la beta diversité fongique. Les séquences sont assignées à un taxon en utilisant le programme *ecotag*. Les séquences sont regroupées suivant leur assignation taxonomique au niveau du phylum et de l'ordre ou regroupées en MOTUs à différents seuils de similarité, de 90 à 100%. Les patrons de diversité sont comparés entre les niveaux taxonomiques par NMDS des dissimilarités Bray-curtis. Une matrice de distance (Jaccard) des profils AFLP de chaque coussin est également créée et ordonnée par NMDS. La corrélation entre les NMDS fongiques et la NMDS des AFLP est évaluée par analyse Procruste, une alternative robuste au test de Mantel pour comparer des matrices de distances (Peres-Neto & Jackson 2001). La corrélation entre la génétique des plantes et la composition des communautés fongiques est évaluée pour les différents seuils de similarité. Nous avons utilisé un test du CHI2 pour identifier les MOTUs retrouvés associés ou exclus d'un habitat. La p-valeur est obtenue par permutation de la table de contingence et corrigée par False Discovery Rate (Benjamini & Hochberg 2000). La probabilité à laquelle nous considérons un MOTU comme un faux positif est fixée à 5%. Le test est conduit pour chaque seuil de similarité. Pour finir, afin de préciser l'effet du choix du seuil de clustering, une filiation entre MOTUs est établie à partir de la similarité entre les séquences les plus représentées de chaque MOTU. Deux MOTUs sont considérés proches si chacune de leurs séquences majoritaires sont retrouvées dans les mêmes MOTUs à une similarité inférieure.

II. Résultats

Les analyses à l'échelle du phylum ne montrent pas de différences fortes de composition entre les différents habitats (Figure IV.6., Figure IV.7. A). Cependant, les Basidiomycètes sont plus abondants dans les coussins qu'à l'extérieur (anova $p < 0.05$) bien que leur abondance reste faible, alors que les autres phylums ne montrent pas de variation d'abondance significative (Figure IV.7. A). A l'échelle de l'ordre, quelques taxons montrent des patrons de préférence d'habitats (e.g. Sébacinales pour les coussins lâches, anova $p < 0.05$; Figure IV.7. B) mais il y a un fort recouplement de composition entre habitats (Figure IV.6.). A l'échelle 98%, les habitats montrent clairement des différences de composition de communautés (Figure IV.6.), dont les MOTUs abondants sont spécifiques (Figure IV.7. C, voir Chapitre II). Ce patron est conforté par le nombre supérieur de MOTUs présents ou exclus d'un habitat à 98% comparé à des résolutions inférieures (Figure IV.8. A).

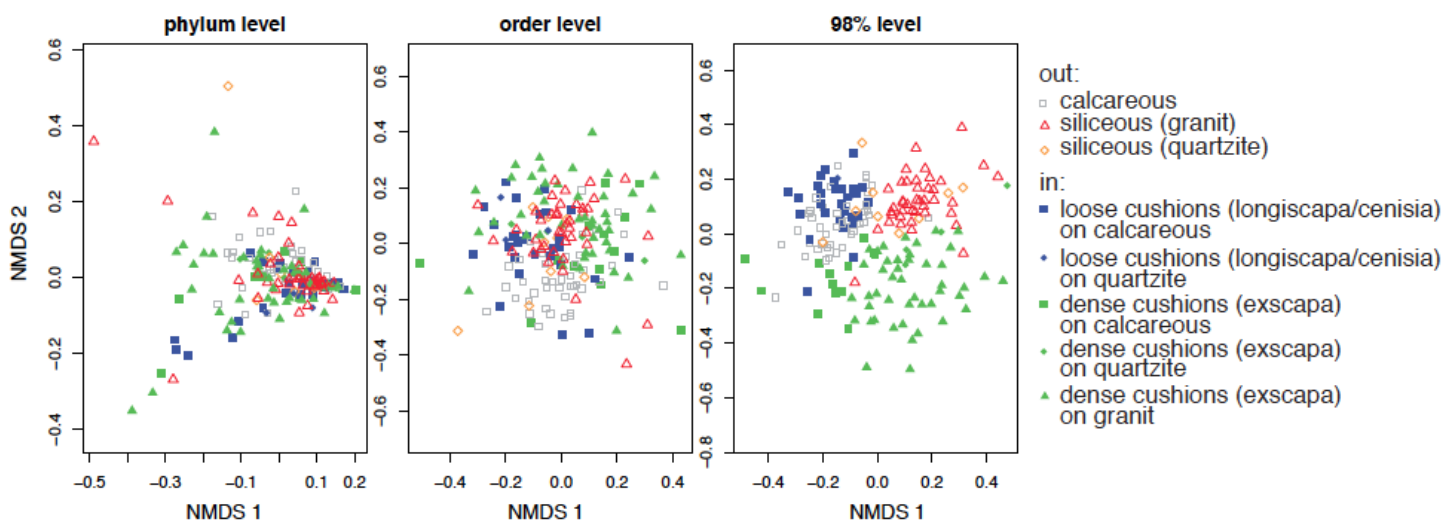


Figure IV.6. Changement des patrons de diversité selon la résolution taxonomique. NMDS des dissimilarités Bray-Curtis à l'échelle du phylum, de l'ordre et des MOTUs à 98%. L'éclatement des communautés selon les habitats augmente avec la résolution taxonomique

La corrélation entre la génétique de la plante et la structure des communautés fongiques est significative quel que soit le seuil de similarité des MOTUs. Toutefois, cette corrélation est supérieure pour des communautés de MOTUs définis à 98% (Figure IV.8. B) et les communautés fongiques associées à *exscapa* ou *longiscapa* sont mieux différenciées à 98 qu'à 90% de similarité (Article II).

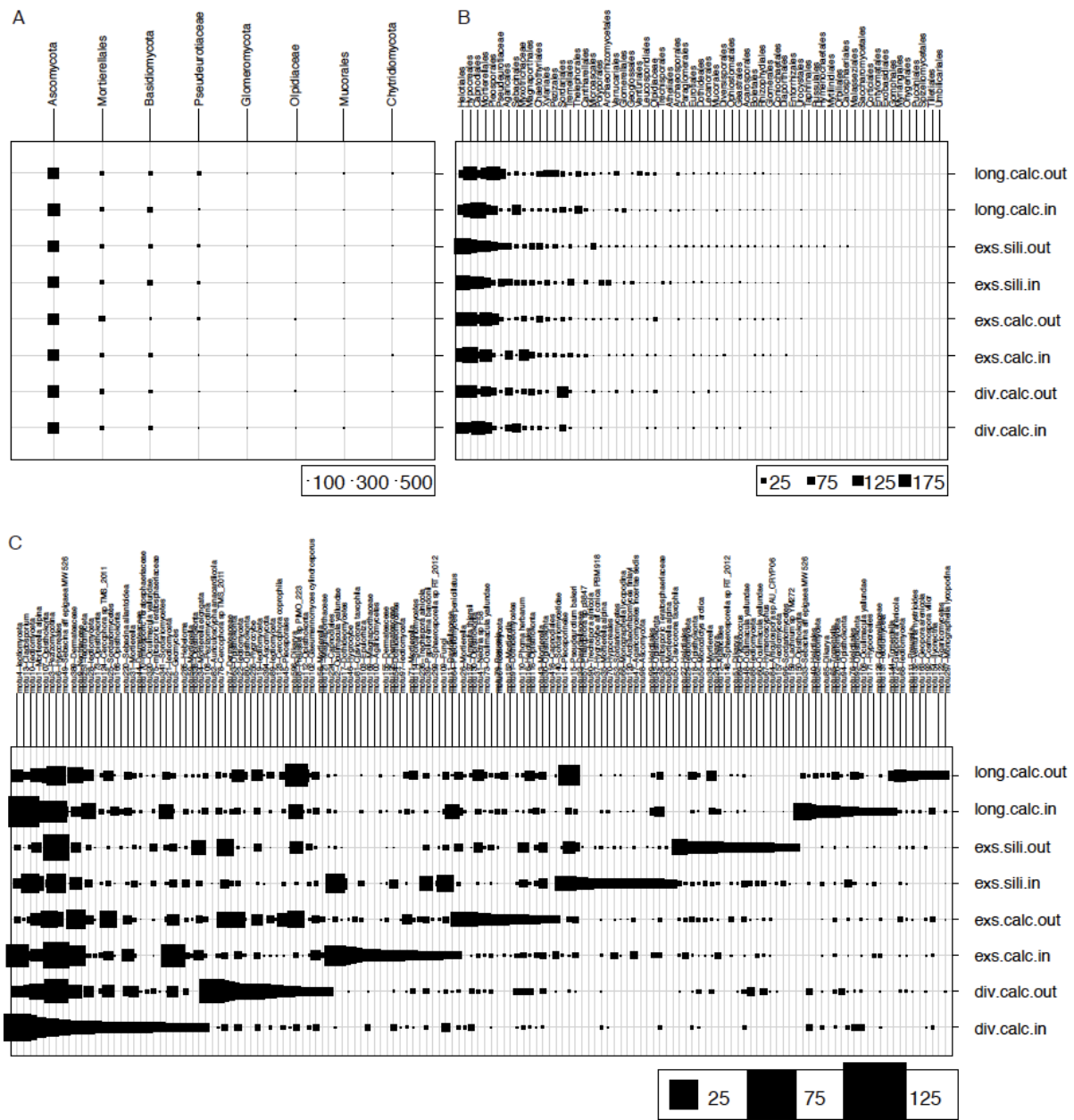


Figure IV.7. Distribution des taxons fongiques, à l'échelle (A) du phylum, (B) de l'ordre, et (C) des MOTUs à 98%. A la résolution des MOTUs à 98%, les 30 MOTUs les plus abondants par habitats sont représentés sur la figure (n=148). On observe une forte différence de composition entre les habitats à l'échelle des MOTUs à 98%.

Plusieurs MOTUs assignés à un même taxon, et ce à une résolution fine pour certains (e.g. au sein des *Oculimacula yallundae* –niveau espèce) montrent des distributions contrastées (Figure IV. 9). De plus certains de ces MOTUs sont proches en termes de similarité de séquences (Figure IV. 10). A l'inverse, certains MOTUs proches, assignés au même taxon (e.g. au sein des Teratosphaeriaceae), montrent une préférence d'habitat similaire (Figure IV. 10).

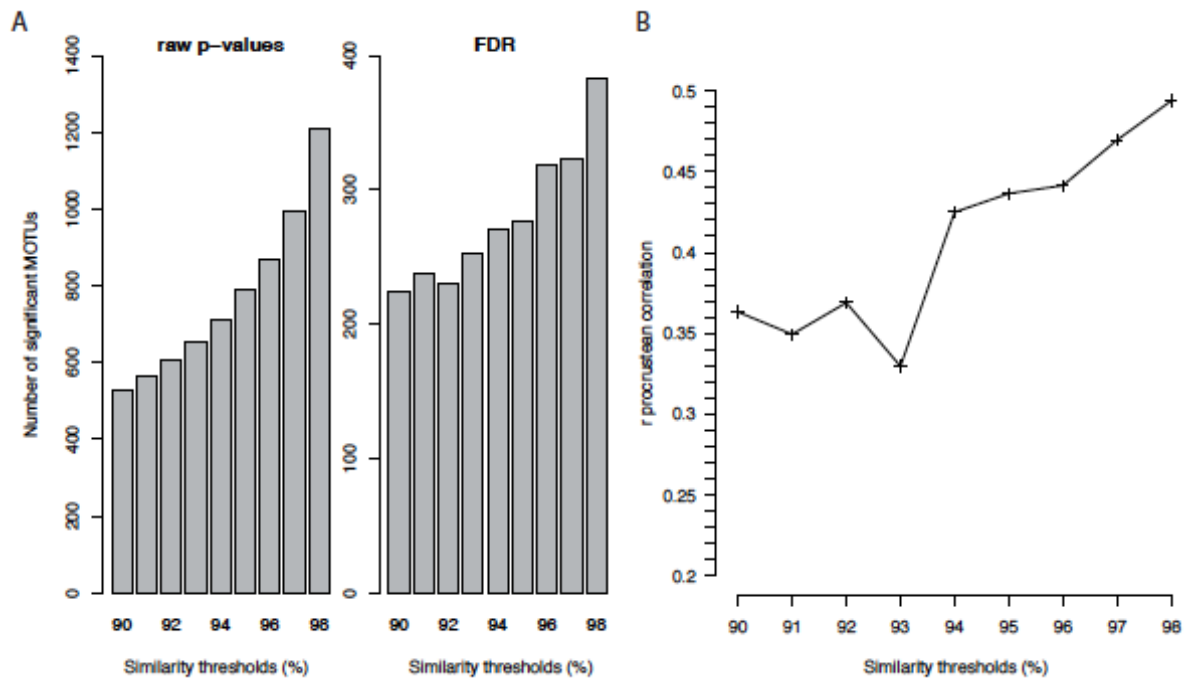


Figure IV.8. Signature écologique en fonction de la résolution taxonomique. (A) Nombre de MOTUs diagnostique d'au moins un habitat en fonction du seuil de similarité pour définir les MOTUs. (B) Corrélation entre la génétique de la plante et la composition des communautés en fonction du seuil de similarité pour définir les MOTUs.

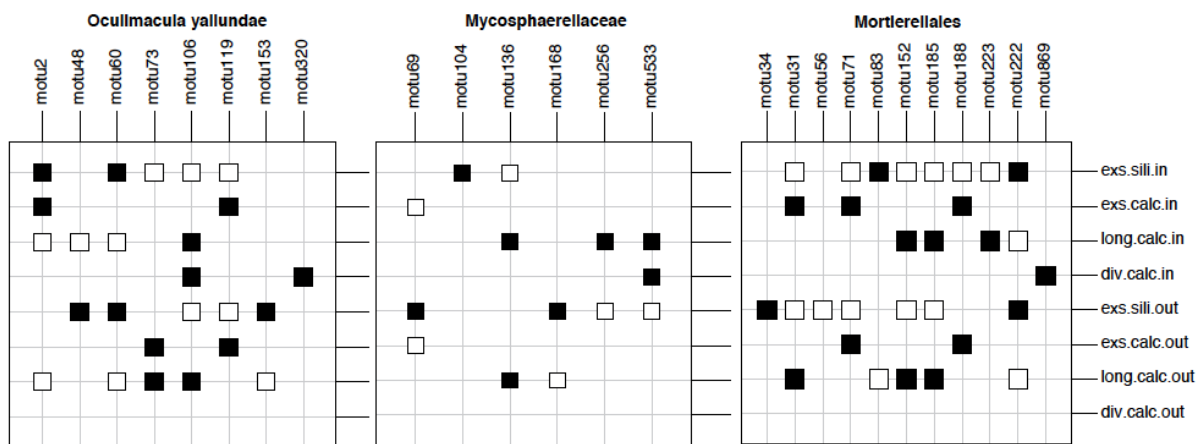


Figure IV.9. Focus sur la distribution des MOTUs fongiques diagnostiques assignées à trois groupes taxonomiques. Un point noir représente une préférence significative du MOTU à l'habitat, un point blanc une exclusion significative de l'habitat. La significativité d'une préférence ou d'une exclusion est testée par un test du CHI2 basé sur les présences/absences dans chaque habitat. Des OTUs aux assignations taxonomiques similaires montrent des préférences d'habitat contrastées. Cela suggère une spécialisation écologique à une résolution phylogénétique fine chez les champignons. Cette spécialisation est retrouvée pour plusieurs clades fongiques suggérant que cette dynamique évolutive est répandue chez les champignons.

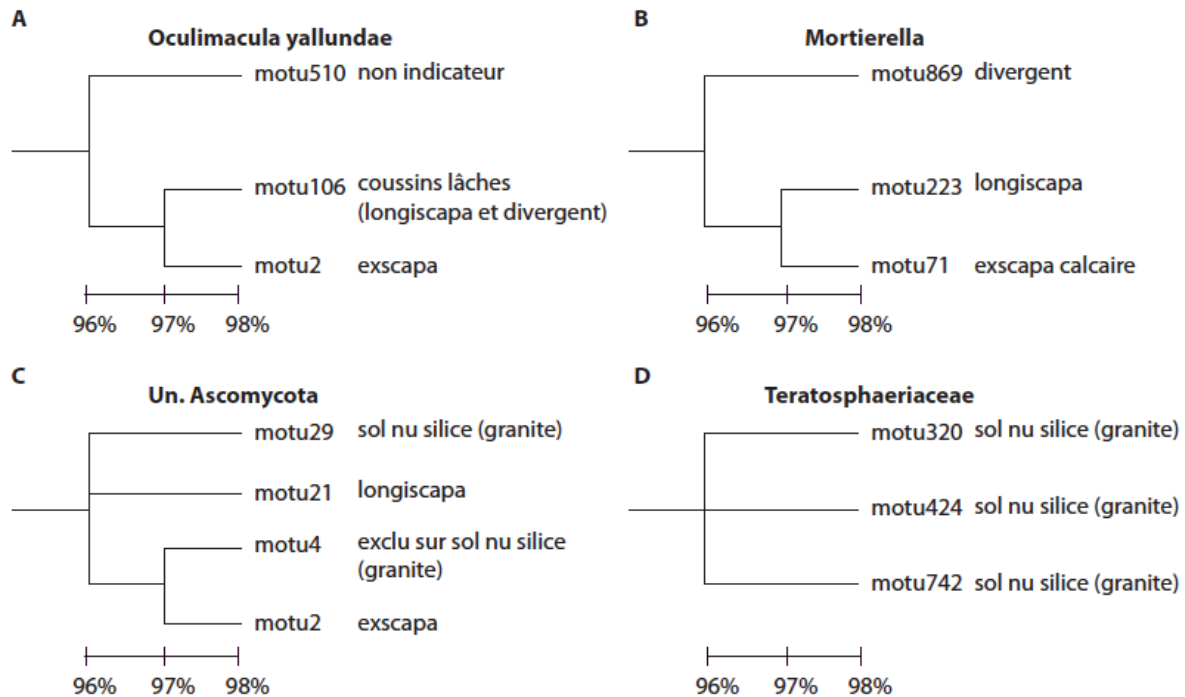


Figure IV. 10. Pseudo phylogénie des MOTUs diagnostic d'habitats pour quatre groupes taxonomiques. La filiation entre les MOTUs est basé sur la similarité de séquences entre MOTUs. Deux MOTUs sont affiliés si la séquence la plus représentée de chaque MOTU à un niveau inférieur (e.g. 98%) se retrouve dans le même MOTU à un niveau supérieur (e.g. 97%). L'analyse est basée sur l'hypothèse que, l'ITS1 évoluant très rapidement, deux séquences ITS1 similaires appartiennent à des organismes proches à des niveaux très bas de la phylogénie. L'analyse est cohérente avec les résultats des assignations taxonomiques. (A) Pour les MOTUs *Oculimacula yallundae* le patron soulève la question d'une co-spéciation entre les MOTUs de cette espèce et les coussins lâches et denses. (B) Pour les *Mortierella*, le patron soulève la question d'une spécialisation pour chaque sous-espèce du *S. acaulis*, mais dans un contexte de pH basique. (C) Certains MOTUs proches au sein des Ascomycètes semble se spécialiser pour différents habitats de notre système d'étude. (D) A l'inverse, trois MOTUs proches des *Teratosphaeriaceae* sont retrouvés dans les sols nus sur silice.

III. Discussion

L'objectif de cette partie était de montrer quels patrons de beta diversité et quels types d'information peuvent être tirés selon la résolution taxonomique dans les analyses d'écologie des communautés pour les champignons. Ces analyses nous amènent à discuter la nature polyphylétique ou monophylétique (le conservatisme de niche) chez les champignons.

1. De l'effet de la résolution taxonomique sur les patrons de beta-diversité

Nos résultats montrent que les patrons de beta-diversité sont mieux appréhendés par l'approches MOTUs (au seuil de similarité de 98%) qu'avec l'approche taxonomie pour laquelle les analyses au niveau du phylum et de l'ordre ne permettaient pas de différencier les communautés provenant de différents habitats. Ce résultat est conforté par l'augmentation du nombre de MOTUs montrant une préférence écologique lorsque l'on définit de manière plus fine les MOTUs. La corrélation entre la génétique de la plante et les communautés fongiques associées est significative quel que soit le seuil de clustering. Nos résultats semblent en accord avec ce qui est observé pour les bactéries (Zinger *et al.* 2012), et indiquent au moins une robustesse des analyses de beta diversité au seuil de clustering pour définir les MOTUs. Cependant, la corrélation augmente lorsque l'on définit de manière plus fine les MOTUs, l'effet roche mère étant équivalent au regard de l'effet sous-espèce dans l'assemblage des communautés pour des MOTUs définis à 90% mais augmentant pour les MOTUs à 98% (Article II).

2. Quelle information écologique pour quelle résolution taxonomique ?

A des niveaux fins de diversité, nous avons mis en évidence des interactions fines entre la plante et les communautés fongiques mais néanmoins importantes en terme d'écologie des plantes et des champignons. Des évènements de spéciations peuvent ainsi être suggérés, notamment de co-spéciation entre les plantes et les champignons. Dans ce cas de figure, la taxonomie doit être considérée comme un appui à l'interprétation écologique et peut permettre d'identifier des groupes taxonomiques ou fonctionnels qu'il serait intéressant d'étudier plus en profondeur, notamment par l'étude de marqueurs permettant d'établir des relations phylogénétiques entre organismes mais aussi par

l'étude de gènes fonctionnels. L'approche MOTUs ne repose pas sur la taxonomie et s'affranchit donc des problèmes d'assignations qui peuvent être soit fausses, soit incomplètes (20 à 40% des MOTUs sont non assignés).

L'approche taxonomie n'est cependant pas à bannir. Des patrons écologiques peuvent être mis en évidence à des résolutions taxonomiques plus grossières. Par exemple, les Basidiomycètes sont significativement plus abondants dans les coussins que hors des coussins et ce quelle que soit la sous-espèce et la roche mère (excepté pour la population *divergente*). Ceci est en accord avec leur dominance dans les sols développés (écologie des champignons) et renforce l'idée d'une formation *de novo* d'un sol organique par les coussins (écologie de la plante). La dominance des Ascomycètes est contraire à ce qui est observé dans les sols alpins où les Basidiomycètes dominent en termes de diversité (nombre de MOTUs) et en termes d'abondance (nombre de séquences), indiquant un filtre environnemental sur la présence et l'abondance des taxons fongiques dans l'environnement. Un autre exemple est frappant au niveau de l'ordre. Les Sébacinales (Basidiomycètes) sont plus abondants dans les coussins au phénotype lâche. D'un point de vue de l'écologie de la plante, cette information est importante. Les Sébacinales ont un fort potentiel pour former des mycorhizes (Weiss *et al.* 2004), notamment des ectomycorhizes des plantes Ericaceae (Selosse *et al.* 2007), et certains sont des endophytes communs des racines (Selosse *et al.* 2009). Dans le cas où ces champignons seraient mutualistes, cela aurait de fortes implications sur l'effet facilitateur des coussins à l'encontre des autres plantes du milieu. De manière intéressante, nous avons observé plus de plantes dans les coussins lâches que les coussins denses, suggérant un effet facilitateur plus important (Figure 0.32C, V.7A).

3. Du conservatisme de niche chez les champignons

Que le nombre de MOTUs montrant une préférence d'habitat augmente lorsque les MOTUs sont définis à des niveaux plus fins peut paraître évident. Cependant, le contraire aurait pu être observé: des MOTUs à 97% peuvent montrer une préférence écologique alors que les MOTUs à 98% le composant sont distribués aléatoirement dans cet habitat et n'auraient pas montré de signal fort. Nous montrons que plusieurs MOTUs ayant différentes préférences d'habitat sont proches phylogénétiquement et/ou assignés au même taxon. Au sein de ces couples, certains MOTUs sont spécialistes d'un environnement de roche nue alors que les autres seront spécialistes de l'environnement

plante. De même, il y a aussi de la spécialisation écologique vis à vis de chaque sous-espèce de *S. acaulis*. Nos résultats montrent donc que des organismes proches phylogénétiquement ne sont pas présents dans les mêmes conditions environnementales. Ce résultat indique que certaines caractéristiques fonctionnelles ne sont pas conservées dans la phylogénie des champignons. La spécialisation écologique semble donc importante à haute résolution taxonomique/phylogénétique chez les champignons. Le patron est retrouvé dans plusieurs groupes taxonomiques éloignés phylogénétiquement (Mortierellales, Dermateaceae, Mycosphaerellaceae) pointant que la spécialisation écologique au niveau des feuilles de l'arbre phylogénétique est une caractéristique commune chez les champignons. Nos observations sont en accord avec la nature polyphylétique des stratégies écologiques chez les champignons, notamment des pathogènes (Berbee 2001), et ils questionnent l'idée de redondance fonctionnelle au niveau spécifique chez les microbes de manière générale (Schimel & Schaeffer 2012). Ces résultats ne peuvent être attribués aux erreurs techniques (notamment de PCR) car ces MOTUs sont retrouvés plus souvent qu'à l'attendu dans différentes PCR d'un même habitat et exclus des différents échantillons d'un autre habitat. Bien que seul l'isolement des souches et une caractérisation détaillée (e.g. physiologique) pourraient trancher s'il y a eu spéciation, la diversité fine observée a un sens écologique. Dans un deuxième temps, nous montrons que les Basidiomycètes sont significativement plus abondants dans les coussins que hors des coussins alors que les Ascomycètes sont quant à eux fortement dominants dans cet écosystème de falaises de haute montagne, quel que soit le micro-habitat considéré. Les Ascomycètes sont-ils plus adaptés pour faire face à des conditions extrêmes ? Sans répondre à cette question, ce patron suggère i) une différence profonde entre les Basidiomycètes et les Ascomycètes dans la réponse au stress environnemental et ii) que la persistance des Ascomycètes est permise par des traits conservés à des niveaux profonds de la phylogénie.

4. Une hiérarchie de facteurs environnementaux et de traits fonctionnels

Nos résultats révèlent une hiérarchie de facteurs agissant à différentes résolutions taxonomiques. En effet, les Ascomycètes dominent les écosystèmes de falaises comprenant les coussins et le sol extérieur, les Basidiomycètes augmentent en abondance dans les coussins, les Sébacinales sont plus abondants dans les coussins lâches, et des MOTUs phylogénétiquement proches sont spécifiques des coussins lâches ou denses, sur

calcaire ou silice, ou une combinaison des deux (voir Chapitre II pour une description de ces MOTUs). L'hétérogénéité environnementale influence la distribution des champignons à différentes échelles spatiale mais aussi phylogénétiques (Figure 0.18, IV.11).

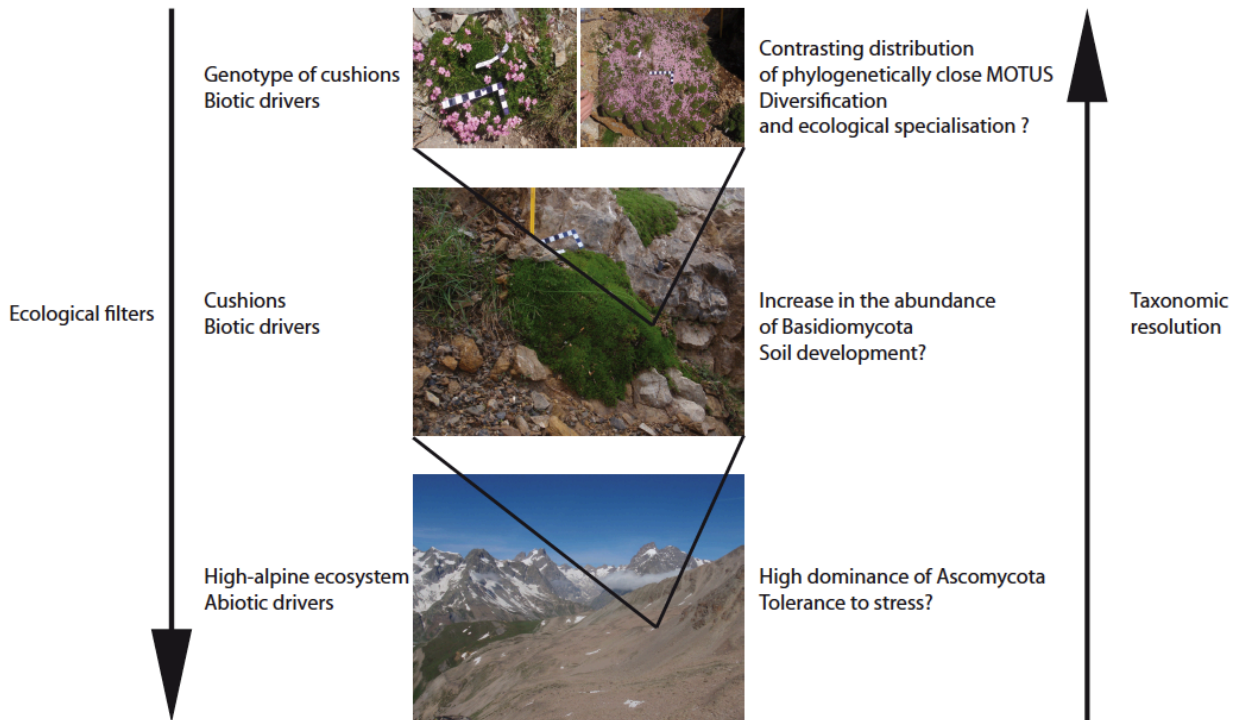


Figure IV.11. Une hiérarchie de facteurs environnementaux agissant à différentes résolutions taxonomiques. Cas de la distribution des champignons dans les écosystèmes alpins de falaises incluant des plantes en coussin montrant une divergence évolutive en cours.

Ces observations sont très probablement le résultat d'une covariation entre la conservation des traits fonctionnels et le contraste environnemental. Un organisme aquatique n'est pas retrouvé dans le sol. Cette affirmation simple reflète ce qui était déjà proposé par Gottlieb (Gottlieb *et al.* 1988). Il y a des différences évidentes entre organismes autotrophes, herbivores, décomposeurs, et chacun de ces groupes est lui-même représenté par une immense diversité de taxons, de formes de vie et de physiologies. Cependant, il existe un patron commun de spécialisation écologique et évolutive. C'est cette spécialisation commune qui est très importante pour notre compréhension de la structure et de la dynamique des communautés et des écosystèmes.

Schimel et Schaeffer (Schimel & Schaeffer 2012) considèrent que le niveau phylogénétique auquel les microbes forment des guildes cohérentes (avec du sens biologique) doit être basé sur les stratégies d'histoire de vie générales (cet aspect est

rediscuté dans la discussion générale). Ils suggèrent que ces guildes sont associées à des divergences évolutives profondes, alors que la diversité au niveau de l'espèce reflète probablement de la redondance fonctionnelle. Cependant, i) des organismes distincts phylogénétiquement peuvent appartenir à des mêmes guildes et ii) nos résultats montrent que la redondance fonctionnelle intra-taxon chez les champignons ne serait pas tant répandue. Cette redondance fonctionnelle semble cependant être présente dans certains groupes de champignons, notamment mise en évidence chez les Teratosphaeriaceae pour lesquels trois MOTUs proches sont retrouvés préférentiellement dans le sol nu sur silice, sans pour autant exclure les biais techniques qui pourraient mener à former trois MOTUS au lieu d'un. Nous ne sommes pas dans la possibilité d'exclure l'une ou l'autre hypothèse. Des champignons qui sont potentiellement des pathogènes semblent s'être spécialisés pour chaque sous-espèce de plante menant peut-être à une spéciation. Ces champignons sont parfois proches phylogénétiquement de champignons de roche nue. Ce pouvoir adaptatif peut être considéré comme un trait fonctionnel (Gueidan *et al.* 2008). En effet, ces auteurs montrent que des lignées fongiques riches en pathogènes et mutualistes sont issues d'un ancêtre dont l'habitat est les roches nues. Cela a été montré chez les Verrucariales et les Chaetothyriales, bien que nous, nous n'ayons pas relevé spécifiquement de patrons pour ces deux ordres. Ces champignons ont des traits spécifiques physiologiques et morphologiques d'extrémotolérance qui ont évolué en réponse aux stress des conditions extrêmes qui prévalent à la surface des roches nues. Ces facteurs ont facilité la colonisation de substrats variés comme le cerveau des vertébrés par des champignons pathogènes opportunistes, aussi bien qu'ils ont facilité l'établissement d'une symbiose stable sous la forme de lichen. Ce pourrait être le cas dans notre étude : la préférence d'habitat à des niveaux fins de résolution taxonomique n'est pas conservée mais le pouvoir adaptatif est un trait quant à lui conservé. Il est primordial de considérer la résolution des facteurs environnementaux et des traits étudiés dans les interprétations des patrons de beta diversité microbienne et dans les futures analyses d'étude des traits de vie des microorganismes.

5. Conclusion

Etant donné i) la pauvreté des bases de données taxonomiques qui ne permettent pas de regrouper de façon fiable les séquences, particulièrement dans des systèmes exotiques (comme les falaises d'altitude) et ii) que des MOTUs proches phylogénétiquement et/ou

assignées au même taxon montrent des distributions contrastées le long des gradients environnementaux, il est très probable qu'il y ait une perte d'information pour des analyses de beta diversité basées sur la taxonomie (regroupements des séquences ou des MOTUs selon leur assignation taxonomique). Inversement, nos résultats suggèrent un gain d'information par la caractérisation des communautés fongiques à des hautes résolutions des MOTUS, notamment à 98%. Cependant, cette conclusion doit être tempérée. Il existe une covariation entre la hiérarchie des facteurs contrôlant la biogéographie des champignons (et des microorganismes en général) et la conservation des traits le long de la phylogénie. Les deux composantes sont à prendre en compte afin de considérer la résolution taxonomique/phylogénétique à laquelle étudiée la composition des communautés ou la distribution de taxons microbiens.

Discussion générale et perspectives

I. Les coussins de *S. acaulis*, un effet fondateur sur les communautés bactériennes et fongiques

L'objectif du projet Ecologie Verticale sur lequel cette thèse est venue s'appuyer était i) d'étendre la caractérisation de l'effet fondateur des plantes en coussin des milieux alpins à d'autres niveaux trophiques et ii) caractériser les conséquences de la divergence en cours au sein d'une espèce ingénieure (*S. acaulis*) sur la structure et le fonctionnement des communautés au niveau intra- et inter-trophique. Nous nous sommes attachés à décrire l'effet fondateur du *Silene acaulis* sur la structure des communautés bactériennes et fongiques et comment il varie du fait de la divergence évolutive en cours.

1. « Ecosystem engineering » du *S. acaulis* sur différents niveaux trophiques

Les coussins de *S. acaulis* ont un fort effet fondateur sur la structure des communautés bactériennes et fongiques. Ainsi des patrons similaires sont observés de l'effet des plantes fondatrices sur la diversité végétale et microbienne (Figure V.1). Les deux sous-espèces de *S. acaulis* bien qu'elles soient dans des contextes géologiques différents, protègent des espèces végétales similaires (Figure V.1A, C), ce qui fait le parallèle avec l'effet tampon des coussins sur la roche mère sur les communautés bactériennes et un effet positif qui augmente avec l'altitude pour des MOTUs et des ordres fongiques identiques quelle que soit la sous-espèce (Chapitre III). Sans parler de facilitation, les coussins ont un effet positif sur toute une communauté de microorganismes et cet effet fondateur tend à augmenter avec la contrainte environnementale.



Figure V.1. Illustration de l'effet protecteur des coussins de *S. acaulis*. (A) Sous-espèce *longiscapa* avec (1) *Valeriana saliuunca*, (2) *Juniperus communis nana*, (3) *Gentiana brachyphylla* (?), (4) *Festuca quadriflora* et (5) *Saxifraga oppositifolia* ou *S. retusa*, Roche Colombe, 2700 m. (B) Sous-espèce *longiscapa* avec (1) une chenille de papillon, Roche Colombe, 2700 m. Noter le port moins lâche pour ces deux coussins (A) et (B) (population CII comprenant des hybrides *longiscapa/divergent*), voir Figure 0.32. (C) Sous-espèce *exscapa* avec (1) *Valeriana saliuunca* et (2) *Cerastium* sp., Pointe de l'Etendard, 2700 m. (D) Sous-espèce *exscapa* avec (1) *Leucanthemopsis minima*, Pointe de l'Etendard, 2960 m.

Plus précisément, nos résultats montrent que la richesse en MOTUs (considérant tous les MOTUs) est plus faible à l'intérieur des coussins, pour les champignons et les bactéries (Figure V.2). Cependant, pour les champignons, les coussins recrutent des MOTUs que l'on ne retrouve jamais à l'extérieur, et ce pour des MOTUs abondants (inclus dans les 500 MOTUs les plus représentés, Figure V.2). Ne considérant que ces MOTUs abondants, la richesse est alors plus élevée dans les coussins. Pour les bactéries, les coussins recrutent des MOTUs que ne l'on retrouve pas à l'extérieur, mais ce sont des MOTUs rares. La totalité des 500 MOTUS bactériens les plus représentés sont partagés entre les habitats coussin et extérieur (Figure V.2). La présence des coussins entraîne donc une plus grande diversité pour la communauté microbienne totale, notamment pour les champignons, comme il l'est observé pour les plantes (Cavieres & Badano 2009). Pour les bactéries, le problème des erreurs de PCR n'est pas à écarter, sachant qu'il est

difficile de faire la part entre les erreurs techniques (PCR, séquençage) et la biosphère rare. En parallèle, nous avons observé i) certains MOTUs ou taxons exclusivement ou préférentiellement sous coussins et ii) que certains MOTUs ou taxons subissant un effet délétère de l'altitude hors coussins, persistent dans les coussins.

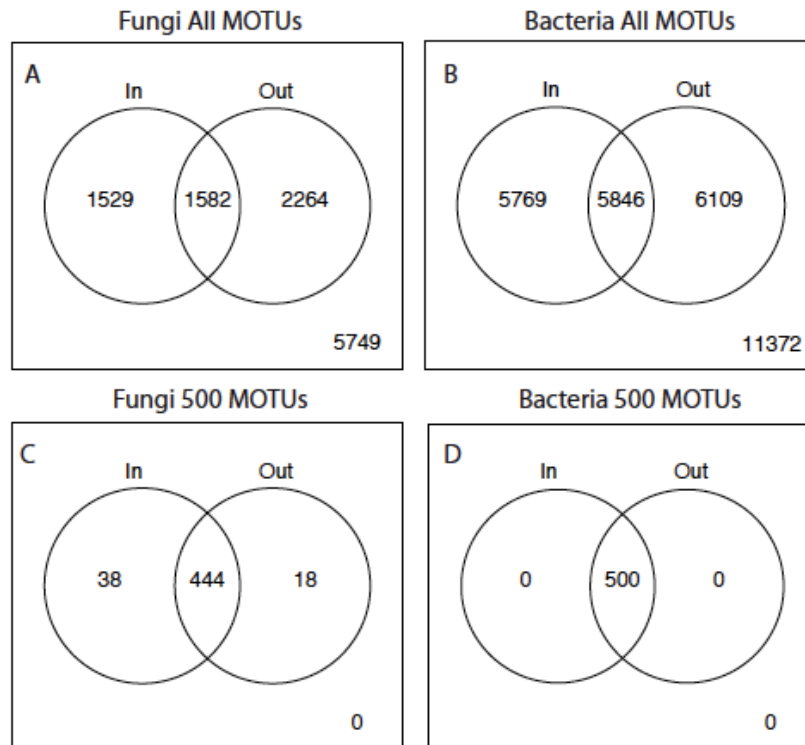


Figure V.2. Diagramme de Venn montrant les MOTUs partagés ou spécifiques des habitats coussin et extérieur. Le chiffre en bas à droite indique le nombre de MOTUs étant absent de la totalité des échantillons après le rééchantillonnage des échantillons à 950 (champignons) ou 500 (bactéries) séquences. A noter : avec cette méthode, un MOTU retrouvé une fois dans une condition est considéré présent dans la condition même si la condition inclut plusieurs échantillons.

Nous observons donc des patrons similaires de l'effet des plantes fondatrices sur la diversité végétale et microbienne. Cependant un même patron peut être le résultat de différents processus. En grande partie, les interactions plantes-microorganismes diffèrent fondamentalement des interactions plantes-plantes, dans le sens où les interactions plantes-microorganismes sont généralement de type « nutritive » (de nature trophique), les microorganismes se nourrissant de la plante. Les champignons présents préférentiellement sous coussins ou bénéficiant d'un effet positif sont assignés à des champignons biotrophes (Dermateaceae, Mycosphaerelaceae) ou saprotrophes (Mortierellales, Basidiomycota). Les biotrophes sont dépendants de la présence de l'hôte et les saprotrophes dépendant de l'apport de matière organique végétale, en faible

quantité à l'extérieur des coussins. Ainsi, la richesse plus faible dans les coussins suggère que le coussin agit comme un filtre sélectif et que la présence ou l'abondance des espèces dans les coussins pourraient en grande partie résulter d'une compétition pour la matière organique ou pour l'hôte (la plante) menant à la sélection des champignons les mieux adaptés.

Il serait possible que les plantes subordonnées à l'espèce fondatrice compétent elles aussi pour une variable abiotique modifiée par l'espèce fondatrice, ce qui impliquerait les mêmes mécanismes structurant les communautés microbiennes et végétales au sein des coussins. Notre travail soulève également que certaines espèces de champignons auraient pu se spécié pour les coussins, ce qui n'est pas observé (à vrai dire non étudié) chez les plantes.

2. Inclure les microorganismes dans la construction de niche du *S. acaulis*

D'un point de vue de l'écologie des plantes, la construction de niche apparaît être un concept intéressant dans lequel intégrer les résultats de ce travail de thèse. Les coussins construisent l'environnement abiotique subi. Ce faisant, ils construisent un habitat biotique, en hébergeant des microorganismes absents à l'extérieur. Ils hébergent notamment des saprotrophes permettant la mise en place d'un sol organique, mais également des biotrophes potentiellement parasites (voire pathogènes). Comme discuté dans les précédents chapitres, ces microorganismes peuvent avoir un impact sur la performance des coussins (van der Heijden *et al.* 2008), leur pouvoir facilitateur (Callaway *et al.* 2007), et les flux de gènes (Bombliès & Weigel 2007), l'ensemble constituant un moteur à l'évolution et la spéciation chez les plantes, facilitateur et facilité. Nous montrons une composante génétique aux communautés microbiennes associées aux coussins de *S. acaulis*. Bien que différents champignons associés à chaque sous-espèce de coussins puissent être redondant fonctionnellement, il est également probable que chacune des sous-espèces hébergent et/ou sélectionnent des champignons aux traits de vies et aux stratégies différentes, menant à un environnement abiotique et biotique subi par la plante différent d'une sous-espèce à l'autre. Par des effets de rétroaction entre le climat, les caractéristiques abiotiques de la roche mère, et les conséquences en termes d'interactions avec les espèces subordonnées, il peut y avoir une spécialisation écologique et une spéciation chez l'espèce fondatrice selon le type de niche construite (Michalet *et al.* 2011). Nous montrons que les microorganismes

hébergés par la plante fondatrice sont à prendre en compte dans la caractérisation de sa niche. Il serait essentiel de caractériser les modes de vies des champignons et d'évaluer l'impact que ces champignons ont sur la performance des coussins de chacune des sous-espèces du *S. acaulis*.

3. Les microorganismes, un trait végétal ?

Les microorganismes font partie de l'environnement subi par les coussins. Cet environnement est contrôlé génétiquement. De plus, les microorganismes peuvent, par des effets directs et indirects, affecter la performance des coussins. Suivant ces caractéristiques, peut-on considérer les microorganismes comme un trait fonctionnel ou le phénotype des coussins ? Un coussin et sa communauté associée formeraient un tout sur lequel agirait la sélection naturelle. Cette notion de trait implique cependant que partout où sera un coussin de *S. acaulis* (ou d'une des sous-espèces), il hébergera la même communauté microbienne, en d'autres termes que « tout est partout ». Or, certains coussins d'une même population ne recrutent pas les mêmes microorganismes. De plus, les communautés fongiques dépendent en grande partie d'un effet site, que cela soit dû à une contingence historique, des effets de dispersion limitée ou aux conditions physiques du milieu. En effet, bien que les communautés fongiques dépendent de la génétique de la plante, il y a des différences de composition entre les communautés associées à une même sous-espèce suivant le contexte géologique et altitudinal. Nous parlons ici de différence de composition taxonomique, mais la fonction ou le résultat de l'activité du microorganisme peut ne pas dépendre de la taxonomie (redundance fonctionnelle). Les microorganismes comme phénotype étendu est un concept d'autant moins évident que cette notion implique une adaptation (Odling-Smee *et al.* 2013). En d'autres mots, les microorganismes associés à la plante seraient une adaptation de cette plante à un environnement donné. Le cas des mycorhizes est difficile à considérer dans le contexte des traits. La capacité d'une plante à être mycorhizée est un trait fonctionnel de cette plante, tout comme sa capacité à être mycorhizée par un type de champignon ou par plusieurs.

4. Effet de la plante sur les microorganismes : coussin-spécifique ou effet plante ?

Les dynamiques d'assemblages observées auraient-elles pu être observées avec une autre plante alpine que les coussins de *S. acaulis* ? Par l'apport de matière organique au

sol, il est possible de penser que tout autre plante aurait eu le même impact sur la structuration des communautés microbiennes, via une modification du pH, notamment sur silice, et un apport en nutriments. L'effet des coussins sur les microorganismes ne serait qu'un effet plante, alors que les coussins sont particulier pour les autres plantes alpines, les plantes alpines ne formant pas de coussin n'agissant pas comme des protecteurs. Noter ici que nous parlons du cas des falaises de haute altitude très minérales et non des systèmes subalpins et alpins dans lesquels la facilitation entre plantes (ne formant pas forcément de coussin) est un processus majeur structurant les communautés en milieu contraint (altitude, crête ventée) (Choler *et al.* 2001). Les coussins sont déconnectés de la matrice extérieure à la différence des autres plantes qui agissent sur le sol mais ne formant pas un sol en soi. Ainsi, l'effet observé pourrait être propre aux coussins de *S. acaulis*.

L'effet fondateur des plantes en coussin s'étend aux microorganismes. Les coussins semblent héberger les espèces microbiennes les mieux adaptées à cet habitat, notamment pour les champignons. Cet effet positif sur toute une communauté est d'autant plus fort que la contrainte environnementale augmente et pourrait être expliqué par une relation étroite avec des biotrophes des plantes ou par un apport de nutriments pour des organismes saprotrophes.

II. Biogéographie : les différents processus à l'origine de l'assemblage des communautés microbiennes dans les écosystèmes alpins de falaises

Un des objectifs de ce travail de thèse était de caractériser la biogéographie des bactéries et des champignons dans les environnements de falaises de haute altitude. L'objectif était notamment de caractériser l'effet des plantes sur la distribution microbienne et d'évaluer son importance au regard des effets du contexte abiotique. *Silene acaulis* a la caractéristique de représenter un système en îles séparées par une matrice minérale hostile, réparties à différentes échelles spatiales, de la population au massif montagneux et entre massifs. L'ensemble de nos résultats montre que la plante est un déterminant majeur de la distribution microbienne, particulièrement pour les champignons. La structure des communautés fongiques dépend de la plante, et, à des niveaux plus fins, des caractéristiques éco-physiologiques des plantes. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente conduite à l'étage alpin dans laquelle les communautés fongiques étaient dépendantes d'un effet purement lié au couvert végétal alors que les communautés bactériennes étaient dépendantes de l'interaction entre le couvert végétal et les caractéristiques abiotiques du sol (Zinger *et al.* 2011b).

1. « Tout est partout mais l'environnement sélectionne » ou « existence de barrières biogéographiques » ?

La question d'isolement géographique chez les microorganismes ou d'une contingence historique a fait l'objet d'un vif débat ces dernières années, notamment grâce à l'avènement des méthodes de biologie moléculaire ayant permis une caractérisation plus détaillée de la diversité microbienne et un regain d'engouement pour décrire la biogéographie microbienne.

Nos résultats confortent l'idée que la distribution microbienne (et/ou l'assemblage des communautés) est fortement déterminée par les caractéristiques environnementales actuelles du milieu, filtrant les espèces à partir d'un pool global. Plus l'hétérogénéité environnementale est grande, plus la beta diversité est grande, que ce soit à l'échelle de chaque coussin ou entre massifs. Pour les bactéries, nos résultats montrent une forte dépendance vis à vis du pH du sol, en accord avec l'ensemble des études

concernant la biogéographie bactérienne, que ce soit à échelle locale ou globale (e.g. (Fierer & Jackson 2006; Zinger *et al.* 2011b)). Dans notre cas d'étude, l'effet du pH explique à la fois l'influence des coussins et de la géologie sur la distribution bactérienne. Cet effet était majeur et la composante spatiale faible. Les champignons également, dont la distribution est fortement contrôlée par les coussins et leurs caractéristiques biotiques, répondent fortement aux conditions actuelles du milieu.

La biogéographie est toutefois plus complexe pour les champignons. Pour rappel, les coussins denses de la sous-espèce *exscapa* sont retrouvés dans le massif calcaire des Cerces et le massif siliceux du Combeynot. Les coussins lâches de *longiscapa* ne sont quant à eux retrouvés que dans le massif des Cerces. Les coussins d'*exscapa* établis dans les Cerces sont donc plus proches géographiquement des coussins de *longiscapa* et dans un contexte géologique relativement similaire. Nos résultats montrent que les communautés fongiques sont principalement structurées selon la sous-espèce de *S. acaulis* et non par la roche mère ou la distance géographique, appuyant que, comme pour les bactéries, la biogéographie fongique est expliquée par l'environnement actuel. Par exemple, le motu2 est retrouvé dans tous les coussins d'*exscapa* et est dominant. De plus, l'idée d'un effet de l'environnement actuel est confortée par la composition des communautés fongiques d'*exscapa* sur calcaire, intermédiaire aux communautés d'*exscapa* sur silice et de *longiscapa* sur calcaire. Cependant, malgré les méthodes statistiques, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une dispersion limitée entre montagnes, à l'origine de cette composition intermédiaire. Notamment, il apparaît que la distribution à l'extérieur des coussins est peu expliquée par les variables environnementales, avec une forte composante « site » dans la composition des communautés fongiques, bien plus importante que pour les bactéries (voir Table IV.1). Ces résultats sont en accord avec entre autres les premières hypothèses posées par Darwin ou plus récemment par Wang et collègues, proposant que plus un organisme est petit, plus grande est son aire de distribution (Darwin 1859; Wang *et al.* 2012).

Les résultats suggèrent également que la spéciation *in situ* est un processus probablement impliqué dans la structure des communautés fongiques (et peut-être aussi pour les bactéries). En effet, nous avons trouvé des MOTUs fongiques assignés au même taxon et dont les séquences ITS1 étaient très similaires (>=97%). Ces MOTUs « frères » montrent des préférences d'habitat très contrastées, pour des habitats pourtant proches géographiquement, e.g. l'habitat coussin et l'extérieur ou les

différentes sous-espèces de *S. acaulis*. Cette hypothèse de spéciation est probable ; il a été montré que l'ancêtre de champignons formant des lichens (Verrucariales) ou de champignons pathogènes (Chaetothyriales) était un champignon de roches nues, dont les traits ayant évolués pour une surface rocheuse hostile ont pu favoriser le changement de mode de vie (Gueidan *et al.* 2008). Les communautés bactériennes n'ont pas été analysées aussi profondément que les communautés fongiques. Il serait intéressant de voir si la spéciation *in situ* est également impliquée. Jusque là, nous avons montré que les communautés appartenant à différents habitats étaient mieux différenciées pour des MOTUS à 97% que par empreinte moléculaire pour laquelle on sait que la résolution phylogénétique est plus faible, suggérant une spécialisation écologique à des résolutions phylogénétiques fines (et peut-être de la spéciation) pour les bactéries. Également, la longévité des coussins entraîne de ce fait une interaction à long terme qui pourrait favoriser des événements de spéciation chez les microbes pour ces plantes.

La dérive écologique est peut être une force impliquée dans l'assemblage des communautés fongiques (et bactérienne), mais il nous n'est pas possible de la mettre en évidence. Elle pourrait être à l'origine de la grande part de variance inexplicée (~80-90%).

2. Perspectives en biogéographie pour le système plante en coussin et *S. acaulis*

S. acaulis est une espèce arctico-alpine. En Europe, l'espèce est retrouvée des Pyrénées à l'arctique européen en passant par l'arc alpin. On retrouve cette espèce également en Amérique du Nord, des Rocheuses à l'arctique nord-américain et au Québec. Il existe donc deux gradients latitudinaux et deux gradients longitudinaux de distribution de l'espèce avec une multitude de sous-espèces décrites, que ce soit à échelle régionale ou globale.

Il est possible de travailler à des échelles spatiales plus grandes afin de comparer l'importance des différentes forces et le pouvoir sélectif de la plante à échelle locale, régionale et globale. L'influence des facteurs contrôlant la composition phylogénétique des communautés microbiennes est susceptible de changer avec l'échelle spatiale. Par exemple, l'effet du génotype de la plante est-il aussi fort à échelle régionale ou globale? Deux perspectives émergent. Premièrement, il serait possible de tester les liens entre la phylogéographie du *Silene acaulis* et la biogéographie des champignons associés, testant ainsi le lien plante-microorganismes à large échelle spatiale et temporelle.

Deuxièmement, l'influence d'un pool microbien régional sur la composition des communautés associées à la plante pourrait être prépondérante. Il serait alors intéressant de voir quelles sont les conséquences fonctionnelles sur les coussins (fonctionnement de la communauté microbienne, pouvoir ingénieur des coussins, construction de niche, facilitation sur les autres plantes) de cet isolement par la distance. Certains auteurs arguent en faveur d'une forte redondance fonctionnelle chez les microorganismes, ce qui minimiserait l'effet de la géographie sur le fonctionnement du système coussin. Par exemple, la qualité du sol créé *de novo* reste inchangée grâce à la capacité de dégradation de la MO des microorganismes associés aux coussins quelle que soit leur identité. Cela se caractériserait par une augmentation du nombre d'espèces en fonction du nombre de coussins échantillonnés, alors que le nombre de fonctions saturerait pour atteindre un plateau, ou par une faible corrélation entre la beta diversité taxonomique et la beta diversité fonctionnelle. Egalement, deux-sous espèces de *S. acaulis* peuvent ne pas héberger les mêmes pathogènes du fait d'une « co-évolution », mais en terme de construction de niche par les coussins, chaque sous-espèce héberge un pathogène, donc une fonction similaire, quelle que soit l'identité du pathogène. Une biogéographie fonctionnelle microbienne et végétale serait prometteuse, des gènes aux conséquences écosystémiques.

A l'échelle de l'étude (régionale), les communautés microbiennes sont structurées par l'environnement actuel. La plante et ces caractéristiques associées (génotype/phénotype) sont les principaux facteurs affectant la composition des communautés microbiennes, notamment pour les champignons. Le changement d'échelles spatiales et temporelles en biogéographie permet d'établir une nouvelle hiérarchie des facteurs écologiques impactant la distribution des microorganismes. De plus, il serait particulièrement intéressant de coupler les approches classiques de biogéographie à une biogéographie fonctionnelle, des gènes aux conséquences écosystémiques.

III. Assemblage des communautés fongiques : un effet plante hôte médié par les traits fonctionnels végétaux

Le cœur du manuscrit ne présentait que les résultats sur le système des plantes en coussins de falaises de haute altitude. D'autres systèmes ont été étudiés au cours de cette thèse. Ce point mène à discuter les interactions plantes-microorganismes à différentes échelles de l'effet plante.

1. Emergence d'un lien entre communautés fongiques et caractéristiques éco-physiologiques des plantes

Les observations récurrentes d'un effet plante hôte ou du couvert végétal sur la composition et la diversité des communautés fongiques, en parallèle de ce qui a déjà été observé (Bouasria *et al.* 2012; Zinger *et al.* 2009a), suggèrent que les caractéristiques éco-physiologiques de la plante dominante sont impliquées dans le recrutement des espèces qui lui sont associées. En effet, de manière intéressante, en comparant les communautés fongiques associées à i) différents morphotypes au sein d'un taxon végétal (Figure 0.32C, ii) différentes espèces végétales et iii) différentes communautés végétales, les communautés fongiques semblent s'assembler selon la stratégie d'exploitation des ressources de la plante dominante (Figure V.3). Dans le chapitre II, les changements de composition des communautés fongiques s'exprimaient au niveau intraspécifique, entre les morphotypes denses et lâches des coussins de *S. acaulis*. En termes de caractéristiques abiotiques des coussins, cette différence phénotypique se caractérisait par une teneur plus élevée en C, N, et N-NH₄⁺ dans les coussins denses (Figure II.2). Au niveau interspécifique mais à l'échelle d'une plante (Annexe 3), nous avons caractérisé les communautés fongiques (toujours basé sur le séquençage massif) associées à *Dactylus glomerata* et *Bromus erecta*, en pots et conditions contrôlées. Un effet distinct sur la diversité fongique était observé. *Dactylus glomerata* est une espèce de prairie subalpine à stratégie d'exploitation des ressources alors que *Bromus erecta* est une espèce de prairie subalpine à stratégie de conservation des ressources. Enfin, dans une étude pilote sur l'utilisation de l'ADN extracellulaire à des fins de caractérisation moléculaire de la diversité en plantes, arthropodes et champignons

(Annexe2; Taberlet *et al.* 2012), nous avons échantillonné dans un vallon alpin (Roche Noire, Galibier, Hautes-Alpes) différentes communautés végétales. Les communautés fongiques associées aux pelouses à *Kobresia myosuroides* (crêtes ventées de haute altitude) et aux landes à *Vaccinium myrtillus* (limite alpin-subalpin) étaient plus similaires entre elles et se différenciaient des communautés fongiques associées aux prairies à *Carex foetida* et aux prairies à *Festuca paniculata*, elles mêmes similaires entre elles. Les communautés fongiques se différenciaient donc grossièrement entre les communautés de plantes à croissances lentes, à stratégie de conservation des ressources, de celles à croissance rapide lorsque les conditions climatiques le permettent, à stratégie d'exploitation des ressources. Ces différences éco-physiologiques s'expriment généralement par une teneur en MO plus importante dans le sol des plantes à stratégie de conservation des ressources. Dans ce cadre conceptuel, il semble que les coussins denses correspondent à un système oligotrophe mise en place par une plante tolérante au stress poussant principalement sur roche cristalline et aux plus hautes altitudes de la distribution géographique du *S. acaulis* dans les Alpes, alors que les coussins lâches sont retrouvés dans des conditions plus fertiles et pourraient correspondre au système copiotrophe. L'ensemble de ces résultats à différentes échelles d'observation de l'effet plante montre que les stratégies d'histoire de vie des plantes et les traits fonctionnels associés sont une caractéristique importante affectant les communautés microbiennes, notamment fongiques.

L'effet des traits végétaux sur la composition des communautés fongiques est donc observé à l'échelle intraspécifique, interspécifique pour des espèces individuelles et à l'échelle de la communauté végétale. La dichotomie systèmes copiotrophes/oligotrophes semble être un facteur important. Confirmer cet effet mériterait de couvrir un gradient génétique au niveau intraspécifique et interspécifique, de mesurer les traits végétaux et de voir quels sont les traits fonctionnels ou d'histoire de vie des plantes auxquels répondent les champignons.

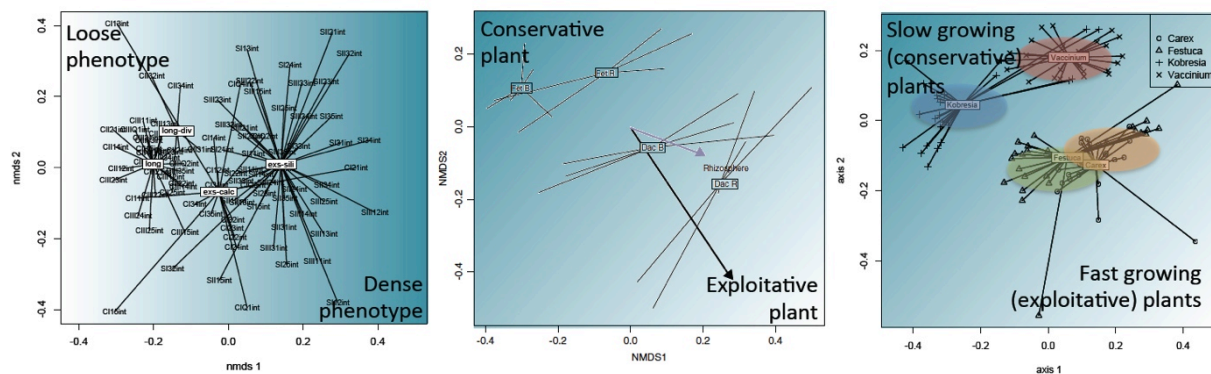


Figure V.3. Effet du couvert végétal sur la diversité taxonomique fongique à différentes échelles de l'effet plante visualisé par ordination. (gauche) Différence de composition de communautés fongiques entre des coussins au phénotype lâche et au phénotype dense, *in natura*. Source Roy *et al.* Chapitre II. (milieu) Différence de composition de communautés fongiques entre deux espèces à stratégie de conservation (*Festuca paniculata*) et d'exploitation des ressources (*Dactylis glomerata*) en pot (Mouhamadou *et al.* 2013b). (droite) Différence de composition de communautés fongiques entre des communautés végétales dominées par des plantes à croissance lente (*Vaccinium sp.*, *Kobresia myosuroides*) et à croissance rapide (*Festuca paniculata*, *Carex foetida*), *in natura*. Source Roy *et al.* unpublished.

2. Effet des plantes : singulier, similarité génétique, similarité phylogénétique ou similarité fonctionnelle ?

Certains traits fonctionnels des plantes impactant les communautés microbiennes sont identifiés (Eskelinen *et al.* 2009; Zinger *et al.* 2011b; Zinger *et al.* 2009b). De plus, à l'échelle du paysage, dans le vallon alpin de Roche Noire, il semble que plus les plantes sont proches fonctionnellement, plus leur cortège fongique est similaire en composition d'espèces (Figure V.3). L'étude la plus aboutie est une étude en pots en laboratoire ayant caractérisé les communautés bactériennes et fongiques associées à quatre espèces végétales dont deux étaient des espèces à stratégie d'exploitation des ressources et deux à stratégie de conservation des ressources. La structure des communautés était contrôlée par le type de stratégie, tout comme la réponse des communautés à la sécheresse, particulièrement pour les champignons (Bouasria *et al.* 2012). Cela suppose une règle de la similarité fonctionnelle. Selon cette règle, plus les plantes sont proches fonctionnellement, plus le cortège microbien est proche taxonomiquement. Mais cette idée tient dans le cas où les microorganismes ne sont pas limités par la dispersion, ce qui est effectivement le cas des études en pot, ou à l'échelle du paysage dans le vallon alpin de Roche Noire (Zinger *et al.* 2011b). Cependant, une dispersion limitée a été observée dans le cas des coussins de *S. acaulis* à l'échelle régionale, où un effet « site » sur la composition des communautés fongiques était important. De plus, peu de taxons

saprotrophes étaient conservés par sous-espèce de *S. acaulis*, chacune présentant pourtant un fonctionnement qui lui est propre. La règle de la similarité fonctionnelle peut donc être redéfinie de la manière suivante : plus les plantes sont proches fonctionnellement plus leur cortège microbien est similaire en fonctions effectuées. Cette redéfinition implique implicitement l'existence d'une redondance phylogénétique des fonctions chez les champignons. En effet, la règle implique que deux cousins appartenant à la même sous-espèce (avec le même type fonctionnel), mais distants géographiquement, recrutent des champignons fonctionnellement similaires bien que ces champignons puissent être taxonomiquement différents du fait d'un isolement spatial. Le couplage de la biogéographie classique (taxons) et de la biogéographie fonctionnelle (fonctions) proposé dans la partie précédente permet de tester cette redondance phylogénétique des fonctions chez les champignons.

La génétique des plantes impacte également les communautés microbiennes (Bailey *et al.* 2005), et i) plus les plantes sont proches phylogénétiquement plus leur cortège ectomycorhizien est similaire (Tedersoo *et al.* 2013) et ii) plus les plantes sont proches génétiquement plus leur cortège fongique est taxonomiquement similaire (Chapitre II). C'est la règle de la similarité génétique (Bangert *et al.* 2006). Cette règle peut être définie clairement de la manière suivante : plus les plantes sont proches génétiquement plus leur cortège microbien est similaire en composition d'espèces. Nous avons vérifié cette règle au niveau intraspécifique. L'hypothèse d'une évolution « gène-pour-gène » (Flor 1942), notamment pour les biotrophes, implique que la règle de similarité génétique se vérifie aussi au niveau interspécifique. Cependant, la question reste ouverte et il est nécessaire de tester si des effets de seuils (évolutifs) existent. La règle de la similarité phylogénétique est une extension de la règle de similarité génétique dans un contexte évolutif, avec une hypothèse de coévolution. Cette règle peut être définie clairement de la manière suivante : plus les plantes sont proches phylogénétiquement, plus leur cortège microbien est similaire en composition phylogénétique d'espèces.

En dépit de ces règles de similarité, chaque plante semble avoir un effet propre, hébergeant des espèces qui ne sont retrouvées chez aucune autre (Eisenhauer *et al.* 2010). L'importance relative de chacune des règles de similarité, et si elles sont valables malgré un « effet singulier » de chaque espèce végétale, reste à caractériser.

Chacune de ces règles aura une importance plus ou moins forte selon le mode de

vie des microorganismes, comme peut le suggérer ce travail. En effet, il semble que les champignons biotrophes soient plus intimement liés à la génétique de la plante (et donc à la phylogénie) que les saprotrophes, que ce soit pour des pathogènes potentiels (ce travail, Peay *et al.* 2013) et les ectomycorhizes (Tedersoo *et al.* 2013). Ces résultats restent à confirmer, notamment pour notre étude et celle de Peay *et al.* (2013) dans lesquelles le statut biotrophe des champignons repose sur une assignation taxonomique. Ce statut doit être vérifié *in situ* (par des observations microscopiques par exemple). La règle de la similarité fonctionnelle pourrait quant elle prédominer pour les taxons saprotrophes. Les biotrophes ne sont pas exclus de la règle de la similarité fonctionnelle ; la virulence d'un agent pathogène peut changer suivant que la plante hôte soit annuelle ou pérenne, voire longévive. Enfin, il est plus probable que l'effet singulier de chaque plante se manifeste chez les biotrophes, par une spécialisation d'hôte. L'ensemble de ces analyses permettrait d'évaluer le lien entre la composition phylogénétique d'une communauté et son fonctionnement. Les attendus théoriques concernant les règles de similarités sont présentés dans la figure V.4.

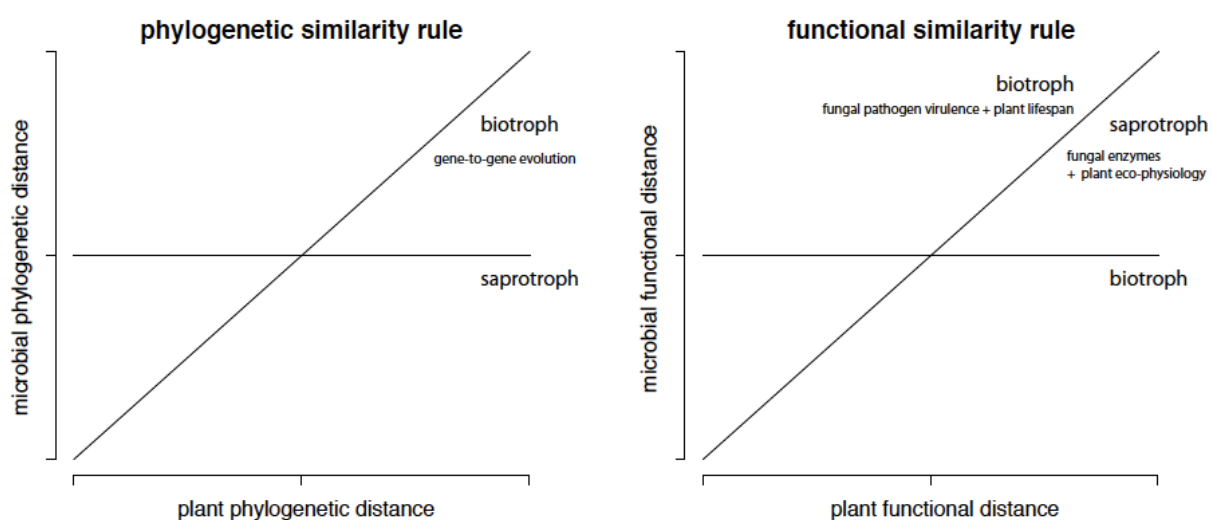


Figure V.4. Attendus théoriques concernant les règles de similarités phylogénétique et fonctionnelle entre le compartiment végétal et le compartiment microbien.

La méta-transcriptomique (ou méta-génomique) offrirait un outil adéquat pour répondre à ces questions, en accédant simultanément à la phylogénie et à la fonction des microorganismes. Il est nécessaire de monter à la fois des expériences contrôlées et de terrain, qui incluraient un panel de plantes couvrant un gradient phylogénétique et fonctionnel. Il est nécessaire de découpler le gradient fonctionnel du gradient

phylogénétique afin de séparer l'effet de chacun des facteurs. Les plantes en coussin en général, mais aussi le taxon *S. acaulis* et ses différentes sous-espèces et/ou la famille des Caryophyllaceae, pourraient être de bons systèmes, dans lesquels la diversité fonctionnelle est découplée de la diversité phylogénétique. Aubert et collègues (2014), dans leur revue sur les plantes en coussin, recensent 1309 espèces appartenant à 271 genres et 62 familles d'angiospermes, incluant des monocotylédones et des dicotylédones. Les Caryophyllaceae contiennent 165 espèces de coussins ayant une grande variété de formes, hémisphériques ou plats et compacts ou lâches. Le taxon *S. acaulis* forme un complexe de sous-espèces avec probablement une grande diversité génétique aux vues de nos résultats. Deux (ou trois ?) de ces sous-espèces ont été caractérisées dans ce travail. Elles sont proches phylogénétiquement par rapport à d'autres espèces des Caryophyllaceae et semblent être fonctionnellement différentes. A l'inverse, une espèce est phénotypiquement (fonctionnellement ?) proche des coussins denses d'*exscapa*, *Minuartia sedoides*, que l'on retrouve dans les mêmes sites/habitats (Figure V.5). En Himalaya, il existe également plusieurs coussins appartenant aux Caryophyllaceae, avec des caractéristiques morphotypiques plus ou moins similaires (e.g. *Thylacospermum caespitosum*, *Arenaria polytrichioides*). Ce ne sont que des exemples. Plusieurs systèmes seraient adéquats pour tester ces règles de similarité, bien que les coussins soient un bon système pour la microbiologie environnementale.



Figure V.5. Photos de *Minuartia sedoides* présentant un morphotype dense comme *Silene acaulis exscapa* mais plus éloigné phylogénétiquement que les sous-espèces du *S. acaulis* entre elles.

3. Vers une définition des stratégies adaptatives chez les microorganismes

La vision dichotomique des systèmes copiotrophes ou oligotrophes peut paraître simpliste mais elle est cohérente avec ce qui est observé sur le terrain et en laboratoire. C'est un bon point d'entrée pour étudier les stratégies adaptatives des plantes et des microorganismes, et s'il existe des caractéristiques communes aux deux compartiments qui interagissent dans un milieu donné. Cette dichotomie permet également de faire des parallèles dans une certaine mesure avec la théorie des stratégies écologiques r et K (Figure V.6A), qui dans notre cas correspondent respectivement aux plantes compétitrices et aux plantes tolérantes au stress abiotique (la notion de r et K est relative). Cette différence fondamentale d'écologie, son lien avec le cycle des nutriments et le fonctionnement de l'écosystème sont bien conceptualisés (Figure 0.20). Les plantes compétitrices se retrouvent dans les systèmes copiotrophes, c'est à dire des systèmes dominés par des plantes à exploitation des ressources, avec une litière facilement dégradable, et des cycles des nutriments rapides. A l'inverse, les plantes tolérantes au stress se retrouvent dans les systèmes oligotrophes, c'est à dire des systèmes dominés par des plantes à conservation des ressources ayant une litière aux composés organiques complexes, et aux cycles des nutriments lents. Les copiotrophes ont des tailles de populations qui varient fortement dans le temps en fonction de la disponibilité en ressources alors que les oligotrophes ont une faible variabilité et sont exclus compétitivement par les copiotrophes dans les environnements riches en ressources.

Bien que les traits fonctionnels végétaux structurant les communautés fongiques commencent à être identifiés (Bouasria *et al.* 2012), l'identification et la caractérisation des champignons (et des microorganismes en général) sélectionnés en sont encore aux prémices. Les résultats à ce jour ne permettent pas de faire des groupes fonctionnels fongiques. Des groupes fonctionnels correspondant à des grands groupes phylogénétiques émergent chez les bactéries dans leur réponse à la quantité et qualité de la source carbonnée (Fierer *et al.* 2007; Goldfarb *et al.* 2011) mais cela change selon les traits étudiés (Evans & Wallenstein 2014; Philippot *et al.* 2009).

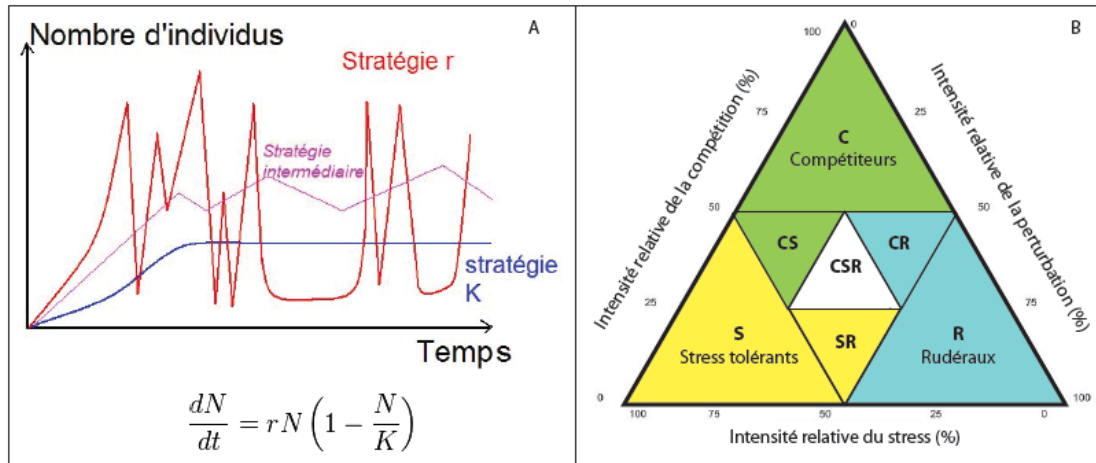


Figure V.6. Représentation conceptuelle des stratégies écologiques. (A) le modèle r et K et l'équation du taux de croissance des populations rattaché au modèle r/K et (B) le modèle CSR. Le modèle r/K a d'abord été développé pour décrire les traits de vies liés à la reproduction selon l'environnement. La stratégie r est basée sur la production précoce d'un grand nombre de descendants, et une mortalité élevée. C'est une adaptation aux milieux instables et imprévisibles. La stratégie K est basée sur une durée de vie longue, et la production tardive de peu de descendants. Ces stratégies sont toujours relatives. Une espèce pionnière sera r par rapport à une espèce de succession tardive très compétitive dans l'utilisation des ressources mais ayant une mauvaise capacité de dispersion, K . Tout autant, une espèce compétitive, à forte croissance exploitant les ressources du milieu sera r par rapport à une espèce à croissance lente, avec une longue durée de vie et tolérante au stress, K . Cette dernière description peut être remplacée par les notions de copiotrophe et oligotrophe respectivement. Cette dénomination r et K est un parallèle à l'équation du taux de croissance d'une population en fonction de l'environnement. N est l'effectif de la population, r son taux de croissance et K l'effectif de population que l'environnement peut soutenir. Si N est plus petit que K , la population croît, si N est plus grand elle décroît. L'important est de considérer K variable ou non. Lorsque K est variable les populations sont sélectionnées pour une stratégie r , c'est à dire à forte croissance quand les conditions environnementales le permettent (K élevé). Lorsque K est stable, les populations sont sélectionnées pour une adaptation à une variable dont la valeur est fixe, et seront à croissance lente avec un effectif qui ne dépasse pas K (K étant toujours limité). Ce n'est qu'un modèle. Le modèle CSR en est un autre dans lequel les traits des espèces (ou des populations) sont dépendants de l'intensité de compétition (faible stress abiotique), de l'intensité de perturbation et de l'intensité du stress abiotique.

Cette méconnaissance des groupes fonctionnels microbiens est un problème majeur à l'incorporation de paramètres microbiens dans les modèles de processus écosystémiques. Les règles de similarités discutées ci-dessus sont un moyen d'étudier les traits de vie des microorganismes. Pour un même type de fonctionnement (e.g. oligotrophes) mais transposé à différents systèmes (e.g. coussins denses de *S. acaulis excapa*, pelouse à *Kobresia myosuroides*), retrouve-t-on i) les mêmes espèces, ii) les espèces appartenant à un même clade, ou encore iii) des espèces de clades différents mais possédant des fonctions similaires? Dans cette thèse nous montrons un effet plante qui agit à différentes échelles. Les communautés associées aux deux taxons végétaux étaient mieux différenciées à une résolution phylogénétique fine et des espèces proches phylogénétiquement sont associées à un morphotype végétal ou à l'autre, ce qui tend à exclure le point i en accord avec l'hypothèse de singularité de l'effet plante (Eisenhauer *et al.* 2010). Les points ii et iii restent à étudier. Cette étude peut se faire

sous l'angle des règles de similarités évoquées ci-dessus. Ce travail a montré que les Basidiomycètes étaient plus abondants dans les coussins qu'à l'extérieur, soutenant que pour des systèmes similaires (coussins, sol de pelouses d'altitude) les communautés sont similaires au moins en composition à un haut rang phylogénétique, pouvant refléter des fonctions similaires ou des niches similaires. Une approche de méta-transcriptomique permettrait de répondre à ces questions.

Le challenge est de caractériser les traits de vie des microorganismes du sol. Dans un premier temps, la définition des stratégies écologiques copiotrophes et oligotrophes (Fierer *et al.* 2007) offre un cadre conceptuel cohérent avec l'écologie végétale, et robuste aux vues des résultats concernant les liens plantes-microorganismes. La classification des bactéries selon ces deux stratégies par Fierer et al. ne s'appliquait cependant pas à certains phylums ni certaines classes (Fierer *et al.* 2007). D'autres modèles ont été proposés pour définir des stratégies écologiques. Grime et collègues proposent le modèle CSR (Figure V.6B) où il définit des organismes (des plantes en l'occurrence) compétiteurs (C), pionniers (R, pour rudéral), ou tolérants au stress (S) (Gottlieb *et al.* 1988; Grime 1977). Ce modèle appliqué aux successions peut facilement être transposé en microbiologie, que ce soit sur le terrain par la caractérisation des habitats et de la distribution spatiale d'organismes dans un milieu hétérogène, ou en expérimentation, par la caractérisation des réponses des organismes suite à des changements de conditions environnementales.

Nous nous sommes nous mêmes attardés à définir des habitats préférés et des stratégies écologiques chez les microorganismes dans cette thèse. En plus du travail sur la microbiologie des plantes en coussins, nous avons caractérisé les communautés bactériennes rhizosphériques de *Phragmites australis* (roseau) à différentes concentrations en polluants de l'eau. Basé sur la réponse de différents clades aux différentes concentrations en polluants (abondance relative du gène de l'ARNr 16S du taxon dans la communauté), nous avons défini des bactéries opportunistes, tolérantes et sensibles, à la résolution phylogénétiques des MOTUs à 97% (Annexe 4). De la même manière (basé sur des changements d'abondance en fonction des conditions expérimentales), Evans et collègues définissent des bactéries opportunistes, tolérantes et sensibles dans une expérience d'assèchement/humidification de sols au préalable soumis ou non à une première variation d'humidité (Evans & Wallenstein 2014). Ils montrent que la proportion de chaque stratégie dans la communauté change suivant

que les sols aient au préalable été soumis à un assèchement ou non. Cette différence de proportion de telle ou telle stratégie dans les deux conditions environnementales est principalement due à des changements de composition des communautés mais également à des clades/taxons qui changent de stratégies après avoir subi le stress (plasticité).

L'approche moléculaire par séquençage massif d'amplicons permet une caractérisation des stratégies, ou du moins de caractéristiques écologiques propres à chaque taxon. En se basant sur les patrons de distributions et des réponses à différentes conditions environnementales, il apparaît que certains taxons sont généralistes et d'autres spécialistes, tolérants, opportunistes, sensibles ou encore copiotrophes ou oligotrophes. Ces analyses sont simples (basées sur la relation entre la distribution du taxon et des variables environnementales ou d'habitat) et permettent une première caractérisation rapide de l'écologie des microorganismes. Les patrons doivent être interprétés avec prudence. Par exemple, un organisme spécialiste d'une ressource largement distribuée sera retrouvé partout. Egalement, nous soulevions dans le Chapitre IV une covariation entre la conservation des traits dans la phylogénie et la hiérarchie des facteurs écologiques testées. La résolution phylogénétique et la finesse des filtres écologiques sont à prendre en compte.

La cohérence phylogénétique à laquelle ce cadre de travail des stratégies peut être appliqué reste à définir pour les champignons, mais aussi pour les bactéries, et des études comme celles listées sont nécessaires, en jouant avec i) les résolutions taxonomiques/phylogénétiques, soit via l'information taxonomique, soit via le seuil de similarité pour former les MOTUs et ii) avec les type de stratégies étudiées ainsi que la finesse de la définition des niches écologique (e.g sol, sol de plante,...).

Les communautés microbiennes semblent corrélées aux traits fonctionnels des plantes. Il serait possible que les caractéristiques fonctionnelles du compartiment microbien reflètent celles du couvert végétal. Les règles de similarité sont un cadre de travail simple pour mieux comprendre les interactions plantes-microorganismes, à la fois à échelle locale et globale. Ces règles sont à même de caractériser le lien entre composition et fonctionnement des communautés dans un contexte biogéographique. Par l'identification phylogénétique des microorganismes présents le long des gradients phylogénétiques et fonctionnels du couvert végétal, et par la caractérisation fonctionnelle de ces communautés microbiennes, il sera d'autant plus possible d'aller vers une définition des niches et des stratégies écologiques chez les microorganismes.

IV. Séquençage massif : apports, limites et perspectives

1. Apports du séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques

Le séquençage massif d'amplicons à large échelle est un outil puissant pour une description rapide de la diversité microbienne et des facteurs qui contrôlent l'assemblage des communautés. Par des expérimentations pilotes, cette approche permet de cibler des clades/taxons d'importance écologique sur lesquels pousser les efforts de caractérisation de la diversité. Son utilisation s'est étendue à l'étude des macroorganismes (Annexe 2, Taberlet *et al.* 2012). Les données issues du séquençage massif d'amplicons portent une grande quantité d'informations. Les communautés sont caractérisées beaucoup plus en profondeur qu'avec les techniques d'empreintes moléculaires (Figure V.7) permettant maintenant d'apporter des éléments de réponses à certaines questions en écologie. Par exemple, le changement de composition des communautés le long de gradients environnementaux est apprécié de manière plus précise. Plus important, il est possible d'identifier les organismes impliqués dans ces patrons et ainsi de mettre en évidence des préférences d'habitat ou des réponses spécifiques à certains taxons le long de gradients environnementaux. Ces deux points sont renforcés par la possibilité d'assigner les séquences à un taxon, accédant ainsi à l'identité des taxons et à la composition taxonomique/phylogénétique des communautés. La possibilité de jouer avec les profondeurs taxonomiques pour étudier la diversité microbienne est très prometteuse pour déceler les résolutions auxquelles des patrons de beta diversité émergent et ainsi lier les cohérences écologiques à une résolution phylogénétique. Par exemple, des hypothèses de spéciation *in situ* sont soulevées comme mécanisme impliqué dans l'assemblage des communautés fongiques suite à l'observation de MOTUs proches taxonomiquement (et en similarité de séquences) ayant des préférences d'habitat contrastées mais les écosystèmes alpins de falaises sont fortement dominés par les Ascomycètes. Le coût du séquençage est de plus en plus accessible et il y a un réel gain de temps dans le traitement des données, comparé aux techniques d'empreintes moléculaires pour lesquelles chaque profil est traité à la main.

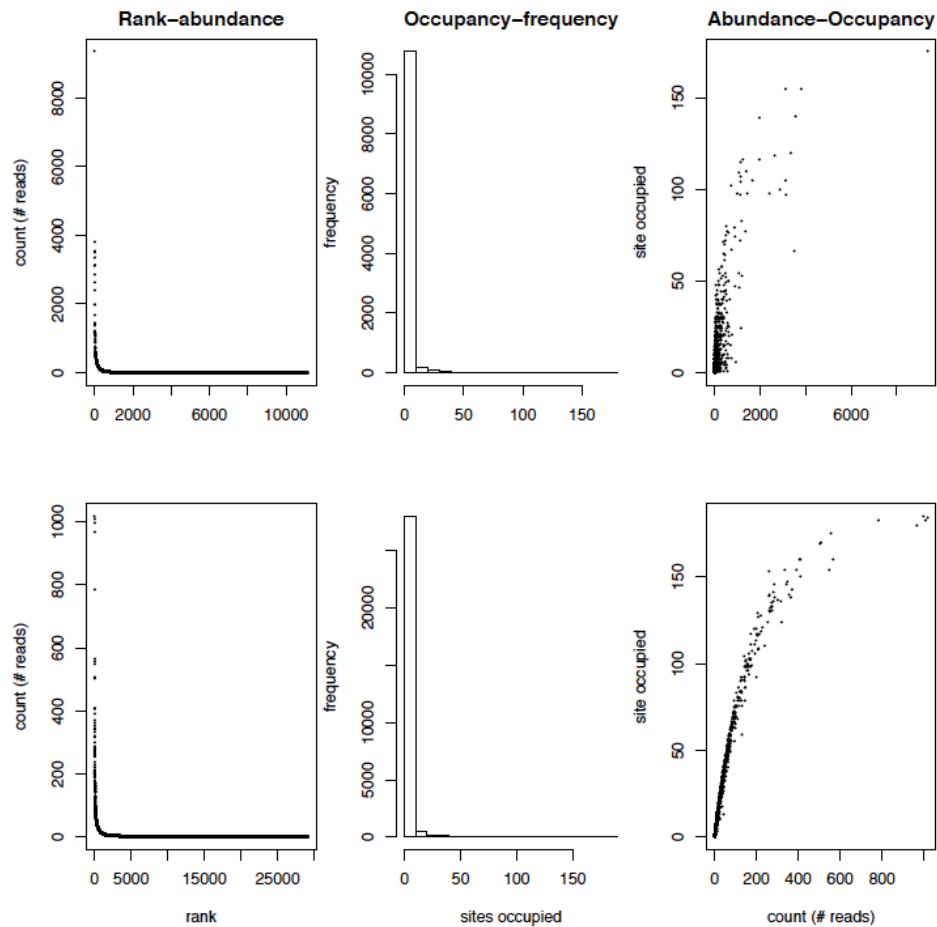


Figure V.7. Structure des communautés fongiques (haut) et bactériennes (bas) caractérisée par séquençage massif Illumina d'amplicons de l'ITS1 et la région V3-V4 de l'ARNr 16S. Gauche : relation rang-abondance. Milieu : distribution des occupations. Droite : relation abondance-occupation. Ce type d'information n'est accessible qu'avec le séquençage massif de marqueurs moléculaires.

Si le marqueur moléculaire le permet il est possible d'établir des phylogénies. C'est le cas pour les régions de l'ARNr 16S conservé phylogénétiquement. Il est alors possible d'utiliser des mesures de dissimilarité entre communautés non plus basée sur le simple partage d'espèces (e.g. Bray-Curtis) mais qui prennent en compte si les espèces qui ne sont pas partagées sont proches ou non dans la phylogénie (distance Unifrac, Lozupone & Knight 2005). Egalement, l'information contenue dans la structure phylogénétique des communautés permet de préciser l'importance relative de différents processus impliqués dans l'assemblage des communautés. Si l'hypothèse du conservatisme de niche (les organismes proches phylogénétiquement ont des caractéristiques écologiques similaires) est vérifiée, le patron d'une communauté composée d'organismes proches phylogénétiquement (clustering phylogénétique) serait le résultat d'une pression exercée sur un trait commun par un facteur entraînant un

filtre environnemental. Une communauté composée d'organismes distants phylogénétiquement (surdispersion phylogénétique) serait le résultat de la compétition entre organismes proches dont certains moins compétiteurs ont été exclus (Vamosi *et al.* 2009; Webb *et al.* 2002).

2. Limites du séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques

Nous avons donc pu identifier « qui est là » et nous avons essayé de dire « pourquoi ils sont là ». Ce dernier point reste encore spéculatif car il est basé sur des analyses corrélatives, par exemple tel MOTU est retrouvé à des pH acides et sur sol nu ou ce MOTU est assigné à un champignon pathogène et c'est pour ça qu'il est associé aux coussins. Encore plus spéculatif pour le moment, il est très difficile de dire « qu'est-ce qu'ils font ». Nous avons essayé de le faire avec le cas par exemple d'organismes précédemment décrits comme pathogènes, saprotrophes ou mutualistes. Cependant, l'assignation taxonomique des MOTUs n'est pas toujours fiable et, sans mesure physiologique ni contenu en gènes fonctionnels, il est impossible de savoir le rôle et la fonction d'un organisme. De plus le statut d'un organisme peut changer suivant les conditions environnementales comme dans le cas de mycorhizes agissant plutôt comme des parasites de plantes ou ayant des activités métaboliques variables.

L'identification taxonomique reste limitée par la pauvreté des bases de données. Dans notre travail, jusqu'à 25% des séquences uniques totales n'étaient pas assignées à un taxon, à un seuil pourtant bas de 80% d'identité. 80% d'identité pour un fragment de 250 bp admet 50 bp d'erreur. Des efforts de culture et de barcoding des organismes isolés, incluant ceux contenus dans les herbiers, sont donc essentiels pour améliorer les assignations taxonomiques. L'analyse des génomes des organismes mis en culture permettre également de définir certaines fonctions effectuées par l'organisme.

Les biais inhérents à chaque étape, de l'échantillonnage aux erreurs de séquençage en passant par l'extraction de l'ADN et les biais de PCR questionnent à la fois l'estimation d'une richesse ainsi que la fiabilité d'utiliser le nombre de lectures comme proxy de l'abondance des taxons. Il est essentiel de faire des répliquats techniques et biologiques. Bien que des doutes soient émis, nous avons pu mettre en évidence des patrons cohérents à la fois dans les analyses de richesse, et dans le changement d'abondance de MOTUs en fonctions de l'habitat. L'approche phylogénie des communautés n'est pas possible avec des marqueurs très polymorphiques (cas de l'ITS).

De plus, l'interprétation des patrons dépend de la conservation ou non des traits dans la phylogénie alors que l'hypothèse du conservatisme de niche n'est pas encore démontrée.

3. Perspectives pour le séquençage massif d'amplicons de marqueurs moléculaires taxonomiques

Des approches par séquençage non dirigé, sans PCR, sont prometteuses et permettraient d'avoir une meilleure estimation de l'abondance des organismes. Cependant, le nombre de copie du marqueur moléculaire peut changer d'un taxon à l'autre, posant toujours la question de la fiabilité des données d'abondance. Une perspective intéressante pour le séquençage massif d'amplicons est que la réponse d'un taxon aux conditions environnementales peut être interprétée comme un trait d'histoire de vie (Figure V.8). Cela ouvre des perspectives pour caractériser les niches écologiques des organismes et pouvoir par la suite lier phylogénie et fonctions/niches écologiques. Cette approche peut se faire sur le terrain ou en conditions contrôlées.

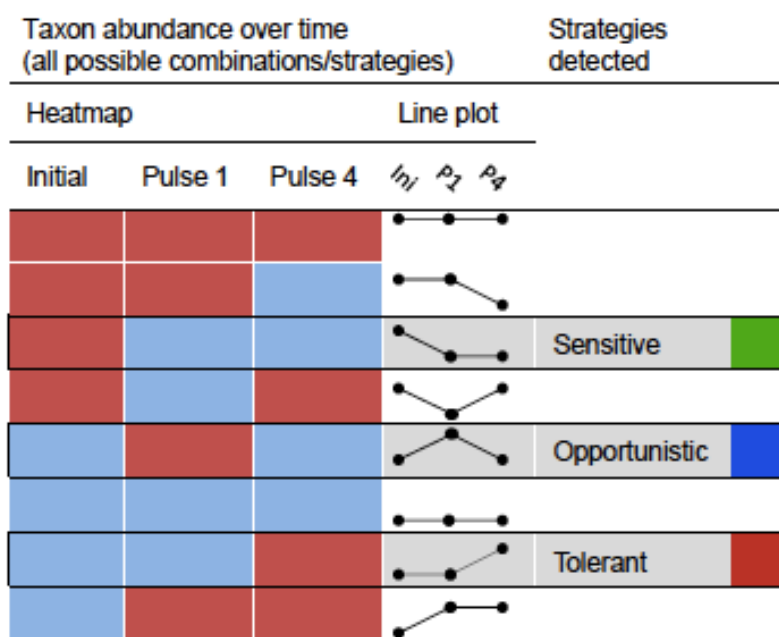


Figure V.8. Exemple de stratégies définies à partir de données de distribution de taxons. Suivant le dispositif expérimental (sur le terrain ou en laboratoire), les données d'abondances ou de probabilités de présence peuvent être utilisées. Cette figure montre le potentiel pour définir des stratégies écologiques, ou du moins des caractéristiques écologiques, à partir de données de distribution facilement générées et analysées par les approches moléculaires couplées au séquençage massif (type metabarcoding). Suivant le marqueur moléculaire suivi, il est possible de voir si le trait ou la stratégie sont conservés dans la phylogénie. *Source Evans & Wallenstein 2014.*

4. Accéder à la fonction des communautés microbiennes

Dans une perspective fonctionnelle et non plus seulement de description des patrons de diversité, la question n'est pas simplement de savoir « qui est là ? », mais « pourquoi ils sont là ? » et « qu'est ce qu'ils font ? ». Avec le séquençage de marqueurs moléculaires phylogénétiques, des noms et des patrons sont accessibles mais pas de fonctions. Les approches méta-génomique et méta-transcriptomique offrent de grandes perspectives de recherche. Ces approches permettent i) de caractériser la composition phylogénétique (gènes ou transcrits ribosomaux), ii) d'identifier des fonctions (gènes ou transcrits messagers) par homologie à des génomes de références, iii) de découvrir de nouveaux gènes fonctionnels (intérêt biotechnologique) et iv) de reconstruire des génomes entiers d'organismes non cultivables. Ces approches permettent d'accéder à certains traits fonctionnels des microorganismes qui reflètent des stratégies écologiques/évolutives et donc leur performance ou le rôle des organismes dans l'environnement. Il serait alors possible d'avoir une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes et de l'écologie de ces organismes. Cependant, cette approche ne permet pas de lier un gène fonctionnel à un taxon. Les nouvelles techniques de séquençage cellule par cellule offrent donc, elles aussi, la perspective d'une meilleure caractérisation de la diversité microbienne et de lier la phylogénie au rôle des microorganismes dans l'environnement.

Les données de distribution par le séquençage massif d'amplicons sont un moyen d'obtenir un « trait » fonctionnel pour chaque taxon, et cela à différentes résolutions taxonomiques. Afin d'identifier les organismes présents, la part active, les fonctions exprimées, qui les expriment et les réponses physiologiques au stress, il est nécessaire et essentiel de coupler des études *in natura* à des expérimentations en milieu contrôlé, de le faire à l'échelle de la communauté mais aussi des taxons voire des individus (avec mise en culture, identification et tests physiologiques), et d'utiliser des approches couplant phylogénie et fonction telles que la métagénomique et la métatranscriptomique.

V. Richesse microbienne et ambiguïté des espèces rares

Les communautés microbiennes (bactériennes et fongiques) de falaises étaient majoritairement constituées d'espèces rares, qui ne sont retrouvées que dans un ou deux échantillons et très peu abondantes. Ces espèces rares représentent effectivement la part majoritaire de la diversité des communautés microbiennes (Sogin *et al.* 2006 ; Article II, Figure V.7) mais la question de leur réalité est ouverte.

Leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes est toujours difficile à élucider, bien que ce pool puisse être déterminant dans la résilience des écosystèmes ou n'être que le résultat d'une accumulation d'organismes par dispersion, ou des restes « fossiles » (Sogin *et al.* 2006). L'importance numéraire des espèces rares dépend de l'histoire passée du milieu et constitue un réservoir de diversité génétique et fonctionnelle (Sogin *et al.* 2006). Dans notre système d'étude, les champignons montrant des préférences d'habitat étaient des espèces abondantes. Ainsi les espèces dominantes de chaque habitat étaient relativement spécifiques de l'habitat considéré reléguant les espèces dominantes et spécifiques des autres habitats au rang de rare, suggérant que ces espèces rares constituent bien une « banque de graines » capables de se diviser une fois les conditions environnementales adéquates rencontrées (Galand *et al.* 2009). Nous avons également émis l'hypothèse d'un fort effet de facteurs aléatoires et stochastiques dans l'assemblage des communautés fongiques, notamment à l'extérieur des coussins, qui pourrait être à l'origine de cette biosphère rare. Toutefois, les espèces rares semblent obéir aux mêmes lois que les espèces abondantes, montrant les mêmes patrons biogéographiques (Galand *et al.* 2009). Récemment, il a été montré que cette rare biosphère était active (Hugoni *et al.* 2013) levant une part de l'ambiguïté. Outre le rôle qu'elle peut avoir dans les successions écologiques et les réponses aux perturbations, son activité pose la question de son importance fonctionnelle dans la communauté, à l'instar du rôle important mais longtemps négligé des espèces rares végétales dans le fonctionnement des écosystèmes et le maintien de la biodiversité (Mouillot *et al.* 2013). Toutefois, il est difficile de statuer quant à leur importance fonctionnelle dans la communauté sachant que, plus que chez les macroorganismes, les espèces abondantes sont responsables de la majeure partie du fonctionnement de l'écosystème, en accord avec la dominance des espèces fongiques spécifiques d'habitats

contrastés observée dans cette thèse. L'ambiguïté qui les entoure n'est cependant que partiellement levée, le nombre d'espèces rares variant considérablement suivant l'effort d'échantillonnage (terrain et extraction d'ADN), de PCR, ou de séquençage. En effet nous avons obtenu un nombre de MOTUs pour les bactéries (97%, >20000) et les champignons (98%, >10000) plus important que dans les autres études de séquençage massif, en lien avec l'énorme quantité de lectures d'amplicons (>4000000) (e.g. Buee *et al.* 2009 ; Lentendu *et al.* 2011). Certains auteurs ont essayé de quantifier la diversité microbienne et plusieurs estimateurs ont été développés (Hughes *et al.* 2001). Ces estimateurs de richesse se basent sur l'estimation des espèces rares totales à partir du nombre d'espèces rares observées. Aux vues du nombre de ces espèces et de la dépendance de ce nombre vis à vis de l'échantillonnage et des technologies, il paraît encore difficile de « compter l'incomptable ».

Malgré les problèmes inhérents aux études de séquençage massifs d'amplicons pour l'étude de la richesse en espèces, nous avons pu mettre en évidence des patrons de diversité basée sur la richesse en espèces, entre l'intérieur et l'extérieur des coussins, entre sous-espèces de *S. acaulis* et le long des gradients d'altitude, indépendamment des profondeurs de séquençage. Les coussins étaient composés d'espèces fongiques abondantes jamais retrouvées à l'extérieur indiquant que la communauté fongique des coussins n'est pas un sous-ensemble de la communauté extérieure. A l'inverse, les espèces bactériennes jamais retrouvées à l'extérieur étaient principalement rares, indiquant que la communauté bactérienne des coussins est probablement un sous-ensemble de la communauté extérieure. Ainsi, malgré les ambiguïtés concernant cette diversité rare, la richesse en espèces est une caractéristique des communautés microbiennes qui renseigne sur l'assemblage de ces communautés. Notamment, nous avons interprété la plus faible richesse en espèces dans les coussins par un filtre sélectif et la diminution avec l'altitude par un effet délétère sur les espèces. Les patrons sont fiables si la richesse est analysée de manière relative et non absolue.

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans l'étude de la distribution spatiale des microorganismes et des mécanismes d'assemblage des communautés, en se basant sur les approches moléculaires pour caractériser la diversité taxonomique. Il est apparu que le séquençage massif de marqueurs moléculaires était un outil puissant pour décrire la beta diversité microbienne, permettant une description détaillée de la diversité des communautés et de modéliser la distribution des taxons individuels.

Ce travail montre que les plantes agissent comme un filtre biotique qui opère à des échelles spatiales plus grandes que l'échelle micro-locale, suggérant une sélection de microorganismes d'un pool d'espèces globalement dispersés à l'échelle régionale. Elles sont un déterminant majeur de la structure des communautés bactériennes et fongiques, cet effet fondateur étant d'autant plus fort que la contrainte abiotique augmente. La réponse des communautés microbiennes aux gradients environnementaux est modifiée par la plante qui agit comme un tampon sur le contexte abiotique. La beta diversité bactérienne diffère de la beta diversité fongique car ces deux groupes microbiens ne répondent pas aux mêmes variables biotiques et abiotiques. Alors que les communautés bactériennes sont sensibles au pH du sol, les communautés fongiques sont structurées par les caractéristiques phénotypiques et génétiques de la plante hôte. Il y a une spécialisation écologique à fine résolution phylogénétique chez les champignons. La réponse des champignons aux plantes est particulièrement marquée pour les clades aux modes de vie biotrophes. Ces travaux soulèvent la nécessité i) de déterminer si les différences phylogénétiques et fonctionnelles des communautés microbiennes sont fonction de la distance phylogénétique ou fonctionnelle entre plantes, ou si chaque plante a un effet singulier, et ii) de définir de façon plus précise l'écologie des différents taxons microbiens et la cohérence écologique de la phylogénie.

Références bibliographiques

A

Achtman M, Wagner M (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology* 6, 431-440.

Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, et al. (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551-554.

Aerts R, Chapin FS (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. In: *Advances in Ecological Research*, Vol 30 (eds. Fitter AH, Raffaelli DG), pp. 1-67.

Allen EB, Allen MF, Helm DJ, et al. (1995) PATTERNS AND REGULATION OF MYCORRHIZAL PLANT AND FUNGAL DIVERSITY. *Plant and Soil* 170, 47-62.

Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19, 5555-5565.

Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32-46.

Anderson MJ, Ellingsen KE, McArdle BH (2006) Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters* 9, 683-693.

Anderson MJ, Crist TO, Chase JM, et al. (2011) Navigating the multiple meanings of beta diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters* 14, 19-28.

Anthelme F, Buendia B, Mazoyer C, Dangles O (2012) Unexpected mechanisms sustain the stress gradient hypothesis in a tropical alpine environment. *Journal of Vegetation Science* 23, 62-72.

Anthelme F, Cavieres LA, Dangles O (2014) Facilitation among plants in alpine environments in the face of climate change. *Frontiers in Plant Science* 5.

Antonsson H, Bjork RG, Molau U (2009) Nurse plant effect of the cushion plant *Silene acaulis* (L.) Jacq. in an alpine environment in the subarctic Scandes, Sweden. *Plant Ecology & Diversity* 2, 17-25.

Arfi Y, Buee M, Marchand C, Levasseur A, Record E (2012) Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 433-444.

Arroyo MTK, Cavieres LA, Penaloza A, Arroyo-Kalin MA (2003) Positive associations between the cushion plant *Azorella monantha* (Apiaceae) and alpine plant species in the Chilean Patagonian Andes. *Plant Ecology* 169, 121-129.

Aubert S, Boucher F, Lavergne S, Renaud J, Choler P (2014) 1914-2014: A revised worldwide catalogue of cushion plants 100 years after Hauri and Schroter. *Alpine Botany* 124, 59-70.

B

Baas Becking, L.G.M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stoc- kum & Zoon (in Dutch).

Baath E, Anderson TH (2003) Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 955-963.

Badano EI, Cavieres LA (2006a) Ecosystem engineering across ecosystems: do engineer species sharing common features have generalized or idiosyncratic effects on species diversity? *Journal of Biogeography* 33, 304-313.

Badano EI, Cavieres LA (2006b) Impacts of ecosystem engineers on community attributes: effects of cushion plants at different elevations of the Chilean Andes. *Diversity and Distributions* 12, 388-396.

Badano EI, Jones CG, Cavieres LA, Wright JP (2006) Assessing impacts of ecosystem engineers on community organization: a general approach illustrated by effects of a high-Andean cushion plant. *Oikos* 115, 369-385.

Badano EI, Molina-Montenegro MA, Quiroz C, Cavieres LA (2002) Effects of the cushion plant *Oreopolus glacialis* (Rubiaceae) on species richness and diversity in a high-Andean plant community of central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 75, 757-765.

Bahl J, Lau MCY, Smith GJD, et al. (2011) Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. *Nature Communications* 2.

Bahram M, Polme S, Koljalg U, Zarre S, Tedersoo L (2012) Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist* 193, 465-473.

Bailey JK, Deckert R, Schweitzer JA, et al. (2005) Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 83, 356-361.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233-266.

Bangert RK, Turek RJ, Rehill B, et al. (2006) A genetic similarity rule determines arthropod community structure. *Molecular Ecology* 15, 1379-1391.

Barberan A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *Isme Journal* 6, 343-351.

Bardgett RD, Bowman WD, Kaufmann R, Schmidt SK (2005) A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 634-641.

Bashan Y, Salazar BG, Moreno M, Lopez BR, Linderman RG (2012) Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management* 102, 26-36.

Becklin KM, Hertweck KL, Jumpponen A (2012) Host Identity Impacts Rhizosphere Fungal Communities Associated with Three Alpine Plant Species. *Microbial Ecology* 63, 682-693.

Beijerinck, M.W. (1913) *De infusies en de ontdekking der bacteriën*. Jaarboek van de Koninklijke Akademie voor Wetenschappen. Amsterdam, the Netherlands: Müller. (Reprinted in *Verzamelde geschriften van M.W. Beijerinck*, vijfde deel, pp. 119-140. Delft, 1921).

Bell G (2001) Ecology - Neutral macroecology. *Science* 293, 2413-2418.

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Bmc Microbiology* 10.

Benjamini Y, Hochberg Y (2000) On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 25, 60-83.

Benoist R (1935) *Le Plantago rigida* H.B.K., sa structure, sa biologie. . *Bull. Soc. Bot. France* 82, 462-466, 604-609.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53-59.

Berbee ML (2001) The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59, 165-187.

Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 1-13.

Bertness MD, Callaway R (1994) POSITIVE INTERACTIONS IN COMMUNITIES. *Trends in Ecology & Evolution* 9, 191-193.

Binladen J, Gilbert MTP, Bollback JP, et al. (2007) The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. *Plos One* 2.

Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, et al. (2012) Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* 21, 1897-1908.

Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, et al. (2013) ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources* 13, 218-224.

Blackwell M (2011) THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES? *American Journal of Botany* 98, 426-438.

Bock C (1983) Quelques aspects de la variation infraspécifique chez le *Silene acaulis* (L.) Jacq. In: *Compt.-Rendus 108è., Congrès National Soc. Savantes, Sect. Sci., Fasc. 2* pp. 9-20, Grenoble.

Bomblies K, Lempe J, Epple P, et al. (2007) Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. *Plos Biology* 5, 1962-1972.

Bomblies K, Weigel D (2007) Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nature Reviews Genetics* 8, 382-393.

Botnen S, Vik U, Carlsen T, et al. (2014) Low host specificity of root-associated fungi at an Arctic site. *Molecular Ecology* 23, 975-985.

Bouasria A, Mustafa T, De Bello F, et al. (2012) Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. *European Journal of Soil Biology* 52, 59-66.

Bryant JA, Lamanna C, Morlon H, et al. (2008) Microbes on mountainsides: Contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11505-11511.

Buee M, Reich M, Murat C, et al. (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184, 449-456.

Busby PE, Newcombe G, Dirzo R, Whitham TG (2013) Genetic basis of pathogen community structure for foundation tree species in a common garden and in the wild. *Journal of Ecology* 101, 867-877.

C

Callaway RM, Brooker RW, Choler P, et al. (2002) Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* 417, 844-848.

Callaway RM, Howard TG, Esser K, et al. (2007) Competitive Networks, Indirect Interactions, and Allelopathy: A Microbial Viewpoint on Plant Communities. *Progress in Botany* Springer Berlin Heidelberg.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335-336.

Casanova-Katny MA, Torres-Mellado GA, Palfner G, Cavieres LA (2011) The best for the guest: high Andean nurse cushions of *Azorella madreporica* enhance arbuscular mycorrhizal status in associated plant species. *Mycorrhiza* 21, 613-622.

Cavieres L, Arroyo MTK, Penaloza A, Molina-Montenegro M, Torres C (2002) Nurse effect of *Bolax gummifera* cushion plants in the alpine vegetation of the Chilean Patagonian Andes. *Journal of Vegetation Science* 13, 547-554.

Cavieres LA, Badano EI (2009) Do facilitative interactions increase species richness at the entire community level? *Journal of Ecology* 97, 1181-1191.

Cavieres LA, Badano EI, Sierra-Almeida A, Gomez-Gonzalez S, Molina-Montenegro MA (2006) Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytologist* 169, 59-69.

Cavieres LA, Badano EI, Sierra-Almeida A, Molina-Montenegro MA (2007) Microclimatic modifications of cushion plants and their consequences for seedling survival of native and non-native herbaceous species in the high andes of central Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research* 39, 229-236.

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 69, 330-339.

Cho JC, Tiedje JM (2000) Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5448-5456.

Choler P, Michalet R, Callaway RM (2001) Facilitation and competition on gradients in alpine plant communities. *Ecology* 82, 3295-3308.

Choler P, Michalet R, Callaway RM (2001) Facilitation and competition on gradients in alpine plant communities. *Ecology* 82, 3295-3308.

Claesson MJ, Wang QO, O'Sullivan O, et al. (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38.

Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O, et al. (2013) Roots and Associated Fungi Drive Long-Term Carbon Sequestration in Boreal Forest. *Science* 339, 1615-1618.

Cohan FM (2002a) Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica* 116, 359-370.

Cohan FM (2002b) What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology* 56, 457-487.

Coince Aurore. Richesse et diversité des assemblages de champignons et d'oomycètes de hêtraies, en relation avec des facteurs climatiques et édaphiques: de la parcelle au continent. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.

Colwell RR, Clayton RA, Ortiz-Conde BA, Jacobs D, Russek-Cohen E, in *Microbial Diversity and Ecosystem Function*, D. Allsopp, R. R. Colwell, D. L. Hawksworth, Eds. (CAB International, Wallingford, UK, 1995), pp. 3-15.

Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Desprez-Loustau ML, Vacher C (2012) Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology* 5, 509-520.

Cordier T, Robin C, Capdevielle X, et al. (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist* 196, 510-519.

Costa R, Gotz M, Mrotzek N, et al. (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* 56, 236-249.

D

Davey ML, Heegaard E, Halvorsen R, Kauserud H, Ohlson M (2013) Amplicon-pyrosequencing-based detection of compositional shifts in bryophyte-associated fungal communities along an elevation gradient. *Molecular Ecology* 22, 368-383.

Davey ML, Heimdal R, Ohlson M, Kauserud H (2013b) Host- and tissue-specificity of moss-associated *Galerina* and *Mycena* determined from amplicon pyrosequencing data. *Fungal Ecology* 6, 179-186.

Dawkins R. 1982. *The Extended Phenotype: The Gene as the Unit of Selection*. Oxford (United Kingdom): Freeman Press.

de Bello F, Dolezal J, Dvorsky M, et al. (2011) Cushions of *Thylacospermum caespitosum* (Caryophyllaceae) do not facilitate other plants under extreme altitude and dry conditions in the north-west Himalayas. *Annals of Botany* 108, 567-573.

Debelmas J (1974). *Géologie de la France*. Ed Doin.

Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics* 6, 361-375.

Dighton J, White JM, Oudemans P (2005) *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. CRC, Boca Raton.

Duran-Pinedo AE, Paster B, Teles R, Frias-Lopez J (2011) Correlation Network Analysis Applied to Complex Biofilm Communities. *Plos One* 6.

Dvorsky M, Dolezal J, Kopecky M, et al. (2013) Testing the Stress-Gradient Hypothesis at the Roof of the World: Effects of the Cushion Plant *Thylacospermum caespitosum* on Species Assemblages. *Plos One* 8.

E

Eisenhauer N, Bessler H, Engels C, et al. (2010) Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology* 91, 485-496.

Eskelinen A, Stark S, Mannisto M (2009) Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* 161, 113-123.

Evans SE, Wallenstein MD (2014) Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. *Ecology Letters* 17, 155-164.

Eviner VT, Hawkes CV (2008) Embracing Variability in the Application of Plant-Soil Interactions to the Restoration of Communities and Ecosystems. *Restoration Ecology* 16, 713-729.

F

Fenchel T (2003) Biogeography for bacteria. *Science* 301, 925-926.

Fenchel T, Finlay BJ (2006) The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 361, 1965-1973.

Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364.

Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626-631.

Fierer N, Lennon JT (2011) THE GENERATION AND MAINTENANCE OF DIVERSITY IN MICROBIAL COMMUNITIES. *American Journal of Botany* 98, 439-448.

Fierer N, McCain CM, Meir P, et al. (2011) Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92, 797-804.

Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296, 1061-1063.

Finlay BJ, Esteban GF, Brown S, Fenchel T, Hoef-Emden K (2006) Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist* 157, 377-390.

Flor H.H. (1942). "Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*". *Phytopathology* 32, 653–669.

Fortunato CS, Eiler A, Herfort L, et al. (2013) Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *Isme Journal* 7, 1899-1911.

Frankland JC (1998) Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102, 1-15.

Fraser C, Alm EJ, Polz MF, Spratt BG, Hanage WP. 2009. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* 323: 741–746.

Fulthorpe RR, Roesch LFW, Riva A, Triplett EW (2008) Distantly sampled soils carry few species in common. *Isme Journal* 2, 901-910.

G

Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111, 3-49.

Gadd GM, Raven JA (2010) Geomicrobiology of Eukaryotic Microorganisms. *Geomicrobiology Journal* 27, 491-519.

Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C (2009) Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 22427-22432.

Gao C, Shi N-N, Liu Y-X, et al. (2013) Host plant genus-level diversity is the best predictor of ectomycorrhizal fungal diversity in a Chinese subtropical forest. *Molecular Ecology* 22, 3403-3414.

Garbaye J (1991) BIOLOGICAL INTERACTIONS IN THE MYCORRHIZOSPHERE. *Experientia* 47, 370-375.

Gardes M, Dahlberg A (1996) Mycorrhizal diversity in arctic and alpine tundra: An open question. *New Phytologist* 133, 147-157.

Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, et al. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *Isme Journal* 6, 298-308.

Goldfarb KC, Karaoz U, Hanson CA, et al. (2011) Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology* 2.

Gomez-Hernandez M, Williams-Linera G, Guevara R, Lodge DJ (2012) Patterns of macromycete community assemblage along an elevation gradient: options for fungal gradient and metacommunity analyse. *Biodiversity and Conservation* 21, 2247-2268.

Gottlieb L, Jain S, Grime JP (1988) The C-S-R model of primary plant strategies ,Ã origins, implications and tests. In: Plant Evolutionary Biology, pp. 371-393. Springer Netherlands.

Green J, Bohannan BJM (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. Trends in Ecology & Evolution 21, 501-507.

Green JL, Holmes AJ, Westoby M, et al. (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. Nature 432, 747-750.

Grime JP (1977) EVIDENCE FOR EXISTENCE OF THREE PRIMARY STRATEGIES IN PLANTS AND ITS RELEVANCE TO ECOLOGICAL AND EVOLUTIONARY THEORY. American Naturalist 111, 1169-1194.

Grime JP (1998) Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. Journal of Ecology 86, 902-910.

Gueidan C, Villasenor CR, de Hoog GS, et al. (2008) A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. Studies in Mycology 61, 111-119.

Gury J, Zinger L, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (2008) Exonuclease activity of proofreading DNA polymerases is at the origin of artifacts in molecular profiling studies. Electrophoresis 29, 2437-2444.

H

Hanage WP, Fraser C, Spratt BG (2005) Fuzzy species among recombinogenic bacteria. BMC Biology 3.

Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH (2012) Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. Nature Reviews Microbiology 10, 497-506.

Haselwandter K (1987) MYCORRHIZAL INFECTION AND ITS POSSIBLE ECOLOGICAL SIGNIFICANCE IN CLIMATICALLY AND NUTRITIONALLY STRESSED ALPINE PLANT-COMMUNITIES. Angewandte Botanik 61, 107-114.

Hawksworth , D. L. 1991 . The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. Mycological Research 95, 641-655.

Heilborn (1925) Contributions to the ecology of the Ecuadorian pa´ramos with special reference to cushion-plants and osmotic pressure. Sven. Bot.Tidskr. 19, 153-170.

Hersch-Green EI, Turley NE, Johnson MTJ (2011) Community genetics: what have we accomplished and where should we be going? Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 366, 1453-1460.

Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb DLG 98:59–78

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, et al. (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. Ecology Letters 13, 394-407.

Hogberg MN, Hogberg P, Myrold DD (2007) Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? Oecologia 150, 590-601.

Hooper DU, Bignell DE, Brown VK, et al. (2000) Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, mechanisms, and feedbacks. Bioscience 50, 1049-1061.

Hovatter SR, DeJelo C, Case AL, Blackwood CB (2011) Metacommunity organization of soil microorganisms depends on habitat defined by presence of *Lobelia siphilitica* plants. Ecology 92, 57-65.

Hubbell S (2001) The Unified Neutral Theory of Biodiversity Princeton(NJ):Princeton University press.

Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. Applied and Environmental Microbiology 67, 4399-4406.

Hugo EA, McGeoch MA, Marshall DJ, Chown SL (2004) Fine scale variation in microarthropod communities inhabiting the keystone species *Azorella selago* on Marion Island. Polar Biology 27, 466-473.

Hugoni M, Taib N, Debroas D, et al. (2013) Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 6004-6009.

Hutchinson GE (1961) THE PARADOX OF THE PLANKTON. American Naturalist 95, 137-145.

I

Ispolatov I, Doebeli M (2009) SPECIATION DUE TO HYBRID NECROSIS IN PLANT-PATHOGEN MODELS. Evolution 63, 3076-3084.

J

James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443, 818-822.

Janos DP, Scott J, Aristizabal C, Bowman DMJS (2013) Arbuscular-Mycorrhizal Networks Inhibit *Eucalyptus tetrodonta* Seedlings in Rain Forest Soil Microcosms. *Plos One* 8.

Johnson JL (1986) Nucleic acids in bacterial classification, p. 972–975. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, N. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, et al. (2007) Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14401-14405.

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.

Jost L (2007) Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* 88, 2427-2439.

K

Katz LA, McManus GB, Snoeyenbos-West OLO, et al. (2005) Reframing the 'Everything is everywhere' debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquatic Microbial Ecology* 41, 55-65.

Kennedy PG, Smith DP, Horton TR, Molina RJ (2012) ARBUTUS MENZIESII (ERICACEAE) FACILITATES REGENERATION DYNAMICS IN MIXED EVERGREEN FORESTS BY PROMOTING MYCORRHIZAL FUNGAL DIVERSITY AND HOST CONNECTIVITY. *American Journal of Botany* 99, 1691-1701.

King AJ, Freeman KR, McCormick KF, et al. (2010) Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nature Communications* 1.

Körner C (2003) *Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, second edition edn. Springer, Berlin.

Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W, Klinkhamer PGL, van Veen JA (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 509-520.

Kumar PS, Brooker MR, Dowd SE, Camerlengo T (2011) Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. *Plos One* 6.

L

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111-5120.

Lazzaro A, Abegg C, Zeyer J (2009) Bacterial community structure of glacier forefields on siliceous and calcareous bedrock. *European Journal of Soil Science* 60, 860-870.

Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T (2007) Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* 61, 15-26.

Legendre P, Anderson MJ (1999) Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69, 1-24.

Legendre P, Borcard D, Peres-Neto PR (2005) Analyzing beta diversity: Partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs* 75, 435-450.

Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology* Elsevier science, Amsterdam.

Leibold MA, Holyoak M, Mouquet N, et al. (2004) The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters* 7, 601-613.

Lennon JT, Aanderud ZT, Lehmkuhl BK, Schoolmaster DR (2012) Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. *Ecology* 93, 1867-1879.

Lennon JT, Jones SE (2011) Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology* 9, 119-130.

Lentendu G, Zinger L, Manel S, et al. (2011) Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. *Fungal Diversity* 49, 113-123.

Liancourt P, Tielborger K (2011) Ecotypic differentiation determines the outcome of positive interactions in a dryland annual plant species. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 13, 259-264.

Linnaeus C (1781) On the increase of the habitable earth. *Amoenitates Academicae* 2:17-27.

Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228-8235.

M

Maestre FT, Callaway RM, Valladares F, Lortie CJ (2009) Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97, 199-205.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.

Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, et al. (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4, 102-112.

Martiny JBH, Eisen JA, Penn K, Allison SD, Horner-Devine MC (2011) Drivers of bacterial beta-diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7850-7854.

Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R (2005) The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 589-594.

Mayr E. 1944. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. New York: Columbia Univ. Press

Mayr E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge: Belknap Press/Harvard

Meier CL, Rapp J, Bowers RM, Silman M, Fierer N (2010) Fungal growth on a common wood substrate across a tropical elevation gradient: Temperature sensitivity, community composition, and potential for above-ground decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 1083-1090.

Meng H, Li K, Nie M, et al. (2013) Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 2219-2230.

Michalet R, Brooker RW, Cavieres LA, et al. (2006) Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? *Ecology Letters* 9, 767-773.

Michalet R, Xiao S, Touzard B, et al. (2011) Phenotypic variation in nurse traits and community feedbacks define an alpine community. *Ecology Letters* 14, 433-443.

Mitchell RJ, Campbell CD, Chapman SJ, Cameron CM (2010) The ecological engineering impact of a single tree species on the soil microbial community. *Journal of Ecology* 98, 50-61.

Molenda O, Reid A, Lortie CJ (2012) The Alpine Cushion Plant *Silene acaulis* as Foundation Species: A Bug's-Eye View to Facilitation and Microclimate. *Plos One* 7.

Molina-Montenegro MA, Badano EI, Cavieres LA (2006) Cushion plants as microclimatic shelters for two ladybird beetles species in alpine zone of central Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research* 38, 224-227.

Morecroft MD, Woodward FI, Marrs RH (1992) ALTITUDINAL TRENDS IN LEAF NUTRIENT CONTENTS, LEAF SIZE AND C-13-DELTA OF *ALCHEMILLA-ALPINA*. *Functional Ecology* 6, 730-740.

Morris WF, Doak DF (1998) Life history of the long-lived gynodioecious cushion plant *Silene acaulis* (Caryophyllaceae), inferred from size-based population projection matrices. *American Journal of Botany* 85, 784-793.

Mougel C, Offre P, Ranjard L, et al. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* 170, 165-175.

Mouhamadou B, Faure M, Sage L, et al. (2013a) Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal Biology* 117, 268-274.

Mouhamadou B, Molitor C, Baptist F, et al. (2011) Differences in fungal communities associated to *Festuca paniculata* roots in subalpine grasslands. *Fungal Diversity* 47, 55-63.

Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, et al. (2013b) Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biology and Fertility of Soils* 49, 1131-1139.

Mouillot D, Bellwood DR, Baraloto C, et al. (2013) Rare Species Support Vulnerable Functions in High-Diversity Ecosystems. *Plos Biology* 11.

N

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4, 193-201.

Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E (2009) The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *Fems Microbiology Letters* 296, 97-101.

O

Odling-Smee J, Erwin DH, Palkovacs EP, Feldman MW, Laland KN (2013) NICHE CONSTRUCTION THEORY: A PRACTICAL GUIDE FOR ECOLOGISTS. *Quarterly Review of Biology* 88, 3-28.

Orr HA, Turelli M (2001) The evolution of postzygotic isolation: Accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution* 55, 1085-1094.

Orwin KH, Kirschbaum MUF, St John MG, Dickie IA (2011) Organic nutrient uptake by mycorrhizal fungi enhances ecosystem carbon storage: a model-based assessment. *Ecology Letters* 14, 493-502.

P

Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 5, 650-659.

Peay KG, Bidartondo MI, Elizabeth Arnold A (2010) Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. *New Phytologist* 185, 878-882.

Peay KG, Baraloto C, Fine PVA (2013) Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *Isme Journal* 7, 1852-1861.

Peres-Neto PR, Jackson DA (2001) How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* 129, 169-178.

Philippot L, Andersson SGE, Battin TJ, et al. (2010) The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology* 8, 523-529.

Philippot L, Bru D, Saby NPA, et al. (2009) Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology* 11, 3096-3104.

Poulenard J, Podwojewski P, Herbillon AJ (2003) Characteristics of non-allophanic andisols with hydric properties from the Ecuadorian paramos. *Geoderma* 117, 267-281.

Q

Qiu XY, Wu LY, Huang HS, et al. (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 880-887.

Queloz V, Sieber TN, Holdenrieder O, McDonald BA, Grunig CR (2011) No biogeographical pattern for a root-associated fungal species complex. *Global Ecology and Biogeography* 20, 160-169.

R

Rainey PB, Travisano M (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394, 69-72.

Ramette A, Tiedje JM (2007) Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* 53, 197-207.

Ranjard L, Brothier E, Nazaret S (2000) Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5334-5339.

Ranjard L, Lejon DPH, Mougél C, et al. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology* 5, 1111-1120.

Read DJ, Haselwandter K (1981) OBSERVATIONS ON THE MYCORRHIZAL STATUS OF SOME ALPINE PLANT-COMMUNITIES. *New Phytologist* 88, 341-352.

Reinhart KO, Royo AA, Van der Putten WH, Clay K (2005) Soil feedback and pathogen activity in *Prunus serotina* throughout its native range. *Journal of Ecology* 93, 890-898.

Rivas F, Nunez P, Jackson T, Altier N (2014) Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. *Biocontrol* 59, 99-109.

Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, et al. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 1042-1047.

Rodriguez-Echeverria S, Armas C, Piston N, Hortal S, Pugnaire FI (2013) A role for below-ground biota in plant-plant facilitation. *Journal of Ecology* 101, 1420-1428.

Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme Journal* 1, 283-290.

Rosello-Mora R, Amann R, (2001) *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39.

Rousk J, Baath E, Brookes PC, et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme Journal* 4, 1340-1351.

Roy J, Albert CH, Choler P, et al. (2013) Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology* 4.

Ryberg M, Larsson E, Molau U (2009) Ectomycorrhizal Diversity on *Dryas octopetala* and *Salix reticulata* in an Alpine Cliff Ecosystem. *Arctic Antarctic and Alpine Research* 41, 506-514.

S

Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde C (2009) Microbial Deterioration of Stone Monuments-An Updated Overview. In: *Advances in Applied Microbiology*, Vol 66 (eds. Laskin AL, Sariaslani S, Gadd G), pp. 97-139.

Schimel J, Schaeffer SM (2012) Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in Microbiology* 3.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.

Schob C, Michalet R, Cavieres LA, et al. (2014) A global analysis of bidirectional interactions in alpine plant communities shows facilitators experiencing strong reciprocal fitness costs. *New Phytologist* 202, 95-105.

Schwarzenbach K, Enkerli J, Widmer F (2007) Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. *Journal of Microbiological Methods* 68, 358-366.

Selosse MA, Dubois MP, Alvarez N (2009) Do Sebaciniales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* 113, 1062-1069.

Selosse MA, Setaro S, Glatard F, et al. (2007) Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174, 864-878.

Shahnavaz B, Zinger L, Lavergne S, Choler P, Geremia RA (2012) Phylogenetic Clustering Reveals Selective Events Driving the Turnover of Bacterial Community in Alpine Tundra Soils. *Arctic Antarctic and Alpine Research* 44, 232-238.

Sikorski J, Nevo E (2005) Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at "Evolution Canyons" I and II, Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15924-15929.

Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993) ORIGIN AND DIVERSIFICATION OF ENDOMYCORRHIZAL FUNGI AND COINCIDENCE WITH VASCULAR LAND PLANTS. *Nature* 363, 67-69.

Sklenar P (2009) Presence of cushion plants increases community diversity in the high equatorial Andes. *Flora* 204, 270-277.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12115-12120.

Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA:DNA association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol* 44, 846-49.

Stewart JE, Timmer LW, Lawrence CB, Pryor BM, Peever TL (2014) Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *Bmc Evolutionary Biology* 14.

T

Taberlet P, Prud'homme SM, Campione E, et al. (2012) Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology* 21, 1816-1820.

Talbot JM, Treseder KK (2011) ECOLOGY Dishing the dirt on carbon cycling. *Nature Climate Change* 1, 144-146.

Tedersoo L, Bahram M, Toots M, et al. (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21, 4160-4170.

Tedersoo L, Mett M, Ishida TA, Bahram M (2013) Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 199, 822-831.

Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240-245.

Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064-1066.

Treu R, Laursen GA, Stephenson SL, Landolt JC, Densmore R (1996) Mycorrhizae from Denali National Park and Preserve, Alaska. *Mycorrhiza* 6, 21-29.

Tuininga A (2005) The fungal community. Its organization and role in the ecosystem, 3rd edn. CRC, Boca Raton. Edited by in Dighton J, White JM, Oudemans P. 265-283.

U

V

Vamosi SM, Heard SB, Vamosi JC, Webb CO (2009) Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology* 18, 572-592.

Van der Gucht K, Cottenie K, Muylaert K, et al. (2007) The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20404-20409.

van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11, 296-310.

Vellend M (2010) CONCEPTUAL SYNTHESIS IN COMMUNITY ECOLOGY. *Quarterly Review of Biology* 85, 183-206.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.

W

Waldrop MP, Zak DR, Blackwood CB, Curtis CD, Tilman D (2006) Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. *Ecology Letters* 9, 1127-1135.

Walker VK, Palmer GR, Voordouw G (2006) Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1784-1792.

Wang JJ, Soininen J, Zhang Y, et al. (2011) Contrasting patterns in elevational diversity between microorganisms and macroorganisms. *Journal of Biogeography* 38, 595-603.

Wang JJ, Soininen J, Zhang Y, et al. (2012) Patterns of elevational beta diversity in micro- and macroorganisms. *Global Ecology and Biogeography* 21, 743-750.

Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, et al. (2009) Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2046-2056.

Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 475-505.

Weiss M, Selosse MA, Rexer KH, Urban A, Oberwinkler F (2004) Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108, 1003-1010.

Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301, 976-978.

Wright JP, Jones CG, Boeken B, Shachak M (2006) Predictability of ecosystem engineering effects on species richness across environmental variability and spatial scales. *Journal of Ecology* 94, 815-824.

Y

Yabuki A, Toyofuku T, Takishita K (2014) Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: an emerging concern for molecular ecology of microbial eukaryotes. *ISME*. doi:10.1038/ismej.2013.252

Yang Y, Niu Y, Cavieres LA, Sun H (2010) Positive associations between the cushion plant *Arenaria polytrichoides* (Caryophyllaceae) and other alpine plant species increase with altitude in the Sino-Himalayas. *Journal of Vegetation Science* 21, 1048-1057.

Z

Zak DR, Pregitzer KS, Burton AJ, Edwards IP, Kellner H (2011) Microbial responses to a changing environment: implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. *Fungal Ecology* 4, 386-395.

Zinger L. 2009. Variations spatio-temporelles de la microflore des sols alpins. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier.

Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, et al. (2011a) Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *Plos One* 6.

Zinger L, Boetius A, Ramette A (2014) Bacterial taxa-area and distance-decay relationships in marine environments. *Molecular Ecology* 23, 954-964.

Zinger L, Coissac E, Choler P, Geremia RA (2009a) Assessment of Microbial Communities by Graph Partitioning in a Study of Soil Fungi in Two Alpine Meadows. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5863-5870.

Zinger L, Gury J, Alibeu O, et al. (2008) CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *Journal of Microbiological Methods* 73, 209-209.

Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, et al. (2011b) Contrasting Diversity Patterns of Crenarchaeal, Bacterial and Fungal Soil Communities in an Alpine Landscape. *Plos One* 6.

Zinger L, Shahnava B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009b) Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *Isme Journal* 3, 850-859.

Annexes

Annexe 1

Thebault A, Clement JC, Ibanez S, *et al.* (2014) Nitrogen limitation and microbial diversity at the treeline. *Oikos* **123**, 729-740.

Annexe 2

Taberlet P, Prud'homme SM, Campione E, *et al.* (2012) Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology* **21**, 1816-1820.

Annexe 3

Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, *et al.* (2013b) Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biology and Fertility of Soils* **49**, 1131-1139.

Annexe 4

San Miguel A, Roy J, Gury J, *et al.* (2014) Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 4257-4266.

Annexe 1

Nitrogen limitation and microbial diversity at the treeline

Thebault A, Clement JC, Ibanez S, Roy J, Geremia R A, Pérez C A, Buttler A, Estienne Y, Lavorel S

2014, *Oikos* **123**, 729-740.

Nitrogen limitation and microbial diversity at the treeline

Aurélie Thébault, Jean-Christophe Clément, Sébastien Ibanez, Julien Roy, Roberto A. Geremia, Cecilia A. Pérez, Alexandre Buttler, Yvan Estienne and Sandra Lavorel

A. Thébault and A. Buttler, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), School of Architecture, Civil and Environmental engineering (ENAC), Laboratory of Ecological Systems, Station 2, CH-1015 Lausanne, Switzerland, and WSL Swiss Federal Res. Inst., Site Lausanne, Station 2, CH-1015 Lausanne, Switzerland. – J.-C. Clément (jean-christophe.clement@ujf-grenoble.fr), S. Ibanez, J. Roy and R. A. Geremia, Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS UMR 5553, Univ. Joseph Fourier, BP 53, FR-38041 Grenoble Cedex 9, France. – S. Lavorel and SI, WSL Swiss Federal Res. Inst., Site Bellinzona, Station 2, CH-6500 Bellinzona, Switzerland. Present address for SL: Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS 5553, Université de Savoie, 73376 Le Bourget-du-lac, France. – C. A. Pérez, Pontificia Univ. Católica de Chile, Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity, Depto de Ecología, Alameda 340, Santiago, Chile. – Y. Estienne, Azimut, route des Ecrins, FR-05120 Les Vigneaux, France.

Tree growth limitation at treeline has mainly been studied in terms of carbon limitation while effects and mechanisms of potential nitrogen (N) limitation are barely known, especially in the southern hemisphere. We investigated how soil abiotic properties and microbial community structure and composition change from lower to upper sites within three vegetation belts (*Nothofagus betuloides* and *N. pumilio* forests, and alpine vegetation) across an elevation gradient (from 0 to 650 m a.s.l.) in Cordillera Darwin, southern Patagonia. Increasing elevation was associated with a decrease in soil N-NH₄⁺ availability within the *N. pumilio* and the alpine vegetation belt. Within the alpine vegetation belt, a concurrent increase in the soil C:N ratio was associated with a shift from bacterial-dominated in lower alpine sites to fungal-dominated microbial communities in upper alpine sites. Lower forested belts (*N. betuloides*, *N. pumilio*) exhibited more complex patterns both in terms of soil properties and microbial communities. Overall, our results concur with recent findings from high-latitude and altitude ecosystems showing decreased nutrient availability with elevation, leading to fungal-dominated microbial communities. We suggest that growth limitation at treeline may result, in addition to proximal climatic parameters, from a competition between trees and soil microbial communities for limited soil inorganic N. At higher elevation, soil microbial communities could have comparably greater capacities to uptake soil N than trees, and the shift towards a fungal-dominated community would favour N immobilization over N mineralization. Though evidences of altered nutrient dynamics in tree and alpine plant tissue with increasing altitude remain needed, we contend that the measured residual low amount of inorganic N available for trees in the soil could participate to the establishment limitation. Finally, our results suggest that responses of soil microbial communities to elevation could be influenced by functional properties of forest communities for instance through variations in litter quality.

Treelines, defined here as the upper limits of altitudinal tree distribution referring to upright trees taller than 3 m (krummholz), are among the most obvious climate-driven ecological boundaries. At global scale, the narrow range of mean air temperature at treeline ($6.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$ growing season temperature) supports the hypothesis of a common global thermal threshold for forest growth at high altitude/latitude (Körner and Paulsen 2004), but the causes of treeline formation are not fully resolved. Given observed responses of latitudinal and altitudinal treelines to the increase of global temperature during the last century (Payette 2007) and the fact that organisms close to their physiological limit may be particularly susceptible to climate change (Wookey et al. 2009), an improved understanding of the environmental constraints on tree recruitment and growth at these locations is a priority for predicting future treeline shifts.

At high altitude, low temperatures impact tree physiology leading to growth-limitation (Körner and Paulsen 2004). From a global perspective, the most plausible explanations for treeline formation are the sink and source limitation hypotheses (Körner 1998). The sink (or growth) limitation hypothesis, states that despite an abundant resource supply allowing photosynthesis, low temperatures limit the rate at which carbon can be used for structural growth (Shi et al. 2008). The source hypothesis is based on the assumption that tree growth is limited by insufficient carbon assimilation by photosynthesis, which is most likely to arise from low nutrient availability, drought stress, or loss or damages of tissues responsible for carbon or nutrient acquisition and assimilation (Susiluoto et al. 2010). In the context of the source limitation hypothesis however, the role of nutrient limitation has received less

attention than the carbon-limitation hypothesis despite the fact that N and C are closely linked through net primary production and soil organic matter mineralization. At higher latitudes or elevations, cold climate, the short growing season and the poor quality of plant material combine to limit soil microbial activities, rates of litter decomposition, and soil organic matter (SOM) turnover (Loomis et al. 2006), though wintertime litter decomposition has been shown to occur depending on the snowpack characteristics (Saccone et al. 2013). Soil organic matter tends to accumulate with elevation up to the montane forest belt, and then decreases above the tree line, reaching almost zero in un-vegetated substrates of the upper alpine zone (Körner 1998). Since large amounts of N are stored in SOM, its availability, either in its organic or inorganic forms, is therefore reduced with elevation (Loomis et al. 2006).

To date, most studies have focused on documenting such patterns of limited nutrient availability and associated processes, but the need for fundamental understanding of underlying soil biotic processes has become increasingly apparent (Wookey et al. 2009, Sundqvist et al. 2011, McNown and Sullivan 2013). Above- and below-ground communities are indeed intimately linked. On one hand, soil microbiota plays a prominent role in tree nutrition and growth through its implication in SOM recycling. On the other hand, plant organic matter quality contributes to selecting specific microbial functional groups and traits, and thereby feeds back to C and N cycling (Wardle et al. 2004). Revealing how such dynamics might contribute to nutrient limitation at treelines appears therefore as a promising avenue to understand N-related treeline mechanisms (McNown and Sullivan 2013). It has been observed that microbial activities, enzymatic reactions and abundances of psychrophilic fungi vary significantly with altitude with some cold-tolerant fungi remaining physiologically active down to -10°C (Loomis et al. 2006). At the same time, changes in the physiology and productivity of dominant trees result in altered nutritional quality (e.g. decreasing N content) of plant material with increasing altitude (van de Weg et al. 2009). More specifically, in a recent study Sundqvist et al. (2011) confirmed the applicability to treelines of the positive feedback loop linking N availability, bacteria:fungi prevalence, and plant and soil nutrient cycling (Wookey et al. 2009). An increased dominance of fungi over bacteria, associated with lower soil N availability, poorer quality of plant material and indices of slower C and N cycling, were observed with increasing altitude and decreasing temperature. But, while recent studies have highlighted functional shifts within microbial communities associated with N limitation at the treeline (Sundqvist et al. 2012), little is known about associated changes in microbial community composition for bacteria and fungi, and their direct relationships to N availability in terms of quantity (available labile N) and quality (e.g. soil C:N ratio). Previous studies in alpine tundra have highlighted profound changes in microbial community composition in response to heterogeneity in snow cover (i.e. snowbeds vs wind-swept ridges), and their consequences for carbon cycling (Baptist et al. 2010, Zinger et al. 2011). However, such detailed knowledge of spatial turnover in microbial communities is not available for treelines.

One further related mechanism, which to our knowledge has not been investigated in the context of treelines (in contrast to alpine tundras), concerns the partitioning of soil N resources between plants, including trees, and soil microbial communities (van der Heijden et al. 2008). Briefly, under conditions where N is limited, and in particular in cold pristine ecosystems, plants and soil microbes compete for limited N supply so that, depending on plant strategies, local conditions, and season, labile inorganic N may be taken up either by plant or microbial growth (Harrison et al. 2008). Under limited soil N availability, such competition may be acute at treelines, and contributes, along with altered microbial functional composition and activities, to further restricting N access to trees and hence their growth.

Most of the above-cited studies investigating treeline physiological and soil-related mechanisms have been conducted in the northern hemisphere. In addition to missing detailed mechanistic insights as highlighted above, it is also not known whether current knowledge applies to the southern hemisphere. Treelines of the southern hemisphere are at least 200 m lower than expected from the treeline-temperature relationship observed in the northern hemisphere (Körner and Paulsen 2004), and have original structures. In the northern hemisphere, treelines, mostly composed of coniferous species, follow a gradual transition from closed canopy forest to small clumps of trees and lastly to scattered individuals until the tree limit is reached. By contrast, in the southern hemisphere, treelines, dominated by light-demanding species such as *Nothofagus* sp., form sharp boundaries (Körner and Paulsen 2004). At the upper limit, *Nothofagus* treelines are characterised by a krummholz growth form, i.e. above-ground morphological adaptation to harsh conditions, which has been suggested to reflect below-ground adaptation to faster nutrient cycling (Frangi et al. 2005). Northern and southern hemisphere treelines have also shown different responses to temperature increase. Over the last decade trees have established rapidly beyond the treeline in the northern hemisphere (e.g. larch treelines shifted 115 m upward between 1901 and 2000 in the western Italian Alps, Leonelli et al. 2011), but not in the southern hemisphere (reviewed by Cullen et al. 2001). For instance, in New Zealand, treeline upward shift was less than 10 m despite the temperature increase of 1°C since 1950 (Wardle and Coleman 1992). In Chile, seedlings have been found until 20 m beyond the current treeline but with a low survival rate, suggesting that the establishment of a new treeline beyond 10 m is unlikely (Cuevas 2000). Overall, these differences between northern and southern hemisphere treelines suggest that other drivers than climate alone may be at play.

In southern Patagonia, the upper range of Cordillera Darwin has never been impacted by humans and total atmospheric N deposition ranges from 1 and 5 kg N ha⁻¹ year⁻¹, which is extremely limited compared to Europe or northeastern United States (Reay et al. 2008). In such a context, the current treeline is assumed to be strictly driven by natural factors, and represents a prime model to discover key mechanisms limiting altitudinal expansion of trees. To explore potentially novel mechanisms in tree growth limitation we investigated, along an elevational gradient, the relationships between the availability of different soil N

forms, the vegetation type, and the soil microbiota composition. We hypothesized that within a given vegetation belt, upper sites experienced more stressful conditions than lower sites in terms of N availability, resulting in changed microbial communities, greater competition between trees and microbes, and ultimately slower N cycling. Specifically, we expected increasing elevation to be paralleled by a reduction in soil inorganic N content and an increase in soil C:N ratio, while fungal communities would become dominant, and microbial community composition would change drastically.

Material and methods

Field location

Sampling was carried out at the end of October 2009 (mid austral spring) in Cordillera Darwin, at the southwest of the main island (Isla Grande) of Tierra del Fuego (Chile). Cordillera Darwin is the most southern mountain range of the Andes that is covered with glaciers, with Mount Darwin culminating at 2488 m a.s.l. (Fig. 1). The Beagle Channel is the southern limit of Cordillera Darwin, with several fjords entering deep inside the mountains. All samples were collected in Bahía Pia, a fjord located at the south of Mount Darwin (54°44'30"S, 69°30'10"W). The forest in this area is free of any human activities and difficult to access because of its remoteness and the extreme weather conditions in the mountains and on the sea. To access and stay in Bahía Pia, we therefore collaborated with the French mountaineering expedition 'Un rêve de Darwin' (<www.unrevededarwin.com>).

Vegetation belts

Schematically, three vegetation belts can be distinguished in Bahía Pia, as in southern Patagonia and Tierra del Fuego in general (Aravena et al. 2002). The vegetation is dominated by the evergreen *Nothofagus betuloides* ('coihue de Magallanes' in Chilean Spanish) from sea-level to 200–300 m a.s.l. Coihue forms forests of 20–40 m high and the understory is mainly composed by mosses, *Gaultheria mucronata* and *Berberis ilicifolia* ('calafate'). Above 250–300 m a.s.l., coihue forest is replaced by the deciduous *Nothofagus pumilio* ('lenga') with smaller trees (10–20 m high) and a soil almost exclusively covered by mosses and some *Gaultheria mucronata*. The continuous lenga forest ends at 450–500 m a.s.l. and is replaced by an alpine belt. The alpine belt is more heterogeneous with respect to vegetation. Indeed, the most abundant vascular species is *Empetrum rubrum* (murtilla de Magallanes), followed by dwarf

Nothofagus pumilio (krummholz growth form) and graminoid species that could not be determined since sampling was done in early spring, when the alpine communities, as well as most of the other sites, were still snow covered. Consequently, due to the seasonal timing of the sampling, plant community composition, plant cover and aboveground biomass could not be documented.

The bedrock in Bahía Pia is made of unfractured and monolithic granite, except in moraine areas. As a consequence, the soil is not mixed with macroscopic mineral fragments and there is a sharp limit between topsoil and underlying bedrock. Within each vegetation belt, the depth of the soil varies between a few to 60 cm.

Sampling protocol

In late October 2009, 24 sites situated along four altitudinal transects were sampled in Bahía Pia for soil and microbial analyses. A transect was composed of six sampling sites distributed along the altitudinal gradient (Table 1), covering the three vegetation belts (*N. betuloides*, *N. pumilio* and alpine vegetation). Two different sites were sampled within each vegetation belt: one site at lower altitude, relative to its position on the altitudinal gradient (bet1, pum1, alp1), and one site at higher altitude (bet2, pum2, alp2; Fig. 1). Listed in order of ascending altitude, these were: 1) and 2) two sites in the *Nothofagus betuloides* forest (bet1 and bet2 respectively), 3) a site at the upper limit of the *Nothofagus pumilio* forest (pum1), 4) 10–100 m apart the former site, a site at the lower limit of the alpine environment (alp1), 5) a site in the dwarf *Nothofagus pumilio* (i.e. Krummholz form) that are in the upper part of the alpine belt (pum2), 6) 10–100 m apart from the former site, a site in the alpine communities (alp2). For each site, we sampled five soil cores (10 cm diameter) in a 5 m radius plot. Soil cores depth encompassed all the available soil profile and ranged from 2 to 60 cm depending on the site (Table 1). In total, we collected four transects × six sampling sites × five soil cores = 120 soil samples. All the sites were selected randomly inside each vegetation belt. *Nothofagus betuloides* and *N. pumilio* forests were dense in the study area, so soil cores of the bet1, bet2 and pum1 sites were 0.5–3 m. apart from the nearest tree. Concerning pum2, soil cores were sampled just underneath the trees because *N. pumilio* formed small patches (max 3 m radius) in the upper alpine belt. Both alpine communities (alp1 and alp2) were under a thick snowpack (30–100 cm) when sampled, so that their selection was completely random. Due to the harsh field conditions and strong logistic constraints; liquid nitrogen could not be used. During field work in the Darwin

Table 1. Altitudinal ranges, relative elevations and soil depths of the six vegetation belts sampled at Bahía Pia in Cordillera Darwin, Tierra del Fuego (Chile).

Environment	Altitude range of the samples (m a.s.l.)	Elevation	Range of soil cores depth (cm)	Code
<i>Nothofagus betuloides</i> forest	7–83	low	60–30	bet1
<i>Nothofagus betuloides</i> forest	200–304	high	60–10	bet2
<i>Nothofagus pumilio</i> forest	382–473	low	60–4	pum1
Dwarf <i>Nothofagus pumilio</i> cover	566–647	high	20–3	pum2
Alpine communities	356–513	low	60–5	alp1
Alpine communities	566–615	high	10–2	alp2

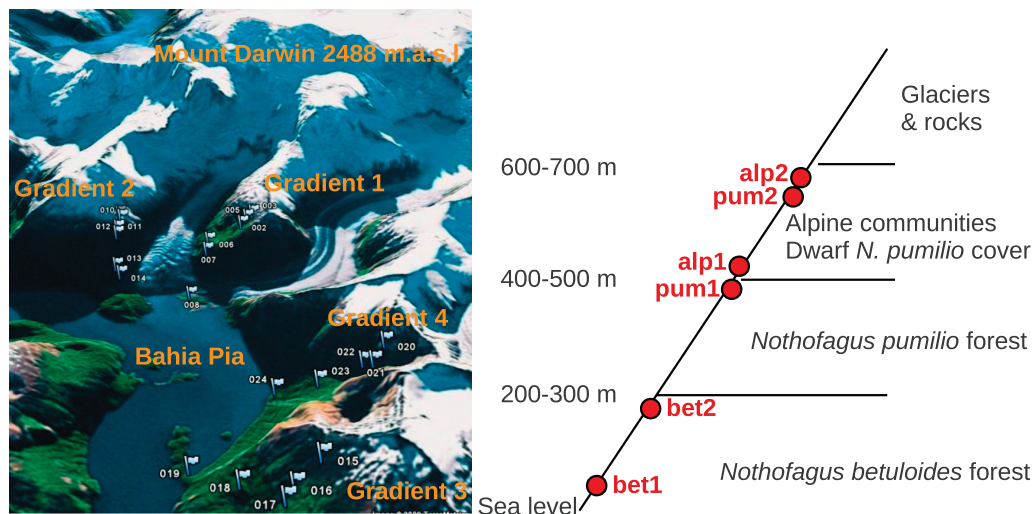


Figure 1. Map of the four transects in the Bahia Pia study area and details of the vegetation belts and their lower and higher sampling sites.

cordillera, all soil samples were sealed in hermetic plastic bags at temperature ranging between 0 and 5°C and placed in coolers. Then, during the journey back to Punta Arenas and Santiago de Chile, coolers were stored 72h on the boat with ambient temperatures ranging from 5 to 15°C, which could have affected microbial community compositions prior lab extractions.

Laboratory analyses

Soil parameters

A fraction of each of the 120 soil samples was frozen at -20°C until further molecular analysis. A composite soil sample of soil at the site scale was made by mixing the five samples of soil taken in each of the 24 sites. These 24 composite samples were sieved at 2 mm and visible root material was removed. Soil abiotic properties, namely pH and gravimetric water content, were measured on fresh soil using standard techniques (Robertson et al. 1999). Soil sub-samples were air dried, ground to a fine powder on a ball-mill, and total C and N contents were determined by a C-N analyser. Soils were mainly composed of dead organic materials which were poorly mixed with minerals from non-carbonated bedrock; as such we assume that total C is a good proxy of total organic C.

The concentration of inorganic N (NH_4^+ -N and NO_3^- -N) in each of the 24 composite soil samples was determined using distillation/titration with H_2SO_4 as described in Perez et al. (1998). Briefly, 40 ml of 0.021 mol l^{-1} $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ were added to 10 g fresh weight of field moist soil. The solution was shaken for 20 min and the suspension was filtered. Ten ml of the filtered solution with 0.3 g of MgO was steam distilled to obtain NH_4^+ -N. Nitrate in the solution was reduced to NH_3 by adding 0.7 mg of Legierung Devardas (Perez et al. 1998). Both NH_4^+ -N and NO_3^- -N contents were determined through titration with a solution 0.005 N H_2SO_4 . Total dissolved nitrogen (TDN) was measured using the persulfate digestion method (Robertson et al. 1999), which allowed calculating the amount of dissolved organic nitrogen (DON) as the difference between TDN and the sum of NO_3^- and NH_4^+ .

Microbial carbon biomass was assessed using chloroform fumigation- K_2SO_4 extraction (Robertson et al. 1999). Briefly, two fresh soil samples (10 g fresh weight) from each site were prepared. One of each paired soil samples was fumigated with CHCl_3 for one week in the dark at 25°C. After removal of the CHCl_3 , soluble C and N were extracted from fumigated and un-fumigated samples with 50 ml of a 0.5 M solution of K_2SO_4 for one hour on an orbital shaker. The filtrate was analysed for total dissolved organic C (TOC) using a TOC analyser. The microbial flush of C (difference in extractable C from fumigated and unfumigated samples) was converted to microbial biomass using a k_{EC} factor of 0.35 (Robertson et al. 1999). Extractable N was determined by oxidation of 1.5 ml of the filtrate with 4.5 ml $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and resultant NH_4^+ -N and NO_3^- -N were determined using autoanalyser procedures. The microbial flush of N was converted to microbial biomass using a k_{EN} factor of 0.18 to correct for incomplete extraction (Robertson et al. 1999). Due to transportation and storage losses, microbial nitrogen and carbon content are available in 19 and 14 sites out of 24 respectively.

Soil microbial communities (PLFA and CE-SSCP)

Shifts in soil microbial biomass and community structure across elevational gradients were assessed using the phospholipid fatty acid analysis (PLFA) technique (Bardgett and McAlister 1999) on three randomly chosen samples out of the five samples from each site. Briefly, lipids were extracted from 0.5 g of freeze dried fresh soil (Frostegård et al. 1993). Extracted fatty acid methyl-esters were identified and quantified by chromatograph retention time and mass spectral comparison on a gas chromatograph equipped with a quadrupole mass spectrometer, using standard qualitative bacterial and fungal acid methyl ester mixes ranging from C11 to C20. For each sample, the abundance of individual fatty acid methyl-esters was expressed as mg PLFA g^{-1} dry soil. The fatty acids i15:0, a15:0, 15:0, i16:0 and i17:0 were used to represent gram-positive bacteria, whereas cy17:0 and cy19:0 were used as indicators of gram-negative bacteria (Frostegård et al. 1993). The unsaturated PLFA 18:2 ω 6 and 10Me16 were used to represent fungi and

actinomycetes, respectively. Lastly, the fatty acid 20:406 was used as a marker of protozoa (Brant et al. 2006). Indicators of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and actinomycetes were summed to get quantification of bacteria in the soil. The ratio of fungal-to-bacterial PLFAs was calculated as a measure of shifts in the relative abundance of fungi and bacteria in the soil microbial community (Bardgett and McAlister 1999). We acknowledge that PLFA has disadvantages in that individual fatty acids cannot usually be used to identify species, and that samples must be well preserved and analyzed soon after sampling because profiles may change, even with storage at -70°C (Wu et al. 2009). Given the sampling and storage conditions during the present study prior extraction, these limitations may impair our results.

CE-SSCP (capillary electrophoresis – single strand conformational polymorphism) was performed as previously described (Zinger et al. 2008) on the 120 soil samples, i.e. five samples for each site. Briefly, soil DNA extractions were performed with the Power Soil DNA Isolation Kit from ca 150 mg (fresh weight) soil of each of the 120 soil samples. DNA extractions were checked by 1 % agarose gel electrophoresis and DNA concentration was quantified using NanoDrop technologies. We amplified the V3 region of bacterial 16S RNA and the fungal genes using the primers W49 (5'-ACGGTCCAGA CTCCTACGGG-3') and W104-FAM labelled (5'-TTACCG CGGCTGCTG-GCAC-3') and the fungal ITS1 (internal transcribed spacer) region by using ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAC AACG-3') (Delbes et al. 2000) and ITS2-HEX labelled (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White et al. 1990). The PCR reactions (25 μl) consisted in 2.5 mM of MgCl_2 , 1U of AmpliTaq GoldTM buffer, 20 g l^{-1} of bovine serum albumin, 0.1 mM of each dNTP, 0.26 mM of each primer, 2 U of AmpliTaqGold DNA polymerase and 10 ng of DNA template. The PCR reaction was carried out as follows: an initial step at 95°C (10 min), followed by 30 cycles at 95°C (30 s), 56°C (15 s) and 72°C (20 s), and final step at 72°C (7 min), for bacteria, and an initial step at 95°C (10 min), followed by 33 cycles at 95°C (30 s), 54°C (15 s) and 72°C (30 s), and a final step at 72°C (7 min) for fungi. All PCR products were checked by 1.6 % agarose gel electrophoresis and DNA concentration was quantified. Community molecular fingerprint were obtained by submitting amplicons of each sample to CE-SSCP on a genetic analyzer. CE-SSCP profiles corresponded to sorted single DNA strains according to their conformation, length and nucleotidic composition which fluorescence indicated abundance. CE-SSCP profiles were visually checked individually and normalized prior to statistical analysis (Geremia and Zinger 2012). It is important to keep in mind that capillary electrophoresis-single strand conformational polymorphism gives a community 'fingerprint' and not individual sequences.

Statistical analyses

All data were carried on with R ver. 2.14.1.

Univariate analyses

Differences in soil chemical and biological parameters according to vegetation belt and relative altitude were

analysed using linear mixed effects models (function 'lme' of the 'nlme' package). Vegetation belt (three levels: *N. betuloides*, *N. pumilio* and alpine belt) and relative altitude (higher *vs.* lower elevation within the belt) nested within vegetation belt were defined as fixed factors and transect was included as random factor to take into account the observational design. All soil parameters were analysed separately. To achieve the assumptions of normality, N-NH_4^+ and N-NO_3^- concentrations, soil N and C content, soil C:N ratio and biological parameter (biomass of fungi, bacteria, protozoa and actinomycetes, microbial C and N contents, microbial C:N ratio) were square-root transformed whereas soil water content, total dissolved nitrogen and dissolved organic nitrogen were log-transformed. Soil pH, soil fungi:bacteria ratio and the total amount of micro-organisms did not need transformation to achieve the assumption of normality.

Multivariate analyses

Multivariate analyses were used to get an overview of relationships between chemical and biological properties, as well as to look at the effects of soil chemical properties on fungal and bacterial communities. Since soil properties might be highly correlated, a principal component analysis (PCA) was performed to reduce the number of soil parameters (using the 'PCA' function of the 'FactoMineR' package). This PCA led to the selection of five soil parameters that were used in redundancy analyses (RDA) to analyse the effects of soil properties on bacterial and fungal communities. To test for the effect of vegetation belt and relative altitude on the microbial composition (as given by the results of PLFA analyses), and on bacterial and fungal communities (as given by the SSCP analyses), we performed redundancy analyses (using 'rda' function of the 'vegan' package) on each of the three matrices constrained by vegetation belt and relative altitude nested within vegetation belt, specifying the transect as a covariate to take into account the observational design. The effects of soil parameters on the microbial composition and on bacterial and fungal communities were analysed through redundancy analyses that constrained each of the three matrices by the PCA-selected soil parameters, specifying vegetation belt and relative altitude within vegetation belt as a covariate. Backward selections were performed on the entire model to select for the best model based on the lowest AIC. Permutation tests were used to assess the significance of these multivariate regression models. Pearson correlations were then performed to test for correlations between selected significant soil parameters and microbial composition (i.e. total microbial biomass, biomass of bacteria, protozoa and fungi, and fungi:bacteria ratio, as given by the results of PLFA analyses).

Results

Effect of vegetation belt and relative altitude on soil parameters

Soil pH, N-NO_3^- , dissolved organic nitrogen (DON) and total dissolved nitrogen (TDN), microbial C content and microbial C:N ratio did not vary significantly across

Table 2. Results of linear mixed effects model testing the effects of vegetation belt and relative altitude within vegetation belt (fixed effects) according to the transect (random effect) on soil abiotic and biotic parameters. Significant values ($p < 0.05$) are listed in bold.

Linear mixed effects models results							
	DF	F-value	p-value		DF	F-value	p-value
<u>Soil water content</u>				<u>NH₄⁺ content</u>			
Vegetation belt	2	4.021	0.040	Vegetation belt	2	3.952	0.042
Vegetation/altitude	3	0.042	0.989	Vegetation/altitude	3	4.644	0.017
Residuals	15			Residuals	15		
<u>pH</u>				<u>NO₃⁻ content</u>			
Vegetation belt	2	2.606	0.107	Vegetation belt	2	0.851	0.447
Vegetation/altitude	3	0.767	0.530	Vegetation/altitude	3	0.678	0.579
Residuals	15			Residuals	15		
<u>Soil C content</u>				<u>Dissolved organic N</u>			
Vegetation belt	2	4.601	0.028	Vegetation belt	2	1.975	0.181
Vegetation/altitude	3	0.402	0.754	Vegetation/altitude	3	1.213	0.347
Residuals	15			Residuals	12		
<u>Soil N content</u>				<u>Microbial C content</u>			
Vegetation belt	2	4.063	0.039	Vegetation belt	2	1.654	0.281
Vegetation/altitude	3	0.242	0.865	Vegetation/altitude	3	0.734	0.575
Residuals	15			Residuals	15		
<u>Soil C:N</u>				<u>Microbial N content</u>			
Vegetation belt	2	7.729	0.005	Vegetation belt	2	4.297	0.045
Vegetation/altitude	3	8.999	0.001	Vegetation/altitude	3	0.235	0.87
Residuals	15			Residuals	10		
<u>Total dissolved N</u>				<u>Microbial C:N ratio</u>			
Vegetation belt	2	2.465	0.119	Vegetation belt	2	1.04	0.419
Vegetation/altitude	3	1.424	0.275	Vegetation/altitude	3	1.025	0.456
Residuals	15			Residuals	5		

vegetation belts or between altitudes within vegetation belt (Table 2, Fig. 2). Within forest, soil water content, soil total N, soil total C and microbial N contents were higher under *Nothofagus pumilio* than under *N. betuloides*, though there was no significant difference

between either of these and alpine vegetation. NH₄⁺ content was higher in *N. pumilio* forests than in the alpine belt (Table 2, Fig. 2). Within each belt, NH₄⁺ content was overall significantly lower at higher altitude (Table 2) although it was not statistically significant

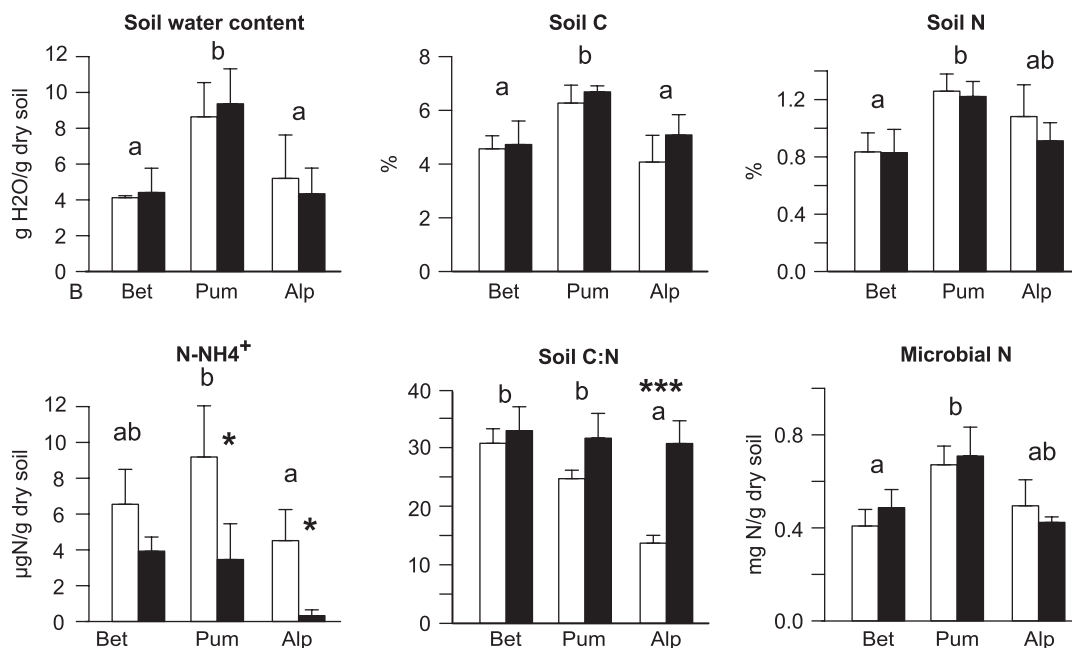


Figure 2. Means (± SE) of soil chemical parameters according to vegetation belt type (*Nothofagus betuloides* “Bet”, *Nothofagus pumilio* “Pum” and alpine vegetation “Alp”) and elevation (lower (white) versus higher (black) elevation). Significant differences between vegetation belts are indicated with different letters (according to Tukey post hoc tests) and significant differences between elevation within vegetation belts are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

within *N. betuloides* forests (Fig. 2). Lastly, soil C:N ratios were affected both by vegetation belt and relative altitude within vegetation belt overall (Table 2). First, despite significant differences between the three vegetation belts in soil C:N ratios at lower altitudes, this pattern was not observed for the higher altitudes where soil C:N ratios reached 30 in all vegetation types. Second, soil C:N ratios were significantly higher at upper altitude under alpine vegetation, whereas there was no significant difference between lower and higher elevation under *N. pumilio* and *N. betuloides* forests.

Effect of vegetation belt, altitude and soil parameters on soil biota abundance and composition

Total soil microbial biomass did not significantly differ between vegetation belts or relative altitudes (Fig. 3a), probably because neither protozoa, nor bacteria or fungi biomass differed consistently between vegetation belts and relative altitude within vegetation belts (Fig. 3b–d). However, upper sites of alpine vegetation had significantly lower bacterial biomass than alpine sites at lower elevation (Fig. 3b), and biomass of protozoa was significantly higher at higher elevation in *N. pumilio* forests (Fig. 3c). The fungi:bacteria ratio was similar across vegetation belts ($F_{2,14} = 0.336$, $p = 0.720$), but within each vegetation belt

the fungi:bacteria ratio was higher at higher altitude ($F_{3,14} = 3.541$, $p = 0.043$), and this was particularly noticeable in alpine sites (Fig. 3e). Regardless of vegetation belt, bacteria dominated over fungi at lower altitude (fungi:bacteria < 1) whereas fungi dominated at higher elevation (fungi:bacteria > 1).

The principal component analysis on soil chemical and biological parameters (Supplementary material Appendix 1 Fig. A1) showed that both microbial N and microbial C contents were strongly correlated to soil N contents ($t_{1,17} = 5.540$, $p < 0.001$ and $t_{1,12} = 5.235$, $p < 0.001$ respectively), soil C contents ($t_{1,17} = 4.689$, $p < 0.001$ and $t_{1,12} = 5.881$, $p < 0.001$ resp.) and soil water contents ($t_{1,17} = 6.701$, $p < 0.001$ and $t_{1,12} = 5.541$, $p < 0.001$ resp.), but not with soil C:N ratios ($t_{1,17} = -0.658$, $p = 0.519$ and $t_{1,12} = -0.186$, $p = 0.856$ resp.). Microbial N contents were also correlated to soil total dissolved N ($t_{1,17} = 2.199$, $p = 0.042$) and soil NO_3^- contents ($t_{1,17} = 2.162$, $p = 0.044$). According to these correlation patterns soil parameters were reduced to pH, NH_4^+ content, total dissolved N content (TDN), soil N content and soil C:N ratio, for further explanatory analyses of variations in microbial communities linked to soil properties as assessed by redundancy analyses.

The soil community functional structure, as reflected by PLFA, was neither affected by the vegetation belt nor

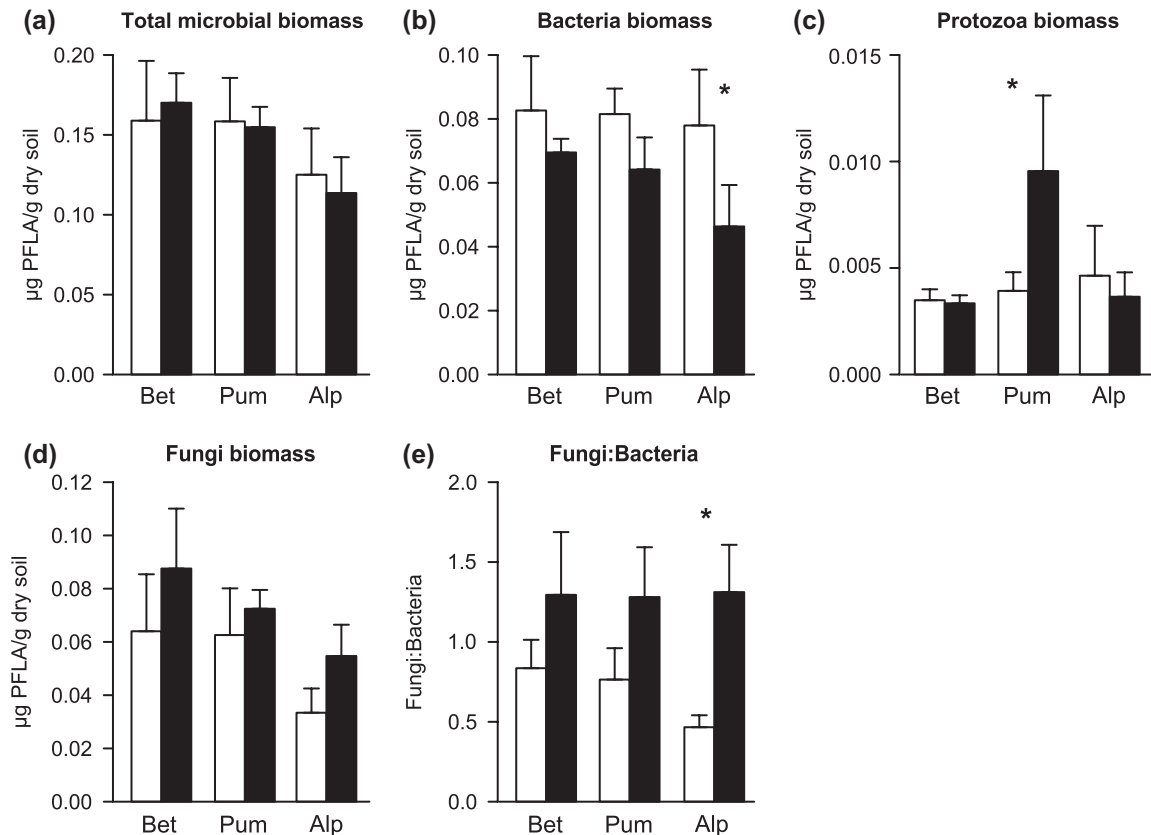


Figure 3. Means (\pm SE) of soil total microbial biomass (a), soil biomasses of bacteria (b), protozoa (c) and fungi (d) and fungi:bacteria ratio (e) according to vegetation belt type (*Nothofagus betuloides* “Bet”, *Nothofagus pumilio* “Pum” and alpine vegetation “Alp”) and elevation (lower (white) versus higher (black) elevation). Significant differences between vegetation belts are indicated with different letters (according to Tukey post hoc tests) and significant differences between elevation within vegetation belts are indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 3. Results of permutations tests (based on 999 Monte Carlo permutations) on redundancy analyses constraining soil biota structure, soil bacterial composition and soil fungal composition matrices by (a) vegetation belt and relative altitude within vegetation belt or (b) selected soil parameters. The sampling design has been taken into account by adding the transect as a covariate when testing for effect of vegetation belt and relative altitude. In addition, to test for effect of soil parameters per se, vegetation type and relative altitude within vegetation type have been added as a covariate in these models. Significant values ($p < 0.05$) are listed in bold.

Response matrix	Constraining factor	Covariable	DF	F-value	p-value
Soil biota structure (PLFA)	vegetation	transect	2	1.596	0.161
	vegetation/altitude		3	1.697	0.132
	residuals		14		
	soil parameters	vegetation/altitude	5	2.978	0.015
	residuals		12		
	soil parameters (<i>best model</i>)	vegetation/altitude	2	7.972	0.001
	residuals		20		
	total dissolved N	vegetation/altitude	1	9.568	0.010
	soil C:N		1	6.377	0.010
Bacterial communities (SSCP)	residuals		20		
	vegetation	transect	2	0.936	0.529
	vegetation/altitude		3	0.779	0.797
	residuals		15		
	soil parameters	vegetation/altitude	5	0.971	0.522
	residuals		13		
	absolute altitude	transect	1	0.489	0.943
	residuals		19		
	vegetation/altitude	transect	5	1.323	0.020
Fungal communities (SSCP)	residuals		14		
	vegetation	transect	2	1.755	0.002
	vegetation/altitude		3	1.035	0.396
	residuals		14		
	soil parameters	vegetation/altitude	5	0.923	0.661
	residuals		16		
	absolute altitude	transect	1	2.078	0.008
	residuals		18		

by relative altitude within vegetation belt (Table 3). However, soil biota structure varied significantly with total dissolved N and soil C:N ratio (Table 3, best model). There were overall more biota (Table 4), and especially more bacteria and protozoa, in soils with higher levels of total dissolved N, whereas fungi were more abundant and bacteria less abundant in soils with higher C:N ratios, leading to a greater fungi:bacteria ratio (Table 4).

In terms of composition, bacterial communities were affected neither by vegetation belt nor by relative altitude within vegetation belt, or by soil parameters and absolute altitude (Table 3). In contrast, the three vegetation belts and different absolute altitudes hosted significantly different fungal communities, but within vegetation belts, there was no significant difference according to relative altitude (Table 3). As for bacterial communities, fungal community composition was not affected by soil parameters (Table 3).

Discussion

In southern Patagonia, at the upper range of Cordillera Darwin, one can assume that the current treeline is driven only by natural factors because human activities and atmospheric N deposition are extremely reduced. In such a context, our study is useful to approach key mechanisms limiting altitudinal expansion of trees.

Changes in soil abiotic parameters in response to vegetation and elevation

Soils of *Nothofagus* forests of the Cordillera Darwin were characterized by statistically contrasted C:N ratios and distinct water contents, NH_4^+ , total C and N, and microbial N (Table 2). Since soil water content, NO_3^- and NH_4^+ contents are subject to strong temporal variability, their explanatory power, when looked at individually, might

Table 4. Pearson correlation coefficients between main soil drivers (i.e. soil pH, soil total dissolved N, soil NH_4^+ content, soil N and soil C:N) and soil biota structure measured through biomasses of bacteria, protozoa and fungi, total microbial biomass and soil fungi:bacteria ratio. Significant correlation ($p < 0.05$) between soil parameter and biota structure are in bold and indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

	Bacteria	Protozoa	Fungi	Total biomass	Fungi:bacteria
pH	0.266	0.423	-0.045	0.128	-0.098
Total dissolved N	0.753***	0.506**	0.300	0.631**	0.139
N- NH_4^+	0.556**	0.065	0.300	0.502*	0.105
Soil N	0.401	0.421	0.110	0.318	0.142
Soil C:N	-0.420*	0.027	0.410*	0.048	0.686***

be limited in our study where we only could undertake a one-time sampling due to the remote location of the study sites. Yet, *Nothofagus pumilio* soils at 400–500 m (i.e. pum1) displayed highest NH_4^+ and water contents, which were likely to be related because elevated soil moisture may restrict nitrification activities (Bardgett 2005). In contrast, soil pH, total dissolved N, soil C:N as well as total C and N contents are steadier with time, and could be considered as fingerprints of the ecosystem functioning since they integrate dominant vegetation traits and decomposition features as well as geomorphological and micro-climatic characteristics. Here, soil C:N differed between vegetation belts at their lowest altitude (i.e. bet1, pum1, alp1), but not anymore when located at the highest elevation (bet2, pum2, alp2). This suggests that any potential effects of changes in tree litter quality and/or decomposers leading to decreasing decomposition with altitude within a single forest type (*pum* or *alp*) were possibly compensated by the positive effects of other variables (soil moisture, metabolic activities, microbial communities...) at its upper limits. Within *Nothofagus* forests of the Cordillera Darwin, *N. pumilio* soils contained more total soil N and C contents, and more microbial N than *N. betuloides* soils, whereas nitrate and ammonium contents were not different between both forest types. The deciduous leaves of *N. pumilio* are likely to represent a larger flux of N and C to the forest floor than in the evergreen forest of *N. betuloides*, where N and C are retained aboveground. These stronger fluxes of N and C combined with high non-structural carbohydrates contents in deciduous leaves of *N. pumilio* (Fajardo et al. 2013) and strong N-resorption (Diehl et al. 2003), could favour the accumulation of C and refractory-N in soils. Overall, these higher soil N and C contents also suggest that under *N. pumilio* cover decomposition of plant litter and mineralization of soil organic matter could be limited (Barrera et al. 2000, Caldentey et al. 2001). This could result from the significantly higher soil water content measured at our sites under *N. pumilio* that, in combination with cold temperatures and low pH, would limit decomposers activities at the treeline (Körner and Paulsen 2004, Romanya et al. 2005). Another plausible explanation could be that deciduous *N. pumilio* litter decomposed slowly due to higher litter contents in refractory C and N-compounds (Hättenschwiler and Vitousek 2000, Diehl et al. 2003). This hypothesis concurs with our observations of the highest microbial N and total soil N contents for *N. pumilio* consistently along its range when compared to the other two vegetation belts. Since microbial N or C:N ratios could be considered as intermediate in their capacity to express temporal or spatial variations in ecosystems functioning, this relationship between microbial N and total N in *N. pumilio* soils towards the treeline at our sites suggests a greater N sequestration capacity through its immobilization, biotic (microbial) (Schmidt et al. 1999) and/or abiotic (SOM) (Baptist et al. 2008). Indeed, such N immobilization could result simultaneously from a litter rich in refractory C and N-compounds and from a competitive microbial community under *N. pumilio* cover. Our results also tend to confirm, in such a pristine context,

that krummholz lenga stands are nutrient-rich forests that act as nutrient sinks due to functional advantages at the treeline (Barrera et al. 2000, Frangi et al. 2005). However, supplemental data are required to confirm the observed patterns, such as chemistry of litter and above-ground fresh plant tissues, as well as litter decomposition surveys, for each vegetation belt and altitude.

Changes in microbial communities in response to vegetation and elevation

Total microbial biomass (bacteria, protozoa and fungi) did not vary significantly across vegetation belts encompassing the treeline when sampling occurred (Fig. 3a). Despite such constant biomass, fungal community composition did change along the elevational gradient and concomitant changes in vegetation types as hypothesised (Table 3). These results confirm recent findings from a montane elevational gradient in eastern Peru (Fierer et al. 2011) according to which the composition of microbial community changes with elevation even though microbial diversity is independent of altitude. Although not in the context of the treeline, the influence of elevation on soil fungal communities has also been recently observed in the case of *Silene acaulis* cushions (Roy et al. 2013). By contrast to fungal communities, bacterial communities did not differ along the elevational gradient (Table 3). According to recent results, bacterial and fungal communities have different responses to local site characteristics, with bacteria being primarily influenced by soil pH (Fierer and Jackson 2006, Roy et al. 2013) while fungi respond mainly to plant-related variables, such as soil organic matter quality or annual radiation (Zinger et al. 2011). Thus, at our study site, the consistency of soil pH among the three vegetation types could explain the constant bacterial community composition at the treeline (Fig. 2). By contrast, the change in fungal community composition could be linked to the decrease in the soil C:N ratio along the vegetation gradient towards the treeline (i.e. from bet to alp, Fig. 2). Furthermore, soil C:N was strongly correlated to the fungi:bacteria ratio (Table 4) across all vegetation belts with fungi dominating over bacteria in soils with high C:N ratio regardless of the vegetation belt. By contrast, bacterial biomass was correlated to the amount in total dissolved nitrogen (TDN, Table 4), mainly N-NH_4^+ , which tended to be higher at lower elevation in *N. pumilio* and alpine vegetation belts (Fig. 2). Indeed, at lower elevation, higher amounts of inorganic N were associated with bacteria-dominated microbial community (ratio fungi:bacteria < 1) whereas at higher elevation, high soil C:N was associated with the predominance of a fungi-dominated microbial community (ratio fungi:bacteria > 1). These results are in line with our hypothesis and confirmed our expectations that increasing elevation is paralleled by a reduction in soil inorganic N content and by an increase in soil C:N ratio, while microbial community composition changes with fungal communities becoming dominant. These outcomes, specific to a treeline area in a pristine context, are also consistent with previous studies showing a declining nutrient availability with elevation (Sundqvist et al. 2011), and a fungal-based

microbial community associated with reduced nutrient availability (van der Heijden et al. 2008, Sundqvist et al. 2011). At our site focusing on the treeline area, the simultaneous decrease in soil N-NH₄⁺ and the increases in soil C:N and fungi:bacteria ratios with elevation within vegetation belts were stronger in alpine vegetation than under *Nothofagus* forests. These differences in below-ground properties and the responses of these properties to elevation between vegetation covers concur with the conclusions from Swedish subarctic tundra (Sundqvist et al. 2011). They indicate that responses of soil microbial communities to elevation could be influenced by functional properties of forest communities (Sundqvist et al. 2013) for instance through variations in litter quality or in soil moisture (Fajardo et al. 2013). Finally, changes in soil biota composition according to elevation within vegetation belts coincided mainly with changes in soil inorganic nitrogen (i.e. NH₄⁺) contents at the treeline, which suggest interplay between vegetation type, soil biota and soil nitrogen availability. However, despite these quantitative changes in soil biota, we did not find any significant direct relationships between bacterial or fungal community composition and soil parameters.

Resource partitioning at treeline between microbes and plants

We observed a number of consistent patterns of change between lower and higher altitude within the three vegetation belts that supported our hypothesis of simultaneous N availability and microbial community variations. Increasing elevation was associated with a decrease in soil N-NH₄⁺ content for the *N. pumilio* and the alpine belt, and an increase in soil C:N ratio combined with higher fungi:bacteria ratio under the alpine belt. As already mentioned, all soils were essentially composed of organic materials poorly mixed with minerals from non-carbonated bedrocks. Consequently, these organic soils represent the major substrate for heterotrophic microbial communities, and soil C:N ratio can be considered as the C:N ratio of their organic substrate. At the highest altitude of the three vegetation types, soil/substrate C:N reached 30, which is considered as a threshold that determines whether microbes are C limited (C:N < 30) or N limited (C:N > 30) during organic matter breakdown (Kaye and Hart 1997). Therefore, at higher elevation in the alpine belt, high values of soil C:N ratio suggest that microbes become increasingly N limited, potentially favouring N immobilization of exogenous sources of inorganic N and slowing down litter decomposition. Although not significant in our study, we measured increased soil C:N ratio with elevation within *N. pumilio* forests, which has already been observed in southern Patagonia (Frangi et al. 2005). At its lowest elevation, alpine vegetation had a lower soil C/N ratio than both forests, which could result from the absence of coarse woody debris, resulting in a lower input of recalcitrant carbon in litter.

Overall, higher soil C:N ratio at higher altitude would favour N immobilization over N mineralization, therefore contributing to the decrease in soil NH₄⁺ content through a reduction in its production and an increase in its immobilization. Under such conditions, we suspect strong

competition between trees and microbes to occur for available inorganic N forms as found in peatlands (Bragazza et al. 2013). However, direct measurements of N resource partitioning between soil microbes and vegetation, for instance using ¹⁵N tracers (Legay et al. 2013), remain necessary to conclude on this competition along this altitudinal gradient and within vegetation belts. In Darwin Cordillera, since microbial nitrogen and microbial carbon biomass was constant along the elevation gradient within vegetation belts (Table 2, Fig. 2); we can assume that microbes were not nutrient limited even at higher altitude. Consequently, we propose that in these upper stressful limits, soil microbial communities are more competitive than trees to take up soil N, and the relatively low residual amount of soil inorganic N available for trees could participate to their establishment limitation, leading to tree-line formation. The density of root network of *N. pumilio* in high elevation sites (Ibanez unpubl.) also argues in favour of strong competition for limited N resources (Hertel and Scholing 2011). Indeed, this increase in biomass and density of the fine root system at the treeline may enlarge the volume of the prospected soil, and could indicate an adaptation of the trees to the harsh soil conditions including substrate thinness, steepness and limited nutrient availability.

Conclusion

Taking advantage of a mountaineering expedition in highly remote Cordillera Darwin during the mid austral spring of 2009, we conducted an observational study of soils parameters and microbial communities' structure and composition along an elevation gradient. In the Darwin Cordillera where the current treeline is assumed to be strictly driven by natural factors, we found that elevation was linked to a decrease in NH₄⁺ availability, to an increase in soil C:N ratio and to a change in microbial community structure towards a fungal-dominated community in the alpine vegetation belt. Lower vegetation belts (*N. betuloides* and *N. pumilio*) exhibited more complex patterns, but our results illustrate only a snapshot of an ecological setting subjected to many short and long-term variations. The shift towards a fungal dominated community observed in the alpine vegetation belt could favour N immobilization over N mineralization, potentially leading to a competition between trees and soil microbial communities for limited soil inorganic N. In these stressful alpine environments, we hypothesize that microbes are more competitive than trees for N uptake, and the residual low amount of inorganic N available for trees in the soil could participate to the establishment limitation. Together, these results suggest N limitations at upper limits of forest distributions in pristine alpine regions such as the Darwin Cordillera, but additional measurements through the growing season and data on litter and above-ground fresh plant tissues chemistry and decomposition within each vegetation belt and along the altitudinal gradient are needed to support our interpretations. In human-impacted alpine areas such as in central Europe, N is often less limiting and other factors (i.e. growth limitation hypothesis) might be dominant in the control of the treeline. By highlighting potential detailed mechanisms associated with changes in the structure of

microbial, and especially fungal communities, and with tree – microbe competition for scarce mineral N resources, our results open new avenues for novel research at treelines around the world.

Acknowledgements – This research was conducted as part of the ‘Un Rêve de Darwin’ project, with funding from CNRS. AT is grateful to Marlene Manzano and Sylvain Faugeron for technical and logistical assistance in Chile. We thank Florence Baptist for discussions on sampling protocols and Hanna Secher-Frommell, Cindy Arnoldi and Laurent Grasset for assistance with lab analyses.

References

- Aravena, J. C. et al. 2002. Tree-ring growth patterns and temperature reconstruction from *Nothofagus pumilio* (Fagaceae) forests at the upper tree line of southern Chilean Patagonia. – *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75: 36–76.
- Baptist, F. et al. 2008. Tannin impacts on microbial diversity and the functioning of alpine soils: a multidisciplinary approach. – *Environ. Microbiol.* 10: 799–809.
- Baptist, F. et al. 2010. Direct and indirect control by snow cover over decomposition in alpine tundra along a snowmelt gradient. – *Plant Soil* 328: 397–410.
- Bardgett, R. D. 2005. *The biology of soil: a community and ecosystem approach.* – Oxford Univ. Press.
- Bardgett, R. D. and McAlister, E. 1999. The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. – *Biol. Fert. Soils* 29: 282–290.
- Barrera, M. D. et al. 2000. Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. – *J. Veg. Sci.* 11: 179–188.
- Bragazza, L. et al. 2013. Biogeochemical plant–soil microbes feedback in response to climate warming in peatlands. – *Nat. Climate Change* 3: 273–277.
- Brant, J. B. et al. 2006. Root controls on soil microbial community structure in forest soils. – *Oecologia* 148: 650–659.
- Caldentey, J. et al. 2001. Litter fluxes and decomposition in *Nothofagus pumilio* stands in the region of Magallanes, Chile. – *For. Ecol. Manage.* 148: 145–157.
- Cuevas, J. G. 2000. Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. – *J. Ecol.* 88: 840–855.
- Cullen, L. E. et al. 2001. Climate change and tree-ring relationships of *Nothofagus menziesii* tree-line forests. – *Can. J. For. Res. Rev. Can. Rech. For.* 31: 1981–1991.
- Delbes, C. et al. 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction – single-strand conformation polymorphism analysis. – *Environ. Microbiol.* 2: 506–15.
- Diehl, P. et al. 2003. Nutrient conservation strategies in native Andean–Patagonian forests. – *J. Veg. Sci.* 14: 63–70.
- Fajardo, A. et al. 2013. Similar variation in carbon storage between deciduous and evergreen treeline species across elevational gradients. – *Ann. Bot.* 112: 623–631.
- Fierer, N. and Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 626–631.
- Fierer, N. et al. 2011. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. – *Ecology* 92: 797–804.
- Frangi, J. L. et al. 2005. Nutrient cycling in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. – *For. Ecol. Manage.* 217: 80–94.
- Frostegård, A. et al. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. – *Soil Biol. Biochem.* 25: 723–730.
- Geremia, R. A. and Zinger, L. 2012. Molecular fingerprinting of fungal communities in soil. – In: Gupta, V. K. et al. (eds), *Laboratory protocols in fungal biology, current methods in fungal biology.* Springer, pp. 349–356.
- Harrison, K. A. et al. 2008. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? – *Soil Biol. Biochem.* 40: 228–237.
- Hättenschwiler, S. and Vitousek, P. M. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. – *Trends Ecol. Evol.* 15: 238–243.
- Hertel, D. and Scholing, D. 2011. Norway spruce shows contrasting changes in below- versus above-ground carbon partitioning towards the alpine tree line: evidence from a central European case study. – *Arct. Antarct. Alpine Res.* 43: 46–55.
- Kaye, J. P. and Hart, S. C. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. – *Trends Ecol. Evol.* 12: 139–143.
- Körner, C. 1998. A re-assessment of high elevation treeline positions and their explanation. – *Oecologia* 115: 445–459.
- Körner, C. and Paulsen, J. 2004. A world-wide study of high altitude treeline temperatures. – *J. Biogeogr.* 31: 713–732.
- Legay, N. et al. 2013. Comparison of inorganic nitrogen uptake dynamics following snowmelt and at peak biomass in subalpine grasslands. – *Biogeosciences* 10: 7631–7645.
- Leonelli, G. et al. 2011. Climate warming and the recent treeline shift in the European Alps: the role of geomorphological factors in high-altitude sites. – *Ambio* 40: 264–273.
- Loomis, P. F. et al. 2006. Nitrogen cycling at treeline: latitudinal and elevational patterns across a boreal landscape. – *Ecoscience* 13: 544–556.
- McNown, R. W. and Sullivan, P. F. 2013. Low photosynthesis of treeline white spruce is associated with limited soil nitrogen availability in the Western Brooks Range, Alaska. – *Funct. Ecol.* 27: 672–683.
- Payette, S. 2007. Contrasted dynamics of northern Labrador tree lines caused by climate change and migrational lag. – *Ecology* 88: 770–780.
- Perez, C. A. et al. 1998. Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics. – *Ecosystems* 1: 361–373.
- Reay, D. S. et al. 2008. Global nitrogen deposition and carbon sinks. – *Nat. Geosci.* 1: 430–437.
- Robertson, G. P. et al. 1999. *Standard soil methods for long-term ecological research.* – Oxford Univ. Press.
- Romanya, J. et al. 2005. Soil–plant relationships and tree distribution in old growth *Nothofagus betuloides* and *Nothofagus pumilio* forests of Tierra del Fuego. – *Geoderma* 124: 169–180.
- Roy, J. et al. 2013. Microbes on the cliff: alpine cushion plants structure bacterial and fungal communities. – *Front. Microbiol.* 4: 64–64.
- Saccone, P. et al. 2013. The effects of snowpack properties and plant strategies on litter decomposition during winter in subalpine meadows. – *Plant Soil* 363: 215–229.
- Schmidt, I. K. et al. 1999. Mineralization and microbial immobilization of N and P in arctic soils in relation to season, temperature and nutrient amendment. – *Appl. Soil Ecol.* 11: 147–160.
- Shi, P. et al. 2008. A test of the growth-limitation theory for alpine tree line formation in evergreen and deciduous taxa of the eastern Himalayas. – *Funct. Ecol.* 22: 213–220.
- Sundqvist, M. K. et al. 2011. Interactive effects of vegetation type and elevation on aboveground and belowground properties in a subarctic tundra. – *Oikos* 120: 128–142.

- Sundqvist, M. K. et al. 2012. Chemical properties of plant litter in response to elevation: subarctic vegetation challenges phenolic allocation theories. – *Funct. Ecol.* 26: 1090–1099.
- Sundqvist, M. K. et al. 2013. Community and ecosystem responses to elevational gradients: processes, mechanisms and insights for global change. – *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44: 261–280.
- Susiluoto, S. et al. 2010. Testing the growth limitation hypothesis for subarctic Scots pine. – *J. Ecol.* 98: 1186–1195.
- van de Weg, M. J. et al. 2009. Altitudinal variation in leaf mass per unit area, leaf tissue density and foliar nitrogen and phosphorus content along an Amazon-Andes gradient in Peru. – *Plant Ecol. Divers.* 2: 243–254.
- van der Heijden, M. G. A. et al. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. – *Ecol. Lett.* 11: 296–310.
- Wardle, D. A. et al. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. – *Science* 304: 1629–1633.
- Wardle, P. and Coleman, M. C. 1992. Evidence for rising upper limits of 4 native New Zealand forest trees. – *N. Z. J. Bot.* 30: 303–314.
- White, T. J. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis, M. A. et al. (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, pp. 315–322.
- Wookey, P. A. et al. 2009. Ecosystem feedbacks and cascade processes: understanding their role in the responses of arctic and alpine ecosystems to environmental change. – *Global Change Biol.* 15: 1153–1172.
- Wu, Y. P. et al. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses. – *Geoderma* 150: 171–178.
- Zinger, L. et al. 2008. CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. – *J. Microbiol. Meth.* 72: 42–53.
- Zinger, L. et al. 2011. Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. – *Plos One* 6: e19950.

Supplementary material (available online as Appendix oik-00860 at <www.oikosoffice.lu.se/appendix>). Appendix 1.

Annexe 2

Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies

Taberlet P, Prud'homme SM, Campione E, Roy J, Miquel C, Shehzad W, Gielly L, Rioux D, Choler P, Clément JC, Melodelima C, Pompanon F, Coissac E

2012, *Molecular Ecology* **21**, 1816-1820

Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies

PIERRE TABERLET, SOPHIE M. PRUD'HOMME, ETIENNE CAMPIONE, JULIEN ROY, CHRISTIAN MIQUEL, WASIM SHEHZAD, LUDOVIC GIELLY, DELPHINE RIOUX, PHILIPPE CHOLER, JEAN-CHRISTOPHE CLÉMENT, CHRISTELLE MELODELIMA, FRANÇOIS POMPANON and ERIC COISSAC

Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9, France

Abstract

DNA metabarcoding refers to the DNA-based identification of multiple species from a single complex and degraded environmental sample. We developed new sampling and extraction protocols suitable for DNA metabarcoding analyses targeting soil extracellular DNA. The proposed sampling protocol has been designed to reduce, as much as possible, the influence of local heterogeneity by processing a large amount of soil resulting from the mixing of many different cores. The DNA extraction is based on the use of saturated phosphate buffer. The sampling and extraction protocols were validated first by analysing plant DNA from a set of 12 plots corresponding to four plant communities in alpine meadows, and, second, by conducting pilot experiments on fungi and earthworms. The results of the validation experiments clearly demonstrated that sound biological information can be retrieved when following these sampling and extraction procedures. Such a protocol can be implemented at any time of the year without any preliminary knowledge of specific types of organisms during the sampling. It offers the opportunity to analyse all groups of organisms using a single sampling/extraction procedure and opens the possibility to fully standardize biodiversity surveys.

Keywords: DNA extraction, DNA metabarcoding, extracellular DNA, soil

Received 20 July 2011; revision received 5 September 2011; accepted 9 September 2011

Introduction

DNA barcoding, the use of a standardized DNA sequence to identify species, is becoming a popular solution for taxonomic identification of individual specimens. For both animals and plants, the standardized DNA fragments are longer than 500 bp (Hebert *et al.* 2003; Hollingsworth *et al.* 2009). Besides the identification of individual specimens, the barcoding concept has been extended to the identification of multiple taxa based on a single experiment. Such an approach is mainly implemented for bacteria (e.g. Sogin *et al.* 2006), fungi (e.g. Zinger *et al.* 2009a), nematodes (e.g. Porazinska *et al.* 2009), herbivore and carnivore diet

studies (e.g. Valentini *et al.* 2009; Kowalczyk *et al.* 2011; Shehzad *et al.* 2012), and solving ecological questions concerning river benthos (Hajjibabaei *et al.* 2011), plants Yoccoz *et al.* 2012, L. Gielly, *et al.*, in revision) and earthworms (Bienert *et al.* 2012).

The approach consisting of identifying multiple species, in a single experiment, using complex and degraded environmental samples can be termed 'DNA metabarcoding'. As soil contains DNA remains from many organisms, it is tempting to use soil DNA to assess biodiversity using a DNA metabarcoding approach. Total soil DNA includes cellular DNA originating from living cells or from living multicellular organisms, and extracellular DNA (Levy-Booth *et al.* 2007; Pietramellara *et al.* 2009). Usually, extracellular DNA originates from cell lysis and represents a significant proportion of total soil DNA (Pietramellara *et al.*

Correspondence: Pierre Taberlet, Fax: +33(0)4 76 51 42 79;
E-mail: pierre.taberlet@ujf-grenoble.fr

2009). Extracellular DNA can adsorb to negatively charged silica particles, clay and organic matter via their phosphates and cation bridging (England *et al.* 2004). Adsorbed DNA is much more resistant to DNase digestion than free DNA (Romanowski *et al.* 1991). It has also been demonstrated that the amount of adsorbed DNA molecules decreases in the presence of phosphates, indicating competition between DNA and phosphate (Saeki *et al.* 2010). As a consequence, soil extracellular DNA can be selectively extracted by a saturated phosphate buffer in absence of a cell lysis step (Lorenz & Wackernagel 1987; Ogram *et al.* 1987; Corinaldesi *et al.* 2005).

In several pilot experiments for tracking plant or animal diversity using soil DNA (Yoccoz *et al.* 2012; Bienert *et al.* 2012), we observed a high heterogeneity among samples from the same location. These pilot experiments were carried out starting from three to six grams of soil using the PowerMax[®] Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Cambridge, UK) following manufacturer's instructions. Such extraction kits were initially developed for the analysis of microorganism DNA, and consequently, the first step of protocols consists of a cell lysis. Thus, by using such commercial kits, both intra- and extracellular DNA are extracted, but the amount of starting material is by far too low to properly assess plants or macro-invertebrate diversity. Furthermore, extracellular DNA might represent a better choice for targeting nonmicroorganism diversity, and might better integrate the local diversity over a longer period, avoiding rapid changes in microorganism composition according to seasonal or climatic parameters (Zinger *et al.* 2009b).

Owing to the local heterogeneity, it is of prime importance to extract DNA from a much larger amount of soil to represent as closely as possible the local biodiversity. Our goal was thus to develop new sampling and extraction procedures suitable for DNA metabarcoding analyses, and compatible with a large amount of starting material (several kilograms of soil). The extraction procedure we propose here is based on the use of saturated phosphate buffer, and target extracellular DNA. We also validated both the sampling and the extraction procedures on a set of 12 plots corresponding to four habitat types in alpine meadows by analysing plant DNA.

Materials and methods

Soil sampling

The goal of the sampling procedure is to obtain a soil sample as representative as possible of the local biodiversity. As plant and animal distribution is heteroge-

neous at a plot scale, we suggest collecting and mixing together several dozens of small core samples (20–50 g of soil per coring). These sub-samples can either be collected randomly or on a regular grid and should include material from different depths. The size of the study area should be designed to cope with the local heterogeneity. To properly monitor the variability introduced by the sampling strategy, we strongly recommend collecting at least two samples (each composed of many cores mixed together) per sampling location. The soil cores are collected with a coring sampler that is properly cleaned between each plot, by removing any soil remains before a final step at high temperature (flame cleaning). We usually collect the soil samples in wide-neck barrels (15.4 L; Cat. Number: 0789.1; Roth Sochiel E.U.R.L., Lauterbourg, France) that will be subsequently used for the DNA extraction.

Extraction of extracellular DNA

The first step is to add the saturated phosphate buffer (Na_2HPO_4 ; 0.12 M; pH \approx 8) to the soil sample. After weighing the soil sample, we usually add the same weight of phosphate buffer. In some cases, with soil containing many organic matters, we increase the amount of phosphate buffer up to twice the weight of the soil. As it is not recommended to keep the phosphate buffer owing to possible bacterial contamination, we prepare it just before the DNA extraction. We obtain the correct pH and concentration by adding 1.97 g of NaH_2PO_4 and 14.7 g of Na_2HPO_4 per litre of sterile distilled water. After properly closing the container, the soil and the phosphate buffer are thoroughly mixed together during 15–30 min. A shorter time will reduce the concentration of extracellular DNA in the phosphate buffer, while a longer time will increase the relative proportion of PCR inhibitors (mainly humic acids). This mixing step is important to properly homogenize the sample. An aliquot of the soil/phosphate buffer mixture is then centrifuged for ten minutes at 10 000 rcf, and 500 μL of the resulting supernatant containing extracellular DNA is recovered for the next extraction steps that are carried out with a commercial kit for soil DNA (NucleoSpin[®] Soil; Macherey-Nagel, Düren, Germany), skipping the lysis step and following manufacturer's instructions. The DNA extract was recovered in 100 μL and diluted 10 times before being used as PCR template.

Validation experiments

Sampling for the validation experiments was performed in the central French Alps (45°2' to 45°3' N; 6°22' to 6°24' E, 2060–2700 m a.s.l.). A total of 12 plots were sampled, three plots in each of four different plant commu-

nities: (i) subalpine grasslands dominated by *Festuca paniculata*, (ii) subalpine heath dominated by *Vaccinium vitis-idaea* and *V. myrtillus*, (iii) low alpine meadows dominated by *Carex sempervirens* and (iv) dry high alpine meadows dominated by *Kobresia myosuroides*. Plant diversity and soil properties of plant communities differed according to altitude, aspect and snow cover duration (Choler & Michalet 2002). The geological substratum of the four communities consists mainly of carbonated flysch (sand-stone and mixed schist). In the subalpine grassland, this parent material is covered by thick calcic brown soils, while the subalpine heath and alpine meadows are located on calcic brown soils, thinner and richer in soil organic matter (Table 1). In each plot, soil sampling was carried out within a five metres radius circle, following a regular grid of 1 × 1 m, and collecting material in the first 10 cm of depth. Thus, a total of 80 soil cores were collected within this circle, with about 50 g of soil per core, and grouped together to produce the sample that will be subsequently used for the DNA extraction. This sampling procedure was repeated in each plot, leading to a total of 24 soil samples of about 4 kg each. Two DNA extractions were carried out per sample using the same weight of soil and of phosphate buffer and following the protocol given above, leading to 48 DNA extracts (four DNA extracts per plot). Finally, two DNA amplifications were carried out per extract, leading to 96 PCR products (eight PCRs per plot).

DNA amplifications were carried out in a final volume of 30 µL, using 2 µL of the diluted DNA extract. The amplification mixture contained 1 U of AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer and 0.005 mg of bovine serum albumin (BSA; Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). The mixture was denatured at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C and 30 s at 50 °C (no elongation step). The pri-

mer pair used (g: 5'-GGGCAATCCTGAGCCAA-3', and h: 5'-CCATTGAGTCTCTGCACCTATC-3') corresponds to a universal approach that targets the P6 loop region of the chloroplast *trnL* (UAA) intron (Taberlet *et al.* 2007). Both primers were modified by the addition of specific 9 bp tags on the 5' end to allow the assignment of sequence reads to the relevant sample (Valentini *et al.* 2009). All the PCR products from the different samples were first titrated using capillary electrophoresis (QIAxcel, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and then mixed together, in equimolar concentrations. This mix underwent sequencing using Titanium chemistry (GS Rapid Library Prep, GS Junior Titanium emPCR Lib-L and GS Junior Titanium Sequencing Kits) on a GS Junior pyrosequencing system (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA), following manufacturer's instructions.

The sequence reads were analysed using the OBITools software (<http://www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools>). First, primers and tags were identified using the ngsfilter program. Only sequences with perfect match on tags and a maximum of two errors on primers were taken into account. The amplified regions, excluding primers and tags, were kept for further analysis. Then, strictly identical sequences were clustered together using the obiuniq program, keeping the information about their distribution among the 96 amplifications. Sequences with a single occurrence were excluded using the obigrep program, as they probably correspond to amplification/sequencing errors. Each remaining sequence was further considered as a molecular operational taxonomic unit (MOTU, Blaxter *et al.* 2004), and the resulting sequence file was converted into an occurrence table (MOTUs × amplifications) with the obitab program. This sequence analysis protocol was designed to be as simple as possible for revealing the biodiversity differences among amplifications, but without further cleaning for allowing a good correspondence between MOTUs and plant species. The occur-

Table 1 Characteristics and top soil (0–10 cm) properties (mean ± SE) of the four plant communities

	Subalpine grasslands	Subalpine heath	Low alpine meadows	Dry high alpine meadows
Altitude (m a.s.l.)	2060–2210	2230–2350	2370–2560	2650–2700
Aspect	S-SE	W-NW	Flat	W-NW
Dominant species	<i>Festuca paniculata</i>	<i>Vaccinium</i> sp.	<i>Carex sempervirens</i>	<i>Kobresia myosuroides</i>
Vegetation cover (%)	95	85	95	75
Parent material	Flysch	Flysch	Flysch	Flysch
Soil organic matter content (%)	23.9 ± 1.9	33.9 ± 2.2	36.9 ± 11.3	37.1 ± 8.4
pH	6.9 ± 0.1	6.5 ± 0.2	5.8 ± 0.1	7.7 ± 0.3
C/N	12.9 ± 0.4	18.7 ± 0.0	13.1 ± 0.2	13.1 ± 0.1
N-NH ₄ (µg/g)	15.9 ± 6.3	1.6 ± 1.6	18.2 ± 3.4	19.5 ± 4.8
N-NO ₃ (µg/g)	1.7 ± 0.9	1.2 ± 0.3	9.1 ± 4.4	3.1 ± 0.5
N (%)	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2

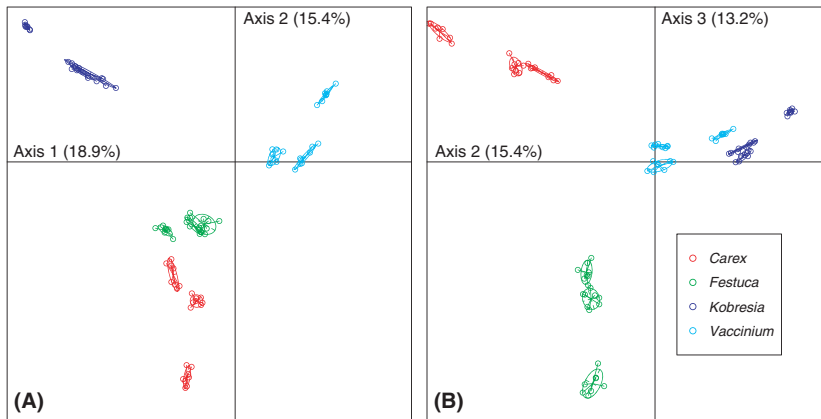


Fig. 1 Results of the validation experiments using DNA extracts from soil samples collected in 12 plots from four different alpine plant communities (low alpine meadows dominated by *Carex sempervirens*, subalpine grasslands dominated by *Festuca paniculata*, dry high alpine meadows dominated by *Kobresia myosuroides* and subalpine heath dominated by *Vaccinium* sp.). Graphics A and B represent projections of a between-class analysis on axis 1 vs. 2, and 2 vs. 3, respectively.

rence table was finally analysed using between-class analysis (BCA; Doleddec & Chessel 1987) from the ade4 R package (Dray & Dufour 2007). In the between-class analysis (BCA), individuals are the 96 PCR products and variables used for the ordination are, for each sequences, the count of their occurrences in each PCR. The metric used is the chi square distance. The modalities of the discrete variable used for classification of the PCR are the 12 plots. According to this, individuals clustered when the description of the plant communities described by the occurrences of sequences is similar (same plants in same proportions).

Results of the validation experiments

We obtained a total of 83 827 usable *g/h* sequence reads as output of the ngsfilter program. This led to a total of 15 326 unique sequences, of which 3861, occurring more than once and representing 86.3 % of the initial reads, were selected for the between-class analysis. At this stage, we obtained a mean of 753 reads per amplification (minimum: 237; median: 463; maximum: 6400).

Projections over the three-first axes of the between-class analysis (Fig. 1) clearly show that the eight amplifications from the same plot group together. The plots corresponding to the same plant communities also group together, but are nevertheless slightly different in relation to known heterogeneity within each plant community.

Discussion

The sampling and the extraction protocols presented here are easy to implement both in the field and in the laboratory. The results of the validation experiments clearly demonstrated that sound biological information can be retrieved when following the sampling, extraction and analysis procedures, even without taxonomic assignation of the different MOTUs. Furthermore, our

sampling/extraction procedure allows the analysis of different types of organisms using a single DNA extract. We already tested this possibility by analysing two other groups of organisms in a pilot experiment with DNA extracts from two plots. We first used the primers ewB/ewE (Bienert *et al.* 2012) amplifying a ~120 bp fragment of ice worms (Enchytraeidae) and earthworms (Lumbricina) mitochondrial 16S gene. We also amplified fungal internal transcribed spacer one (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA using specific primers (L. Epp, S. Boessenkool, E. Bellemain, *et al.*, in revision). In both experiments carried out specifically for this study and using the extraction protocol presented here, we obtained the expected sequences (data not shown).

The sampling/extraction protocol could be adjusted according to the question and to the target taxonomic groups. The size of the sampling area should be representative of the local diversity of the target groups. For example, to analyse tree diversity in a forest, one hectare should be appropriate. We advise adjusting the size of the sampling area according to the target taxonomic group having the coarsest spatial heterogeneity. In the same way, if the target taxonomic group corresponds to animals only living above ground, the soil sampling should only concentrate on the top soil layer, without sampling deepest layers.

The procedure presented here fulfils the needs of metabarcoding analyses using soil extracellular DNA, at least when using soils containing a high proportion of organic matter. Such a protocol can be implemented at any time of the year, provided that soil is accessible, and without having to look for specific types of organisms during the sampling. It offers the opportunity to analyse all groups of organisms using a single sampling/extraction procedure. Finally, it also opens the possibility to standardize biodiversity surveys; lack of such a standardization represents the main difficulty for carrying out large-scale meta-analyses.

Acknowledgements

This work is financially supported by the European Commission, under the Sixth Framework Programme (EcoChange project, contract no FP6-036866).

References

- Bienert F, de Danieli S, Miquel C *et al.* (2012) Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology*, **21**, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x.
- Blaxter M, Elsworth B, Daub J (2004) DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **271**, S189–S192.
- Choler P, Michalet R (2002) Niche differentiation and distribution of *Carex curvula* along a bioclimatic gradient in the southwestern Alps. *Journal of Vegetation Science*, **13**, 851–858.
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A (2005) Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 46–50.
- Doledec S, Chessel D (1987) Seasonal successions and spatial variables in fresh-water environments. 1. Description of a complete 2-way layout by projection of variables. *Acta Oecologica-Oecologia Generalis*, **8**, 403–426.
- Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, **22**, 1–20.
- England LS, Vincent ML, Trevors JT, Holmes SB (2004) Extraction, detection and persistence of extracellular DNA in forest litter microcosms. *Molecular and Cellular Probes*, **18**, 313–319.
- Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ (2011) Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE*, **6**, e17497.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**, S96–S99.
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL *et al.* (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 12794–12797.
- Kowalczyk R, Taberlet P, Coissac E *et al.* (2011) Influence of management practices on large herbivore diet—case of European bison in Białowieża Primeval Forest (Poland). *Forest Ecology and Management*, **261**, 821–828.
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH *et al.* (2007) Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**, 2977–2991.
- Lorenz MG, Wackernagel W (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 2948–2952.
- Ogram A, Sayler GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **7**, 57–66.
- Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F *et al.* (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, **45**, 219–235.
- Porazinska DL, Giblin-Davis RM, Faller L *et al.* (2009) Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1439–1450.
- Romanowski G, Lorenz MG, Wackernagel W (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase-I. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1057–1061.
- Saeki K, Kunito T, Sakai M (2010) Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols. *Biology and Fertility of Soils*, **46**, 531–535.
- Shehzad W, Riaz T, Nawaz MA *et al.* (2012) Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology*, **21**, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05424.x.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA *et al.* (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 12115–12120.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F *et al.* (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL*(UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, **35**, e14.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz MA *et al.* (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 51–60.
- Yoccoz NG, Bråthen KA, Gjelty L *et al.* (2012) DNA in soil mirrors plant functional and structural diversity. *Molecular Ecology*, **21**, in press.
- Zinger L, Coissac E, Choler P, Geremia RA (2009a) Assessment of microbial communities by graph partitioning in a study of soil fungi in two alpine meadows. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5863–5870.
- Zinger L, Shahnava B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009b) Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *ISME Journal*, **3**, 850–859.

P.T., L.G., and C.M. are coinventors of patents related to the g/h primers and the use of the P6 loop of the chloroplast *trnL*(UAA) intron for plant identification using degraded template DNA. These patents only restrict commercial applications and have no impact on the use of this locus by academic researchers.

Data accessibility

Data of the validation experiments: DRYAD entry doi:10.5061/dryad.ck8pg.

Annexe 3

Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities

Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, Desclos-Theveniau M, Kastl E M, Schloter M, Zinger L, Roy J, Geremia R A, Lavorel S

2013, *Biology and Fertility of Soils* 49, 1131-1139

Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities

B. Mouhamadou · J. Puissant · E. Personeni ·
M. Desclos-Theveniau · E. M. Kastl · M. Schloter ·
L. Zinger · J. Roy · R. A. Geremia · S. Lavorel

Received: 17 January 2013 / Revised: 5 April 2013 / Accepted: 10 April 2013 / Published online: 1 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Many studies have shown effects of plants species on fungal communities, but these are often confounded with soil effects. Thus, the specific role of plant species in structuring rhizospheric and soil fungal communities is poorly described. Our study used microcosms in which plants were grown under artificial conditions to bridge this gap. Two perennial grasses dominating subalpine grasslands, *Festuca paniculata* and *Dactylis glomerata*, were grown at two levels of fertilization on standard soil. Fungal communities were determined by 454 pyrosequencing of the internal transcribed spacer 1 region. Among the fungal communities characterized by the primers used, original communities were associated to each plant species and also diverged between rhizosphere and bulk soils within each plant species, though there were no significant fertilization effects. Differences regarded global composition of the fungal communities and abundant molecular operational taxonomic units (MOTUs). Both plant species and location effects were reflected more in the abundance than in the composition of MOTUs. The observed differences

in fungal communities coincide with differing strategies of plant root growth, with *D. glomerata* having greater root mass, length, and area than *F. paniculata*. Our study, by dissociating soil effects from plant effects, demonstrated that plant species exert a key control on soil fungi. We suggest that such effects may be linked to inter-specific differences in root traits and their consequences on nitrogen uptake.

Keywords Plant species · Fungal community structure · Nitrogen fertilization · Plant growth strategy

Introduction

Soil fungi are involved in various biological processes and control transformation of organic matter and nutrient availability (Falkowski et al. 2008; Singh et al. 2010). The network of fungal hyphae is essential for the conservation of the soil structure (Rillig and Mummey 2006). Mycorrhizal fungi colonize plant roots and enhance plant productivity by facilitating plant nutrient uptake (Wardle et al. 2004; van der Heijden et al. 2008), as well as conferring plant resistance or tolerance to biotic and abiotic stresses (root pathogens, heavy metals, drought) (Clark and Zeto 2000; Turnau and Haselwandter 2002). Pathogenic fungi may nevertheless have negative effects on ecosystem functioning by reducing plant productivity (van der Heijden et al. 2008).

Because of this importance of fungi for ecosystem processes, a number of studies have sought to identify and quantify the key factors that regulate the structure and diversity of soil fungal communities. Among these, it has been shown that plant species identity influences the composition and the abundance of soil fungal communities. For example, studies conducted by Costa et al. (2006) using

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00374-013-0810-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B. Mouhamadou · J. Puissant · L. Zinger · J. Roy ·
R. A. Geremia (✉) · S. Lavorel
Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 UJF/CNRS, Université
Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France
e-mail: roberto.geremia@ujf-grenoble.fr

E. Personeni · M. Desclos-Theveniau
INRA, UMR950 Ecophysiologie Végétale Agronomie et nutrition
N, C, S, 14032 Caen cedex, France

E. M. Kastl · M. Schloter
Research Unit for Environmental Genomics, Helmholtz Zentrum
München, Ingolstädter Landstr. 1,
85758 Oberschleissheim, Germany

molecular fingerprints have shown the effect of plant species on fungal rhizosphere communities of strawberry and oilseed. Similarly, Arfi et al. (2012) demonstrated in a mangrove ecosystem that the distribution of fungal communities was influenced by plant host specificity. More generally, numerous studies have indicated the effects of plant species on soil fungal communities (Grayston et al. 1998; Bardgett et al. 1999; Innes et al. 2004). In general, the ability of plant species to influence soil fungal communities may be related to their ecophysiological traits (Wardle et al. 1998) or to their response to stress (Bouasria et al. 2012). Plants may influence soil fungi through species-specific interactions (van der Heijden et al. 2008) and through their production of litter and root exudates (Bais et al. 2006; Millard and Singh 2010), which vary quantitatively and qualitatively between plant species (Gransee and Wittenmayer 2000), resulting in a unique and singular environment for soil microorganisms (Bertin et al. 2003; Berg and Smalla 2009). The array of root-derived substances is diverse and includes signal molecules such as flavonoids that directly [or indirectly] influence fungi and bacteria (Akiyama and Hayashi 2006; Standing and Killham 2007; Steinkellner et al. 2007; Cesco et al. 2012).

The degree of plant-derived effects on fungal communities, however, is strongly linked to soil organic matter content (Zinger et al. 2011), to management (fertilization or tillage), and to local climate conditions (Lekberg et al. 2007; Millard and Singh 2010; Lekberg et al. 2011; Schnoor et al. 2011). For example, Bezemer et al. (2006) demonstrated that effects of plant species on microbial communities significantly differed when they were grown in different soil types. Hence, it is very difficult to dissociate specific plant effects from soil effects and to conclude that plant effects are modulated by soil properties.

In addition to plant species, N fertilization has also been postulated as a factor that influences microbial communities by promoting the relative abundance of bacteria over fungi, as well as affecting the diversity within bacterial and fungal functional groups (Bardgett et al. 1999; Allison et al. 2007). Nitrogen fertilization could directly modify soil microorganisms by affecting mycorrhizal fungi and decomposers through the repression of enzyme activity (Fog 1988; Donnison et al. 2000; Frey et al. 2004). Moreover, because fertility alters plant traits and thereby ecosystem functioning (Wardle et al. 1998; Lavorel et al. 2011; Pakeman 2011), fertilization effects on soil microorganism communities may also be mediated by plant trait effects on soil microorganisms (De Deyn et al. 2011).

In this study, we used microcosms for plant growth and a barcoding approach based on 454 sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) 1 region, to investigate the influence of two perennial grasses, *Festuca paniculata* and *Dactylis glomerata*, on fungal community

structure in bulk soil and rhizosphere under different N-fertilization regimes.

Methods

Experimental setup

Living plant individuals were collected in summer 2009 from a semi-natural grassland site in the upper Romanche valley (Central French Alps, 45.041 N 6.341E, 1,650–2,000 m a.s.l.), where *D. glomerata* and *F. paniculata* are among the dominants. Their roots were thoroughly washed under tap water, and the plants were clipped at 6 cm above-ground and 4 cm below-ground. The plants were then grown for 2 months in hydroponic conditions (i.e., perlite with 1/4 strength Hoagland solution renewed every week). Root washing, root clipping, and growth in hydroponic conditions were intended to reduce the carryover of fungi from the original soil.

Plants for the quantification of fungal communities were grown in root boxes made of polyvinyl chloride. They consisted of a soil compartment (29×17.5×1 cm) (Personeni et al. 2007). The soil compartment was filled with 1 kg of sieved (5 mm) soil, adjusted to 40 % of the maximal water holding capacity. We used a soil with loamy sand texture, collected from a grassland at the Helmoltz Zentrum experimental station in Scheyern (Germany, 479 m a.s.l., 48°30'N, 11°28'E). Soil was taken in a depth of 10–20 cm and is characterized by a pH value of 6.1, a total N content of 0.15 %, a total C content of 1.47 % (C/N ratio 10.1), a nitrate content of 5.4 mg kg⁻¹, and an ammonium content of 6.5 mg kg⁻¹. The soil texture has been characterized as 54 % sand, 32 % silt, and 14 % clay.

Two plants of the same species were placed in the soil compartment of each root box. Plants were grown for 4 weeks under artificial lighting (400-W high-pressure sodium lamps, Philips Son-T-pia Agro) providing 450 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetically active radiation at plant height with a 16/8-h photoperiod cycle. Air temperature was kept at 20/16±2 °C (day/night). Throughout the experiment (4 weeks), soil moisture was kept constant by watering the boxes every 2 days. Boxes were randomized each day to avoid any positional effect. Root boxes were supplied three times with the 1/4 Hoagland solution without N. Half of the boxes received overall 18.92 mg of NH₄NO₃. In total, 12 root boxes (2 plant species×2 fertilization levels×3 replicates) were used. Plants were harvested after 4 weeks for measurements of root morphology.

The mycorrhizal status of the root of each plant sample was examined by microscopic observation after staining with Trypan Blue (Phillips and Hayman 1970; Trouvelot et al. 1986). For the analysis of fungal community structure,

soil sticking to roots was considered as rhizosphere soil. It was collected after strongly shaking the root systems. Bulk soil was sampled in the soil zones where no root was detected. Rhizosphere and bulk soils for fungal analysis were stored immediately after sampling at -80°C ; bulk soils for the chemical analysis were kept at 4°C .

Root morphology

Root morphology (total root length, root area, and root dry mass) were measured following standardized protocols (Cornelissen et al. 2001). Roots of each plant individual were gently washed over a fine mesh screen to avoid fine root loss. Then, a portion of the root system was suspended in water in a clear acrylic tray and disentangled for digital scanning with an Epson Expression 10000XL flatbed scanner. After scanning, roots were dried at 65°C for 48 h in order to determine dry mass. Each digital root image was processed using WINRHIZO software (Regent Instruments Inc., Canada) to determine total root length and average root diameter in order to calculate specific root length and specific root area.

Soil properties

Dry soil (5 g) was shaken for 2 h with 20 ml of 0.01 M CaCl_2 . Ammonium ($\text{NH}_4\text{-N}$) and nitrate ($\text{NO}_3\text{-N}$) as well as soluble total nitrogen concentrations were determined by a continuous flow analysis with a photometric autoanalyzer (CFA-SAN Plus; Skalar Analytik, Germany).

Analysis of fungal communities

DNA was extracted from 0.5 g of each of the 24 samples using the FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) and the Precellys24 Instrument (Bertin Technologies, France). After extraction, the DNA was tested in quality and quantity with a spectrophotometer (Nanodrop, PeqLab, Germany). DNA was dried with the QiaSafe 96-well plates (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) for storage.

The nuclear ribosomal ITS1 was used as a molecular marker for fungal community structure and amplified with the fungal primers ITS5 (White et al. 1990) and 5.8S fungi (Epp et al. 2012). A single PCR reaction was performed using primers comprising the 454 FLX adaptors A (forward) and B (reverse) at the 5' end, a 6-mer tag (designed using oligoTag, <http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>) to identify each sample and the fungal specific primer at the 3' end. Thus, the primers used for PCR were forward: 5' CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGNNNN NNGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3' and reverse: 5' CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNN NNCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT 3', where N

positions correspond to the different tags. The PCR reactions were carried out in 25 μl reaction mixtures containing 10 ng of fungal DNA, 4 mM of both primers, 200 mM of each dNTP, 1 U of Ampli Taq Gold DNA polymerase, and 2.5 μl of PCR buffer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Reactions were run for 25 cycles at 95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. To reduce the impact of PCR stochastic biases, eight PCR reactions were carried out from DNA extracted from each sample, and the eight PCR products from each sample were pooled. Before pyrosequencing, PCR products were purified with the QIAquick kit in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France), and DNA was quantified using the Bioanalyser (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). The purified amplicons were pooled for the subsequent sequencing by using equivalent molarities. The sequencing was carried out on the Roche Sequencer GS FLX Titanium series (454 Life Sciences GS FLX systems, Roche, Basel, Switzerland) by DNAVision (Charleroi, Belgium).

The sequence reads were analyzed using OBITools (available at www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools). First, primers and tags were identified using the ngsfilter tool. Data on filtering are presented in SM 1. Only sequences with perfect match on tags and a maximum of two errors on primers were taken into account; the length of the reads was comprised between 90 and 400 nucleotides. The amplified regions, excluding primers and tags, were kept for further analysis. Sequences shorter than 100 bp, or containing ambiguous nucleotides, were excluded using the obigrep command (Lentendu et al. 2011). To identify identical repeated sequences (unique) and produce a file of dissimilar sequences, we used the obiuniq command. Fifty-five thousand eighty-eight dissimilar reads were obtained; each unique sequence was annotated with the total number of reads (occurrence, "counts" field) for each sample.

For molecular operational taxonomic unit (MOTU) construction, we aligned the unique read sequences using a global alignment algorithm (Needleman and Wunsch 1970) in the "sumatra" software (available on request from: eric.coissac@inrialpes.fr), with a threshold of 90 %. Fifty-four thousand five hundred ten dissimilar sequences representing 219,950 reads displayed a similarity higher than 90 %. The reads per treatment/sample and collector curves are shown in SM1 and SM2, respectively. MOTUs were created from the distance matrix by using the non-hierarchical clustering method MCL (Markov clustering) (van Dongen 2000), using a similarity threshold of 98 % (Lentendu et al. 2011), rendering 3,664 MOTUs. A contingency table was constructed taking into account the occurrence (counts) of each unique sequence and was used for subsequent analyses. The biological meaning of these low

represented MOTU is not clear; moreover, it was previously reported (Lentendu et al. 2011) that MOTUs displaying a low occurrence (<9 reads) did not influence on the final result. Consequently, they were removed from the final dataset. The final dataset is available at Dryad (<http://datadryad.org/>) under the identifier XXX.

For taxonomic assignation, we proceeded following Lentendu et al. (2011). First, we created a custom database using UNITE+International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) database (release 24 September 2102) as template. This database is composed by the publicly curated UNITE database (Abarenkov et al. 2010) and sequences from the INSDC (<http://www.insdc.org>). The OBITool ecoPCR was used to select sequences flanked by our two primers (three mismatches allowed) with lengths between 100 to 600 nt. For a rigorous taxonomic assignation, redundant entries and entries with incomplete taxonomic annotation were removed. The resulting reference database comprised 7,055 unique sequences. Taxonomical assignment using this database was performed with three representative non-redundant sequences from each MOTU using the OBITool “ecoTag,” which uses the global algorithm “fasta35” (Pearson 2000) and identifies the last common ancestor based on a sharpness index 1 (Lentendu et al. 2011). It should be stressed that the inclusion of sequences with incomplete taxonomic annotations in the reference database would have increased the assignation rate, but also the erroneous annotations. MOTUs matching with *Arthropoda* (five) and *Echinodermata* (19) were removed from the dataset. The final dataset consisted of 608 MOTUs.

Statistical analysis

Fungal community structure was determined using non-metric multidimensional scaling (NMDS) with Bray–Curtis dissimilarity (Bray and Curtis 1957) and based on MOTU abundance. To assess the effect of each factor on the soil fungal pattern, a multivariate statistical method to partition the sums of squares of Y among experimental treatments (Anderson 2001) was applied. Three experimental factors were analyzed, namely plant species (A), the location of soil (bulk or rhizospheric, B), and N fertilization (C). The generic form of the model was thus: $Y=A+B+C+\varepsilon$, where ε is the error term. This multivariate analysis of variance was carried out using the function `adonis` of the package `vegan` (Anderson 2001; Oksanen et al. 2009), a method similar to a redundancy analysis (McArdle and Anderson 2001). Sums of squares and resulting F tests from permutations of the raw data were calculated to test for the significance of experimental factors on Y . We used Kruskal–Wallis tests (Kruskal and Wallis 1952) to test for significant differences between plant species and fertilization levels in root traits and soil N content. All statistical analyses were performed using R package `vegan` (Oksanen et al. 2009).

Results

Variations of root properties and soil N content between species and fertilization treatments

Root morphology varied considerably between the two species, with root length and root weight about three times greater in *D. glomerata* than in *F. paniculata* (Table 1). Similarly, total root area was about four times greater in *D. glomerata* compared to *F. paniculata*. However, we detected only minor responses of these root properties to N fertilization over the duration of the experiment (Table 1). Root biomass of *D. glomerata* increased slightly but significantly, while root area and root length decreased in *F. paniculata*.

Ammonium concentrations did not significantly differ between soil samples of the two plant species, or between the fertilized or un-fertilized soils. In contrast, nitrate and total soluble N concentrations were at least 50 % lower in soils planted with *D. glomerata* than with *F. paniculata* at the end of experiment (Table 1), though no significant differences were observed across fertilization treatments for any of the two plant species.

Patterns of soil fungal communities

Global NMDS analyses identified two distinct non-overlapping groups of fungal communities determined by the two plant species (Fig. 1) separated on the vertical axis, with each plant group further divided into two groups according to location (rhizosphere or bulk). These clusters were confirmed by the variance partitioning of the entire dataset, which also indicated that plant species identity was the most significant factor determining fungal community composition ($p=0.001$) and that location had a significant ($p=0.026$) but a less pronounced effect. However, all the other relationships were insignificant.

Composition of fungal communities

The global composition of fungal communities is displayed in SM3, while the taxonomic attribution is shown in Fig. 2. The evenness of fungal rhizospheric communities calculated for *D. glomerata* and *F. paniculata* were 0.896 and 0.887, respectively, while for the bulk soils the values were 0.916 and 0.936. *Ascomycota* were largely dominant in number of MOTUs and abundance. In abundance, they were followed by *Mortierellomycotina*, unclassified *Opisthokonta*, and taxa from the not yet classified family *Olpidiaceae*. Surprisingly, *Glomeromycota* and *Basidiomycota* were low in MOTU quantity and read abundance. The distribution of these clades was investigated for the two plants and locations (Fig. 2). Globally, *Ascomycota* dominated *D. glomerata* soils while *Mortierellomycotina*, unclassified

Table 1 The values of root traits, nitrate, and total N soluble measured after 4 weeks of *D. glomerata* and *F. paniculata* culture in clear-faced container

Traits of plants	<i>D. glomerata</i>		<i>F. paniculata</i>		<i>D. glomerata</i>		<i>F. paniculata</i>		<i>F. paniculata</i>	
	SD	SD	SD	SD	p value	-N	SD	+N	SD	p value
Root mass (g)	0.42	0.101	0.14	0.04	<0.001	0.356	0.032	0.468	0.096	<0.05
Total root length (m)	67.41	20.60	17.27	4.85	<0.001	59.81	23.83	74.52	12.17	0.248
Total root surface (cm ²)	817	248	197	47	<0.001	679	259	958	170	0.149
Nitrate (mg/g)	0.011	0.003	0.034	0.010	<0.01	0.009	0.00	0.013	0.004	0.5
Total soluble N (mg/g)	0.016	0.004	0.042	0.012	<0.01	0.015	0.001	0.017	0.005	0.63
Ammonium (µg/g)	1.318	0.597	0.687	0.405	0.26	1.59	0.396	1.04	0.639	0.275

Significant values ($p < 0.05$) determined by Kruskal–Wallis test are represented in bold +N with N fertilization, – without N fertilization, SD standard deviation

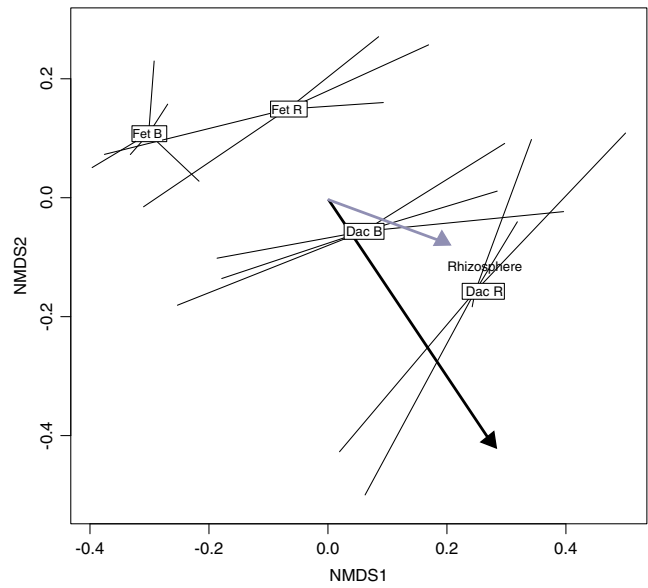


Fig. 1 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination of fungal communities performed on all experimental conditions. *Dac*, *D. glomerata*; *Fet*, *F. paniculata*; R, rhizospheric soil; B, bulk soils. Arrows correspond to environmental fitting, black significant $p < 0.001$, gray non-significant

Opisthokonta, and *Ascomycota* dominated *F. paniculata* soils (Fig. 2). Also, the soils under *D. glomerata* displayed higher content of *Olpidiaceae* (Mann–Whitney test, $p > 0.001$) than those under *F. paniculata*. Bulk and rhizospheric soils also displayed different fungal composition; the most prominent difference was the higher content of *Ascomycota* and the lower of *Mortierellomycotina* in rhizospheric soil when compared with the respective bulk soil (Mann–Whitney test, $p > 0.01$; Fig. 2).

The occurrence of the 50 most abundant fungal MOTUs was also studied (Fig. 3). Among these, all except MOTUs 31 and 61 were present in *D. glomerata* soils. In contrast, MOTUs 7, 9, 11, 17, 34, 43, and 70 were not found in *F. paniculata* soils. While *Ascomycota* and *Olpidiaceae* MOTUs dominated under *D. glomerata*, *Mortierellomycotina* dominated under *F. paniculata*. Most of *Ascomycota* MOTUs were higher in rhizospheric soil, while *Mortierellomycotina* and *Olpidiaceae* MOTUs were higher in bulk soil. There are two main trends common to both plants that were found at the phylum and MOTU level: (a) *Ascomycota* are more represented in rhizosphere than in bulk soil, and (b) *Mortierellomycotina* are less represented in rhizosphere than in bulk soil. However, a few MOTUs behave different in *F. paniculata* rhizosphere. First, *Mortierellomycotina* MOTU 6 was increased in *F. paniculata* rhizosphere while *Ascomycota* MOTUs 26 and 27 were reduced in *F. paniculata* rhizosphere. Thus, fungal MOTU selection by rhizosphere seems to have a general pattern (selection of *Ascomycota*), but it seems to be a fine-tuning process.

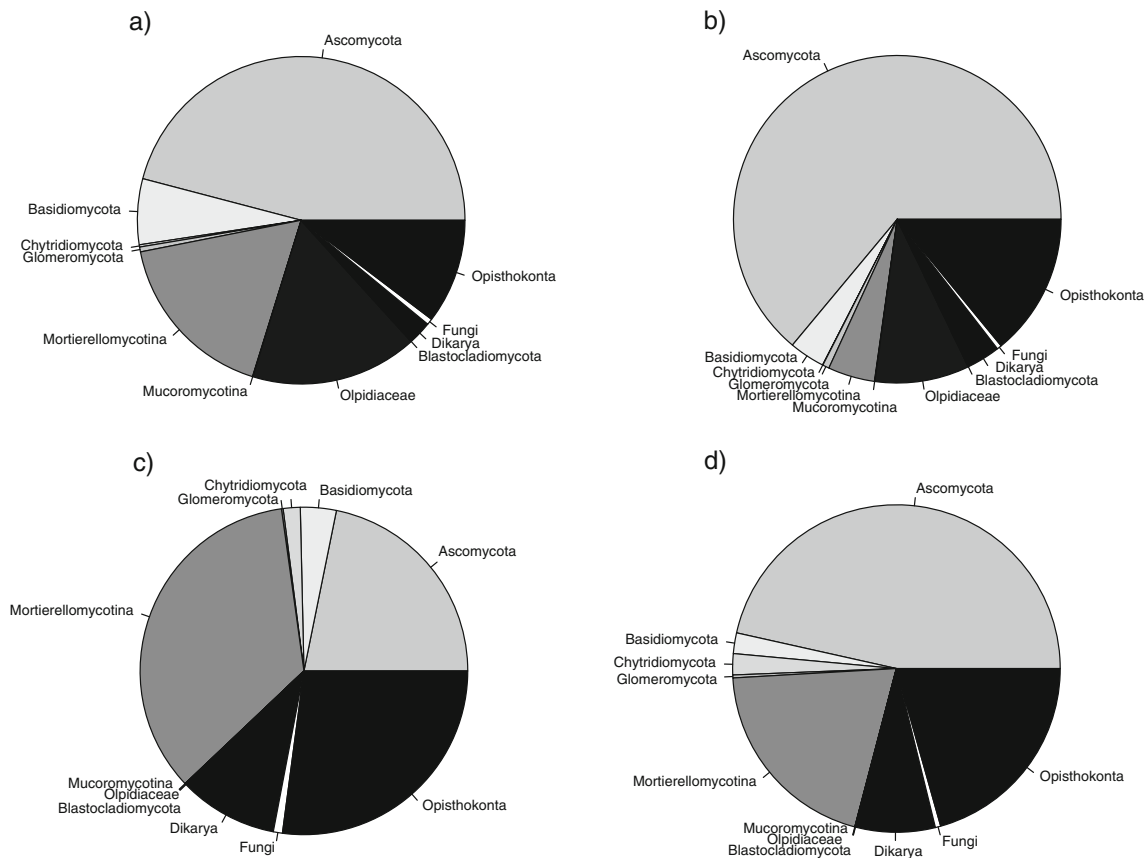


Fig. 2 Abundance of reads representing each taxon for *Dactylis glomerata* (a, b) and *Festuca paniculata* (c, d) in bulk (a, c) and rhizospheric soil (b, d)

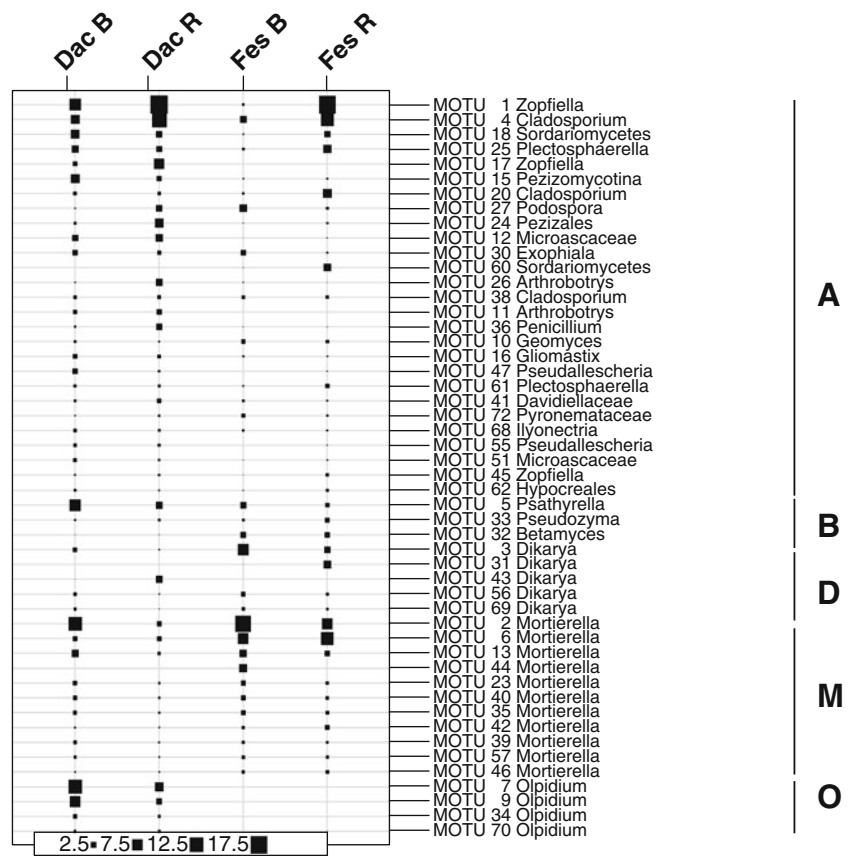
Discussion

Although many past studies have analyzed the link between plant and fungal communities, there is still a lack of studies focusing on the specific effects of plant species on the whole soil fungal community. We used microcosms in which two different species *F. paniculata* and *D. glomerata* were grown on a standard soil with or without N fertilization, and we investigated the specific effects of plant species on rhizospheric and soil fungal communities. We did not detect any fertilization effects on fungal community structure for a given plant species. First, these results support the idea that N is not the main driver for soil fungal communities. Comparable trends reported elsewhere indicate that N addition may impact fungal biomass rather than composition (Bardgett et al. 1999). Second, the observed low levels in available N in all soils suggest that fertilization was not enough to alleviate N limitation to plant growth. This was confirmed by the very small magnitude of fertilization effects on root properties, as compared to the large and significant differences across the two plant species in both root traits and fungal communities.

Consequently, in our study fungal patterns were strongly driven by plant species identity. This is consistent with prior studies (Innes et al. 2004; Helgason et al. 2002; Arfi et al. 2012) and suggests the presence of dominant fungal groups

associated preferentially with individual plant species. The strong effect of plant species on fungal communities was seen whatever the fertilization level. In contrast, most studies that have demonstrated plant species effects on fungal communities were field experiments, making it difficult to tease out potentially confounding soil effects. Our experimental design, where plants were grown for a short period, although did not permit the development of mycorrhizae on the plant roots, allowed us to isolate an independent effect of living roots and not from dead tissue. Interestingly, the mycorrhizal status of the roots of *F. paniculata* and *D. glomerata* were examined, and no fungal structure able to affect the rhizosphere and the bulk soils was observed in the roots of either plant species at the beginning or at the end of the experiment. This suggests that the observed plant effects on rhizosphere and bulk fungal communities were related only to the specificity of each species. Moreover, plant effects on fungal communities were consistent with species effects on nitrate and total soluble N concentrations as a result of their root properties: *D. glomerata*, having greater root mass, length, and area than *F. paniculata*, was able to deplete N sources more so than *F. paniculata*. This reasoning can be extended to the influence on fungal communities; *D. glomerata* influence would extend out of the rhizosphere, while *F. paniculata* action would be more restrained.

Fig. 3 Distribution of the 50 most abundant MOTUs in bulk of *D. glomerata* (*DacB*) and *F. paniculata* (*FesB*) or rhizospheric soil for *D. glomerata* (*DacR*) or *F. paniculata* (*FesR*). They account for 74.1, 73.8, 52.1, and 66.2 % of reads, respectively. MOTUs are grouped by taxa A, *Ascomycota*; B, *Basidiomycota*; D, Dikarya; M, *Mortierellomycotina*; O, *Olpidiaceae*. Scale of squares in percentage of reads (see insert at bottom left)



In addition to the large changes observed across the two grass species, the fungal composition also diverged according to the two compartments investigated: rhizosphere and bulk soils. These differences can be better understood assuming that rhizospheric MOTUs were recruited in the bulk soil. This was the case for bacterial communities that seem to be recruited from the surrounding soil (De Ridder-Duine et al. 2005). Three observations support that rhizospheric fungal MOTUs were recruited from the original soil. First, *Ascomycota* (phylum that is higher in the rhizosphere) increases from *F. paniculata* bulk soil to *D. glomerata* rhizosphere (Fig. 3 in the sequence C-D-A-B). Second, *Mortierellomycotina* (that is reduced in the rhizosphere) decreases in the same direction. Finally, the pathogenic *Olpidiaceae* is only present on *D. glomerata* soils, suggesting a recruitment specific from this plant. Furthermore, as explained above, *F. paniculata* influence on bulk soil seems to be very limited. Taken altogether, it is tempting to speculate that owing to a higher root mass, *D. glomerata* produces more diffusible organic matter (rhizodeposition?) that would extend the root influence to bulk soil (see below).

The impact of plant species and location on fungal communities was confirmed by the analysis of the composition of fungal communities associated with each plant species. Among the taxonomically assigned MOTUs, a consortium of fungi was found, with a large majority of *Ascomycota*

consistent with numerous studies on soil fungi (Jumpponen et al. 2010; Mouhamadou et al. 2011). However, the very small number of MOTUs corresponding to mycorrhizal fungi in soils (*Glomeromycota*) could result from biases related to the fungal primers used in this study. These primers have been tested in silico using the program ECOPCR (Ficetola et al. 2010). Although a relative low proportion of *Glomeromycota* sequences could be amplified in comparison to other fungal phyla, these primers allow us to study the impact of plant species and location on the whole fungal community. The differences of fungal pattern observed between both plant species and between locations are reflected by the global composition of fungal communities and suggest that each plant recruited from the alien soil rather than carryover (see above). More interestingly, in *F. paniculata* and *D. glomerata* rhizospheric soils, fungal communities were similar at least in the content of *Ascomycota*. This suggests that both plants act through the same mechanisms on the rhizospheric communities, probably through rhizodeposition (Millard and Singh 2010). In addition, the fact that *D. glomerata* had a greater root development likely led to a larger secretion, resulting in a larger influence of this species on bulk soil fungal communities. Fungal communities from bulk soils were significantly different from these rhizospheric ones. However, the shift between the bulk and rhizospheric communities was less pronounced under *D.*

glomerata than under *F. paniculata*. This finding suggests a greater effect of rhizodeposition on *D. glomerata* bulk soil communities possibly by a larger diffusion of root secretions due to its large root biomass.

Plant species and location effects were also analyzed for the 50 most abundant fungal MOTUs (Lentendu et al. (2011)). Species and location effects were then reflected more by differences in the MOTU abundance rather than the selection of specific MOTUs by each plant species. This is consistent with a prior study that showed the effects of plant species via the secretion of rhizodeposition on the abundance of fungal communities (Broeckling et al. 2007).

Our study based on 454 sequencing and measurement of abiotic factors and plant root properties clearly demonstrated that plant species identity was the main determinant of soil fungal communities. These plant species effects may be linked to their root growth strategy and probably via rhizodeposition. This is in line with other studies that have reported a strong modification of fungal communities according to plant species. Future studies are required to demonstrate such effects across broad ranges of plant species and to confirm their relevance to field conditions.

Acknowledgments This research was conducted on the long-term research site Zone Atelier Alpes, a member of the ILTER-Europe network. The authors are grateful to Nael Mouhamadou and Viviane Barbreau for their help, reading, and kind comments. The authors would like to thank A.F. Ameline, A.S. Desfeux, J. Bonnefoy, and R. Ségura for technical assistance. This study was conducted as part of ERA-Net BiodivERsA project VITAL, ANR-08-BDVA-008.

References

- Abarenkov K, Nilsson R, Larsson KH, Alexander I, Eberhardt U, Erland S et al (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *New Phytol* 186:281–285
- Akiyama H, Hayashi H (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot* 97:925–931
- Allison SD, Hanson CA, Treseder KK (2007) Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biol Biochem* 39:1878–1887
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Aust Ecol* 26:32–46
- Arfi Y, Buée M, Marchand C, Lévassieur A, Record E (2012) Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiol Ecol* 79:433–444
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266
- Bardgett RD, Lovell RD, Hobbs PJ, Jarvis SC (1999) Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands. *Soil Biol Biochem* 31:1021–1030
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13
- Bertin C, Yang X, Leslie WA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67–83
- Bezemer TM, Lawson CS, Hedlund K, Edwards AR, Brook AJ, Igual JM, Mortimer SR, Van Der Putten WH (2006) Plant species and functional group effects on abiotic and microbial soil properties and plant–soil feedback responses in two grasslands. *J Ecol* 94:893–904
- Bouasria A, Mustafa T, De Bello F, Zinger L, Lemperiere G, Geremia RA, Choler P (2012) Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. *Eur J Soil Biol* 52:49–66
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27:325–349
- Broeckling CD, Broz KA, Bergelson J, Daniel K, Manter DK, Vivanco JM (2007) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* 74:738–744
- Cesco S, Mimmo T, Tonon G, Tomasi N, Pinton R, Terzano R, Neumann G, Weisskopf L, Renella G, Landi L, Nannipieri P (2012) Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. *Rev Biol Fertil Soils* 48:123–149
- Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plant Nutr* 23:867–902
- Cornelissen JHC, Aerts R, Cerabolini B, Werger MJA, van der Heijden MGA (2001) Carbon cycling traits of plant species are linked with mycorrhizal strategies. *Oecologia* 129:611–619
- Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G, Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol* 56:236–249
- De Deyn GB, Quirk H, Bardgett RD (2011) Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biol Lett* 7:75–78
- De Ridder-Duine AS, Kowalchuk GA, Klein Gunnewiek PJA, Smart W, van Een JA, de Boer W (2005) Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol Biochem* 37:349–357
- Donnison LM, Gwyn S, Hedgerb GJ, Hobbs PJ, Bardgett RD (2000) Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol Biochem* 32:253–263
- Epp L, Boessenkool S, Bellemain EP, Haile J, Esposito A, Riaz T et al (2012) New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Mol Ecol* 21:1821–1833
- Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320:1034–1039
- Ficetola GF, Coissac E, Zundel S et al (2010) An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* 11:434
- Fog K (1988) The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biol Rev* 63:433–462
- Frey SD, Knorr M, Parrent JL, Simpson RT (2004) Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For Ecol Manag* 196:159–171
- Grasse L, Wittenmayer L (2000) Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *J Plant Nutr Soil Sci* 163:381–385
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30:369–378
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *J Ecol* 90:371–384

- Innes L, Hobbs PJ, Bardgett RD (2004) The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. *Biol Fertil Soil* 40:7–13
- Jumpponen A, Jones KL, David Mattox J, Yaege C (2010) Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Mol Ecol* 19:41–53
- Kruskal W, Wallis A (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583–621
- Lavorel S, Grigulis K, Lamarque P, Colace MP, Garden D, Girel J, Douzet R, Pellet G (2011) Using plant functional traits to understand the landscape-scale distribution of multiple ecosystem services. *J Ecol* 99:135–147
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, Aldrich-Wolfe L, Morton JB (2007) Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol* 95:95–105
- Lekberg Y, Meadow J, Rohr JR, Redecker D, Zabinski CA (2011) Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology* 92:1292–1302
- Lentendu G, Zinger L, Manel S, Coissac E, Choler P, Geremia RA, Melodelima C (2011) Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. *Fungal Divers* 49:113–123
- McArdle BH, Anderson MJ (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82:290–297
- Millard P, Singh BK (2010) Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? *Nutr Cycl Agroecosyst* 88:147–158
- Mouhamadou B, Molitor C, Baptist F, Sage L, Clément JC, Lavorel S, Monier A, Geremia RA (2011) Differences in fungal communities associated to *Festuca paniculata* roots in subalpine grasslands. *Fungal Divers* 47:55–63
- Needleman SB, Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48:443–453
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Gavin L (2009) *vegan: Community Ecology Package*. R package version 1.15–4
- Pakeman RJ (2011) Multivariate identification of plant functional response and effect traits in an agricultural landscape. *Ecology* 92:1353–1365
- Pearson WR (2000) Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* 132:185–219
- Personeni E, Nguyen C, Marchal P, Pages L (2007) Experimental evaluation of an efflux–influx model of C exudation by individual apical root segment. *J Exp Bot* 58:2091–2099
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–163
- Rillig MC, Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* 171:41–53
- Schnoor TK, Lekberg Y, Rosendahl S, Olsson PA (2011) Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal fungal communities in semi-natural grassland. *Mycorrhiza* 21:211–220
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS (2010) Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat Rev Microbiol* 8:779–790
- Standing D, Killham K (2007) The soil environment. In: Van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT (eds) *Modern soil microbiology*, 2nd edn. CRC, Boca Raton, pp 1–21
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint JP, Vierheilig H (2007) Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant–fungus interactions. *Molecules* 12:1290–1306
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 217–221
- Turnau K, Haselwandter K (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi: an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. In: Gianinazzi S, Schuepp H (eds) *Mycorrhizal technology: from genes to bioproducts*. Birkhauser, Basel, pp 137–149
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296–310
- van Dongen S (2000) Graph clustering by flow simulation. Ph.D. thesis, University of Utrecht
- Wardle DA, Barker GM, Bonner KI, Nicholson KS (1998) Can comparative approaches based on plant ecophysiological traits predict the nature of biotic interactions and individual plant species effects in ecosystems? *J Ecol* 86:405–420
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Wim H, van der Putten WH, Wall DH (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304:1629–1633
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, New York
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, Bouasria A, Aubert S, Geremia RA, Choler P (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS One* 6:e19950

Annexe 4

Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere

San Miguel A, Roy J, Gury J, Monier A, Coissac E, Ravanel P, Geremia R A, Raveton M

2014, *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 4257-4266.

Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere

Angélique San Miguel · Julien Roy · Jérôme Gury ·
Armelle Monier · Eric Coissac · Patrick Ravanel ·
Roberto A. Geremia · Muriel Raveton

Received: 12 September 2013 / Revised: 8 January 2014 / Accepted: 9 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract This study investigated the impacts of an organochlorine (OC, γ -hexachlorocyclohexane and chlorobenzenes) mixture on microbial communities associated to *Phragmites australis* rhizosphere. Seventy-eight distinct colony morphotypes were isolated, cultivated and analysed by 16S rDNA sequence analysis. Toxicity tests confirmed sensitivity (e.g. *Hevizibacter*, *Acidovorax*) or tolerance (e.g. *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*) of isolates. Rhizosphere analysis by pyrosequencing showed the microbial adaptation induced by OC exposure. Among the most abundant molecular operational taxonomic units, 80 % appeared to be tolerant (55 % opportunist, 25 % unaffected) and 20 % sensitive. *P. australis* rhizosphere exposed to OCs was dominated by phylotypes related to α -, β - and γ -Proteobacteria. Specific genera were identified which were previously described as chlorinated organic pollutant degraders: *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Devosia* sp. and *Sphingobium* sp. *P. australis* could be suitable plants to maintain their rhizosphere active microbial population which can tolerate OCs and potentially improve the OC remediation process in part by biodegradation.

Keywords Organochlorines · *Phragmites australis* · Rhizosphere · Microbial community · Bacteria

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-014-5545-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. San Miguel · A. Monier · E. Coissac · P. Ravanel ·
R. A. Geremia · M. Raveton (✉)
Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS n°5553, Université
Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France
e-mail: muriel.raveton@ujf-grenoble.fr

J. Roy · J. Gury
IPREM-BEEM, UMR CNRS 5254, IBEAS, Université de Pau et des
Pays de l'Adour, Pau, France

Introduction

Organochlorines (OCs) are part of ubiquitous pollutants in aquatic and soil environments, generated from anthropogenic activities and are intensively used in industrial process and agricultural applications (Vijgen et al. 2011). Lindane (γ -hexachlorocyclohexane, γ HCH) was one of the most extensively used OCs to control a wide range of agricultural, horticultural and public health pests. Intermediate substances in the production process often include several isomers, chlorinated phenols and benzenes. The use and production of the OCs has resulted in environmental contamination of global dimensions, and their high stability for the majority of them generates serious problems in a variety of circumstances around the world (Vijgen et al. 2011). The OCs contaminating most polluted sites are a complex mixture of chlorobenzenes, chlorophenol, chlorinated solvents and benzene (Feidieker et al. 1995; Braeckevelt et al. 2008).

A cost-effective and environmentally friendly technology for decontamination of soils and sediments, which potentially could be applied to large-scale areas, is phytoremediation associated with microorganisms (Chaudhry et al. 2002). A promising phytoremediation technology is to utilize constructed wetlands (CW) for their plant diversity (phytoplankton, hydrophytes, helophytes) and their anaerobic/aerobic mixing zones in sediments. CW can be easily integrated into the landscape and may lead to an efficient removal of organic contaminants (Lorah and Voytek 2004). Wetland plants, such as *Phragmites* sp. and *Typha angustifolia*, have shown potential for the phytoremediation of chlorinated contaminants (Ma and Burken 2002; Miglioranza et al. 2004; Zhang et al. 2005; Gomez-Hermosillo et al. 2006; Monferran et al. 2007; Ma and Havelka 2009; Faure et al. 2012; San Miguel et al. 2013). Recent studies demonstrate significantly enhanced dissipation and/or mineralization of persistent organic pollutants at the root–soil interface or rhizosphere (Kuiper et al. 2004; Krutz et al. 2005; Kidd et al. 2008; Gerhardt et al. 2009).

The rhizosphere is a densely populated area in which elevated microbial activities are observed and plant roots interact with soil microorganisms through exchanges of nutrients, growth factors, etc. (Bais et al. 2006; Abhilash et al. 2009). Plants are able to stimulate the rhizosphere community influencing its biodegradation capacities in different ways: increase pollutant bioavailability, induce enzyme activities involved in the degradation process and/or selectively increase the number and activity of pollutant degraders (Macek et al. 2000; Miya and Firestone 2001; Shaw and Burns 2007). Phytoremediation, including rhizoremediation, appears to be particularly effective due to complementary process where plants draw pollutants into their rhizosphere via the transpiration stream; subsequently, the microbe-mediated degradation occurs in the rhizosphere, in the plant itself or in both (Barac et al. 2004; Muratova et al. 2008). Microbial biodegradation of OCs occurs both in anaerobic and aerobic compartments (Adrian et al. 2000; Ricking and Schwarzbauer 2008; Lal et al. 2010). Isolated OC degraders mostly belong to Proteobacteria (e.g. *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Acidovorax* sp., *Burkholderia* sp., *Pandoraea* sp.) (Field and Sierra-Alvarez 2008; Ricking and Schwarzbauer 2008; Lal et al. 2010), Cyanobacteria (e.g. *Anabaena* sp., *Nostoc* sp.) (Bueno et al. 2004), Firmicutes (e.g. *Bacillus* sp.) (Phillips et al. 2005), Actinobacteria (e.g. *Microbacterium* sp.) (Manickam et al. 2006) or Chloroflexi (e.g. *Dehalococcoides* sp.) (Adrian et al. 2000). Therefore, the success of such phytoremediation technologies is strongly linked to a selective rhizospheric microflora and to a tolerant plant. Assessing the diversity, distribution, physiology and ecology of rhizospheric microorganisms is a prerequisite for successful application of phytoremediation processes.

In this study, we aimed at exploring the in situ microbial community adaptation of *Phragmites australis* rhizosphere exposed to OCs. Plants were submitted to different chemical pressures inside the experimental pots, and rhizosphere bacteria were isolated and characterized by comparative sequence analysis of partial 16S RNA genes. Tests of sensitivity/tolerance of isolated bacteria were performed in the presence of OCs. The global rhizosphere microbial communities were characterized by pyrosequencing of 16S rRNA (*rss*) amplicons. By combining gene community profiling with multivariate statistical analysis, we attempted to determine OC effects on diversity and structure of microbial communities in the *P. australis* rhizosphere.

Materials and methods

Experimental design and sampling collections

Experimental design was based on patent FR 961504 A1 (Antoinette et al. 2011). Experiments were carried out in pots

(100×100×100 cm), which were supplied with a hydraulic flow rate of 0.08 m³ h⁻¹. Each pot was filled with organic matter (0.6 m³, peat) and planted with common reed (*P. australis*, 15 plants/m²). These pots were cultivated during 2 months before the beginning of experiments (Fig. 1). Based on previous studies (Cottin and Merlin 2010), pot 1 (P1) was treated by tap water contaminated by a mixture of organochlorines: 0.1 mg L⁻¹ γ HCH, 0.3 mg L⁻¹ monochlorobenzene (MCB), 1 mg L⁻¹ 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB) and 15 mg L⁻¹ for Σ TCB (1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene, 30 and 70 % of the final concentration, respectively). Leachates from P1 were collected and spiked in pot 2 (P2) and leachates from P2 in pot 3 (P3). The experimental timescale was 45 days in environmental conditions (July–August 2008). One control pot planted with *P. australis* was supplied with water and kept in the same environmental conditions.

Samples of rhizosphere were collected from *P. australis* growing in P1, P2, P3 and control at 15 and 45 days after the first exposure. Root samples were taken from three different plants per conditions, by cutting roots from top soil to 20–25-cm depth. The roots were shaken vigorously to separate loosely held soil from the roots. The soil, tightly adhering to the roots, was termed as “rhizosphere soil”.

Isolation of cultivable strains

Rhizosphere soil was removed by vortexing around 5 g of fresh root material (20 min) in 20 ml of reverse osmosis sterile water and collecting the precipitated soil after centrifugation at 9,000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet was then suspended in M9 medium and plated onto agar mediums Luria-Bertani (LB) and LB diluted to 1/10. These plates were incubated for 7 days at 27 °C aerobically. All morphologically different bacterial colonies were selected and subcultured three times onto agar 1/10 LB medium to ensure purity and stability.

DNA extraction and sequencing of cultivable strains

Individual selected colonies were suspended in 500 μ L sterilized deionized water, frozen at –20 °C during 24 h and thawed to release the DNA (Zinger et al. 2009). Bacterial DNA was then amplified using microbial community-specific primers. Partial *rss* gene was amplified using primers 27f (5'-GAGTTT GATCMTGGCTCAG-3') and com2ph (5'-CCGTCAATTC CTTTGAGTTT-3') (Marchesi et al. 1998; Schmalenberger et al. 2001). The PCR reactions (25 μ L) were set up with, 2.5 mM MgCl₂, 10 \times of AmpliTaq Gold™ buffer, 20 g L⁻¹ of bovine serum albumin, 0.1 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.4 μ M of each primer, 0.6 U tag gold polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 1 μ L DNA.

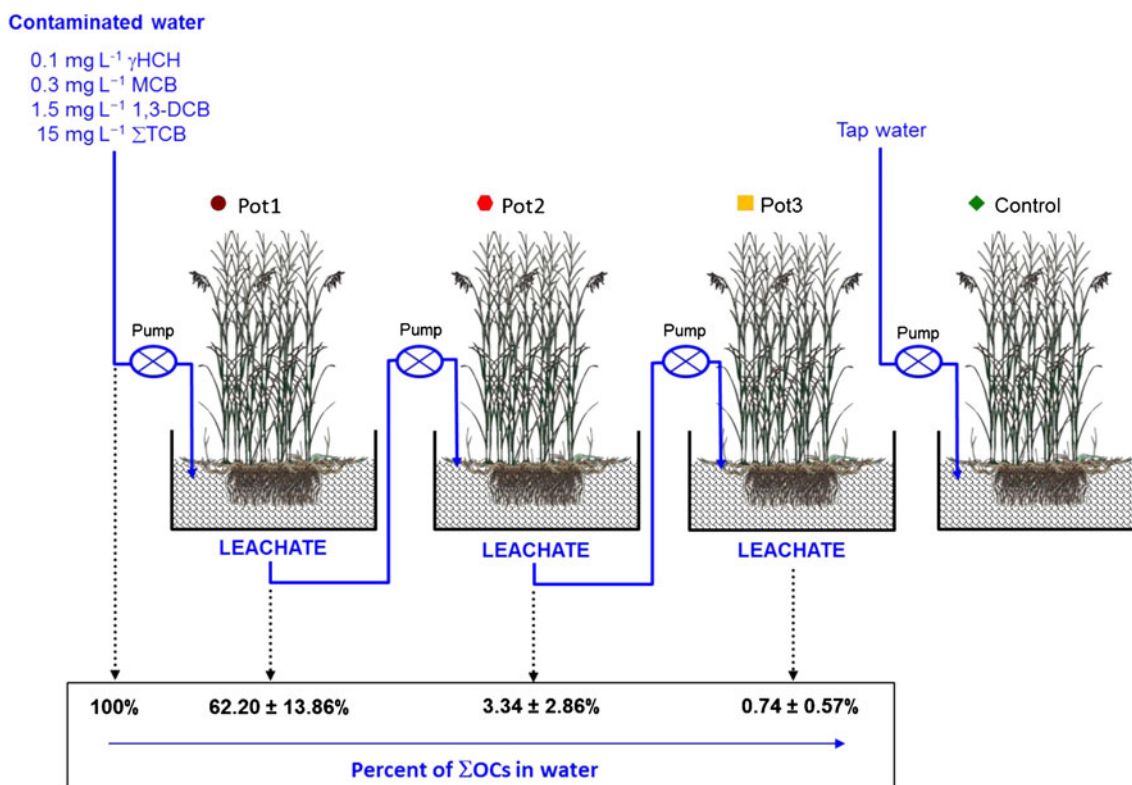


Fig. 1 Experimental pilot plant constructed wetland and efficiency of organochlorine phytoremediation (Antoinette et al. 2011)

The thermal PCR profile was performed following different steps: an initial step at 95 °C (10 min), followed by 30 cycles at 95 °C (30 s), 56 °C (15 s) and 72 °C (15 s) and a final step at 72 °C (7 min). The PCR products were visualized on a 1.6 % agarose gel and further submitted to automatic Sanger sequencing in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The sequence data was checked manually and deposited in EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/HG322871-HG322948>). The taxonomic position was attributed using Classifier from Ribosomal Database Project (RDP) (Wang et al. 2007). The sequences were compared to the Nucleotide Sequence Database of GenBank using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al. 1990). The 100 % similar sequences were used for taxonomic assignment, and other similar sequences were used as reference in phylogenetic analysis.

Single-strand conformation polymorphism analyses of microbial diversity

DNA from 250 mg (fresh weight) per sample of rhizospheric soil (roots from three different plants per condition), obtained as described above, was extracted using the PowerSoil™ Extraction Kit (MO BIO Laboratories, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) following the manufacturer's instructions

and the concentration was obtained using a NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Genetic profiles of the bacterial community were generated with the single-strand conformation polymorphism (SSCP) method as described previously (Zinger et al. 2007). The V3 region of the 16S rRNA (*rss*) gene was amplified using microbial community-specific primers, W49 (5'-ACGGTC CAGACTCTACGGG-3') and W104-FAM (5'-GTGCCA GCAGCCGCGGTAA-3') labelled with 50-fluorescein phosphoramidite (FAM) and submitted to capillary electrophoresis-SSCP (CE-SSCP) as described later.

The PCR mixtures (25 µL) were set up with 2.5 mM of MgCl₂, 1× of AmpliTaq Gold™ buffer, 20 g L⁻¹ of bovine serum albumin, 0.1 mM of each dNTP, 0.26 mM of each primer, 2 U Taq gold polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 1 µL of DNA (1–10 ng DNA) (Gury et al. 2008). The following PCR reaction was performed: an initial denaturation at 95 °C (10 min), followed by 30 cycles at 95 °C (30 s), 56 °C (15 s) and 72 °C (15 s) and the final elongation step at 72 °C (7 min). The PCR products were visualized on a 1.6 % agarose gel.

PCR products were separated by capillary electrophoresis performed on an ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using a 36-cm-length capillary. The CE-SSCP reactions were prepared as

described previously by Zinger et al. (2007). The CE-SSCP profiles were then normalized in order to control for differences in the total fluorescence intensity between profiles. The normalized profiles of SSCP were analysed by neighbour-joining analysis. The robustness of the resulting tree was assessed using 1,000 bootstraps. The data analysis was performed using the APE package of the R software (R Development Core Team 2011).

Bacterial community analysis by 454 pyrosequencing

Rhizospheric DNA (extracted from 250-mg fresh weight per sample in triplicate at 15 days and hexaplicates at 45 days) was extracted as described above. The *rss* primers adapted to 454 pyrosequencing were designed using EcoPrimer (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/ecoPrimers/wiki/WikiStart>; Riaz et al. 2011) and RDP database. First, the RDP database (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) release 10 was filtered to keep only complete sequences with a taxonomic annotation; the resulting database contains 63,319 sequences representing 28,782 species. Second, using the EcoPrimer, we selected primers amplifying fragments between 150 and 430 bp allowing two mismatches and with a strict 3' end match. The taxonomical specificity and coverage were evaluated with *ecoTaxSpecificity* and *ecoTaxStat* from the OBITools suite (see below). The primer couple 5'CCTACGGGAGGCAG CAGT3'/5'CTACCAGGGTATCTAATC3' covering the regions V3 and V4 (400–430 nt) was selected. All primers were modified by the addition of specific tags (7-mer) on the 5' end to allow the assignment of sequence reads to the relevant sample. The 7-mer nucleotides were designed using *oligoTag* (<http://www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools>) with at least three differences among the tags, without homopolymers longer than two bases and avoiding a C on both 3' and 5' end. Additionally, the sequencing primers were added at the 5' end of the sample tags. DNA amplifications were carried out as described above, but using 0.05 mM of each dNTP and 0.2 μ M of each primer. Seven PCR reactions were performed for each sample. All the PCR products from the different samples were first titrated using capillary electrophoresis (QIAxel, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). DNA extracts of the three replicates per condition were pooled (in equimolar concentration, one sample per condition at 15 days, two samples per condition at 45 days) to get a composite sample before the sequencing as recommended in other reports (Zinger et al. 2011).

The sequencing was carried out on the Roche Sequencer GS FLX Titanium series (454 Life Sciences GS FLX System, Roche, Basel, Switzerland) by DNAVision (Charleroi, Belgium). A representative sequence of the most important clusters (Fig. 4) was deposited in EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/HG532024-HG532065>). The

complete dataset is available from Dryad (<http://datadryad.org/>, doi to be attributed after acceptance of the article).

Sequence analysis and taxonomic assignment

The sequence reads were analysed using the OBITools (www.prabi.grenoble.fr/trac/OBITools). First, primers and tags were identified using the *fasta454Filter* tool. Only sequences with perfect match on tags with a maximum of two errors on primers were taken into account. The amplified regions, excluding primers and tags, were kept for further analysis and displayed a bimodal distribution with peaks at 402 and 428 nt. Sequences shorter than 350 nt or containing ambiguous nucleotides were excluded. A total of 116,066 reads were recovered after filtering. The redundant reads were then dereplicated using *obiuniq*, producing a set of 88,286 dissimilar (unique) sequences, which were used for subsequent analyses. Samples displaying less than 800 reads were removed from the dataset (control at 15 days and one control at 45 days).

Creating molecular operational taxonomic unit clusters and calculating richness

For Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) definition, the unique sequences were aligned using an exact global alignment algorithm running in “sumatra” software (Riaz et al. 2011). MOTUs were created from the distance matrix by using the non-hierarchical clustering method Markov clustering (MCL). This clustering step was applied at a similarity threshold of 97 % and produced an abundance matrix of MOTUs per locations, which was then used for subsequent diversity analyses. MOTUs with an occurrence ≤ 10 reads (representing 27 % of total reads) were excluded from the analysis. Finally, the most represented sequences for each cluster (≤ 3) were identified using the RDP Classifier (Wang et al. 2007). This taxonomic assignment was kept for further analysis. To compare cultured strains and with MOTUs, the sequences from the cultivate strains were compared to the pyrosequencing dataset using BLAST (Altschul et al. 1990).

Statistical analyses

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination analysis based on a dissimilarities matrix computed using the Bray–Curtis distance was firstly used to compare the dissimilarities of rhizosphere microbial communities between conditions (vegan R package; Oksanen et al. 2011). This method consists in an iterative algorithm in order to reduce multidimensional dissimilarities data to a low-dimensional ordination indicating relative similarity of samples through relative ordination distance (so that, e.g. very similar samples

are close together). Further, NMDS solution was obtained using Kruskal's stress value, which should be less than 0.2 to give an accurate picture. Rhizosphere bacterial community ordinations and distributions of the different samples were then represented in a plot of the first two NMDS solution dimensions. NMDS was performed using both a complete dataset and a dataset containing only the most abundant MOTUs in order to assess if patterns observed could be attributed to the abundant MOTUs. Most abundant MOTUs were MOTUs whose count represented more than 1 % of all the reads. Procrustean analysis was used to assess the overall degree of correlation between the two NMDS ordinations. A non-parametric multivariate analyses of variance, with the R "adonis" function (Anderson 2001), was used to test for the effect of the different conditions on bacteria assemblages. Significance for both procrustean and multivariate analyses of variance was assessed by the mean of 999 Monte Carlo permutations procedure.

Abundance of MOTUs between samples

On the basis of the extensive sequence data, a rank abundance distribution (RAD) was modelled. That kind of analysis can provide an integrated understanding of the underlying ecological rules that govern microbial diversity and abundance (McGill et al. 2007). Then, in regard to the results obtained, we choose to select the 42 most abundant MOTUs (>1 %) which account for 47.3 % of all the sequences, to have a visual abundant representation of each MOTU from all conditions.

The relative abundance of specific bacterial groups was studied and gave us a frequency of each MOTU within each sample.

All statistical analyses were carried out with the R 2.13.1 software (R Development Core Team 2011) using the vegan 2.0-0 (Oksanen et al. 2011), ade4 (Dray and Dufour 2007), BiodiversityR (Kindt and Coe 2005) and APE packages (Paradis et al. 2004).

Results

Isolation of cultivable bacteria strains from *P. australis* rhizosphere

The selection of morphologically different colonies from cultures inoculated with soil rhizosphere resulted in 78 stable strains. Cultured strains were identified through *rss* sequencing and subsequent classification using RDPII tools. A phylogenetic tree is shown in Fig. S1 in the Supplementary Material. These strains clustered into four different phyla, including three classes of Proteobacteria (α -, β - and γ -). Most of the isolates were commonly found in all conditions tested from control to OC exposures. Strains belonging to

Pseudomonas sp., *Sphingomonas* sp. and *Microbacterium* sp. were isolated from all pots (P1, P2, P3 and control; Fig. S1 in the Supplementary Material) and were also tolerant to OC exposures (Table S1 in the Supplementary Material). Nevertheless, *Flavobacteria* and *Sphingobacteria* classes were only isolated from rhizosphere in control and P3 conditions, suggesting their sensitivity to OCs. This sensitivity was confirmed by their inability to grow in the presence of any of the OC compounds (Table S1 in the Supplementary Material). On the other hand, isolates belonging to *Firmicutes* sp. were only isolated from rhizosphere in P1 and P2 conditions, which contain high concentrations of OCs. Isolates as *Exiguobacterium* sp., *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. showed tolerance to OC compounds (Table S1 in the Supplementary Material).

Effect of OCs on microbial diversity

The bacterial community composition of *P. australis* rhizosphere exposed or not to OCs was monitored using molecular profiling by CE-SSCP (Fig. 2). At the initial time, rhizosphere bacterial community profiles were similar for all treatments (data not shown). After 45 days, each treatment was separated on a single branch and triplicates were consistent. P1 and P2 bacterial community profiles showed clear differences compared to the control and the P3 profiles, indicating that OC exposures caused significant disturbances on the bacterial community profiles of *P. australis* rhizosphere.

Changes on bacterial community composition

The composition of bacterial communities was assessed by 454 pyrosequencing. Low two-dimensional stress values (<20 %) for NMDS ordinations were obtained in all conditions, indicating minimal changes in the localization of the

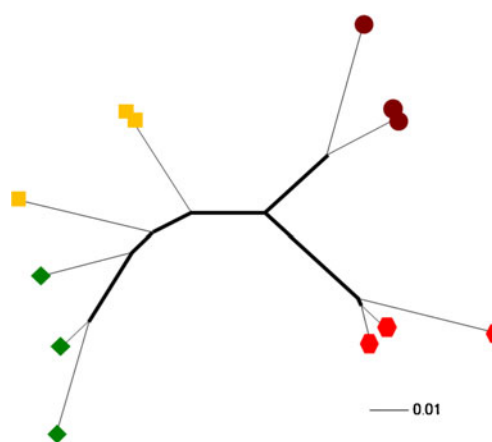


Fig. 2 Neighbour-joining tree of molecular profiles from rhizospheric bacterial communities in pot 1 (maroon circles), pot 2 (red hexagons), pot 3 (yellow squares) and control (green diamonds). Samples after 45 days of exposure were evaluated by CE-SSCP. Thick lines indicate branches supported by a bootstrap value of >500

samples onto the ordination and in their original dissimilarities. Therefore, NMDS could be made with confidence (Fig. 3). The NMDS ordination suggested the presence of three groups: one for P1, a second for P2 and a third group comprising the P3 (the less contaminated sample) and control (Fig. 3a). These results are consistent with the SSCP. When using the 42 most abundant MOTUs (Fig. 3b), the NMDS ordination is highly correlated with the previous one

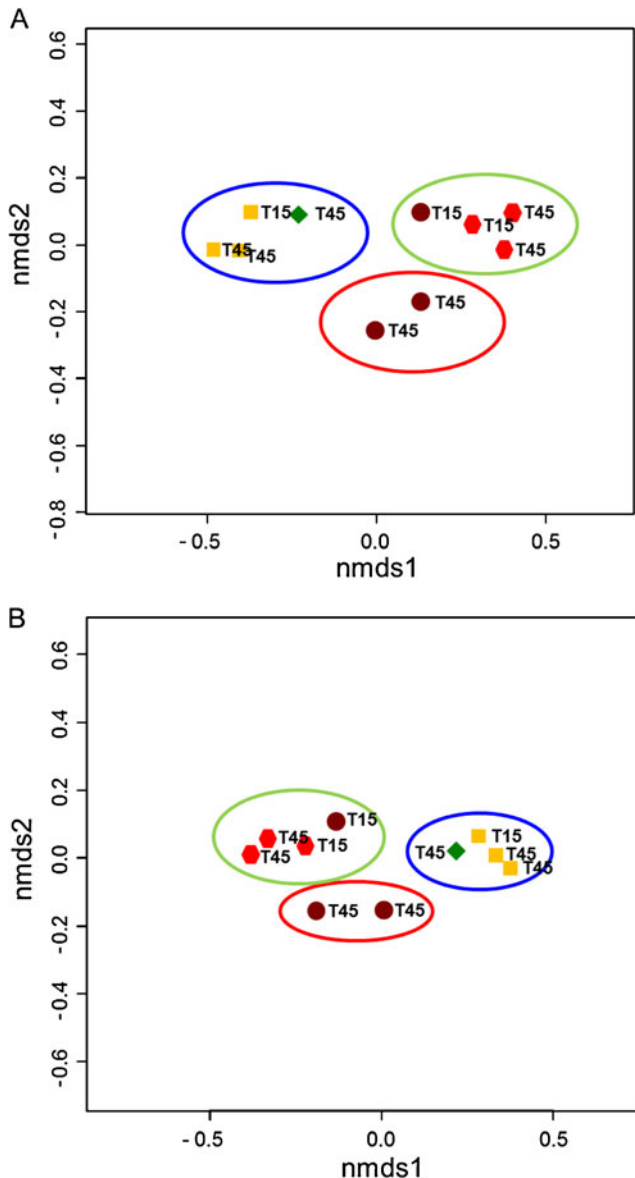


Fig. 3 Two-dimensional NMDS ordination using Kruskal's stress value as a measure of dissimilarities in pot 1 (maroon circles), pot 2 (red hexagons), pot 3 (yellow squares) and control (green diamonds). MOTUs were identified according to their treatment category. T15, samples at 15 days; T45, samples at 45 days. **a** Bacterial dissimilarities computed with all MOTUs. Stress value 1.53 %. **b** Bacterial dissimilarities computed with abundant MOTUs. Stress value 2.38 %. Regarding conditions of exposure, $p=0.001$ and $r^2=0.617$. Regarding time exposure, $p=0.035$ and $r^2=0.164$

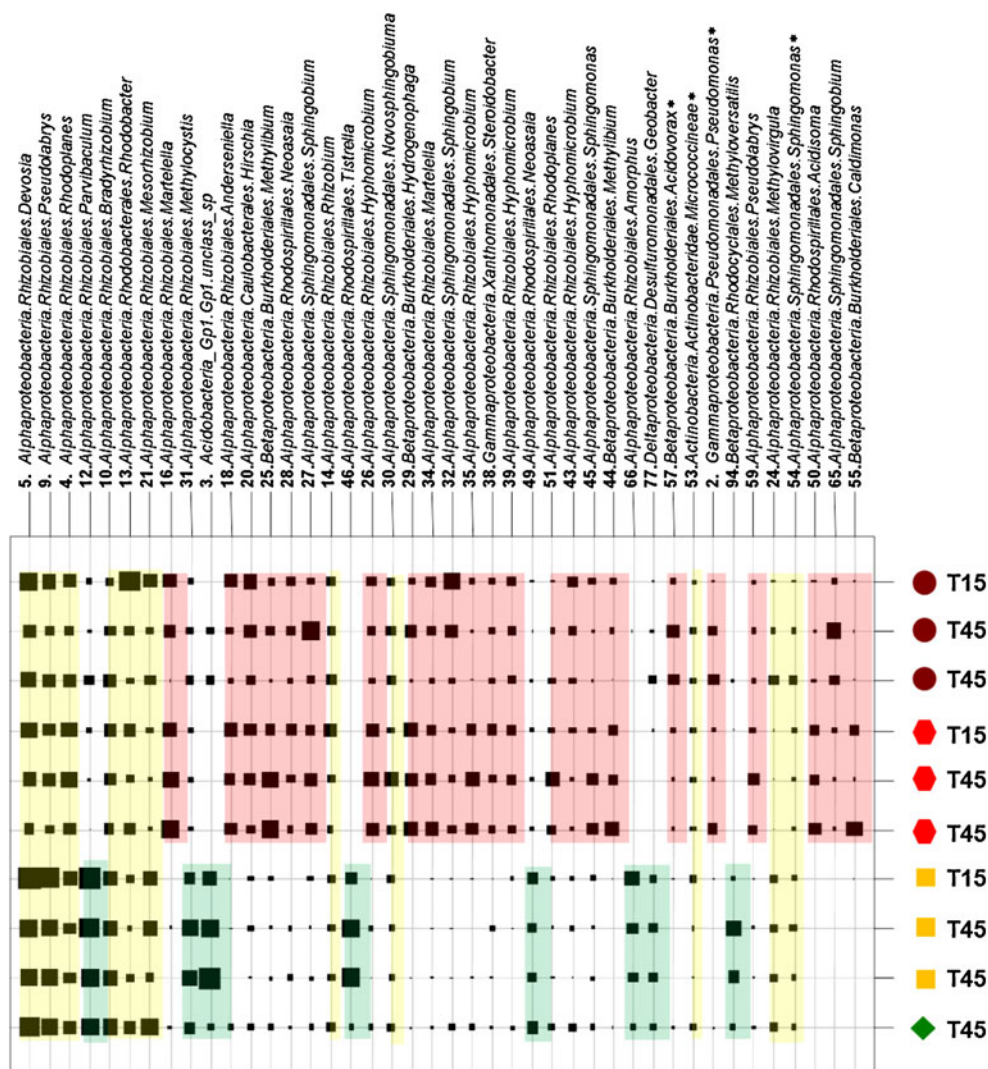
(procrustean analysis $r=0.97$, $p<0.001$). These results justified our choice to search for site specificity for the most abundant MOTUs that seemed to play a major role in the variation of communities' composition. The blue group consists of P3 and the control sample (without OCs), indicating the concentrations of OCs used had a little effect on bacterial communities. The second group in green consists of P2 at 15 and 45 days and P1 at 15 days of treatment, suggesting disturbance inside the communities by the OC cocktail at intermediate concentrations, in P2 and at the highest concentrations and in P1 after 15 days of treatment. In P2, rhizospheric bacterial communities seemed to be stabilized between 15 and 45 days of treatment. The last case in red, representing the most contaminated condition P1 at 45 days, showed another distribution from the others. Indeed, the P1 case with a high chemical pressure had its rhizospheric microbial composition changing and showed no sign of stabilization after 15 days, moving until 45 days of exposure. All these results complemented our previous observations (Fig. 2). Thus, the found pattern indicated that OC chemical pressure plays a role on the composition of the rhizospheric bacterial communities, influencing their composition and their distribution.

Abundance of most representative MOTUs

The monitoring of bacterial communities showed a significant structuring of communities according to the amplitude of OC chemical pressure (Fig. S2 in the Supplementary Material). This disparity was expressed by the differences in abundance of some bacterial MOTUs selected or counter-selected by the exposure to OCs (Fig. 4). In the most populated MOTUs, four of the previous isolated strains (Fig. S1 in the Supplementary Material) from *P. australis* rhizosphere were detected (Fig. 4). Differences of sensitivity were observed with decreases or losses of certain bacterial MOTUs at the highest concentrations. MOTU numbers 12, 31, 3, 46, 49, 66, 77 and 94 (associated respectively with *Parvibaculum* sp., *Methylocystis* sp., *Acidobacteria* Gp1, *Tristella* sp., *Neosassa* sp., *Amorphus* sp., *Geobacter* sp., *Methyloversatilis* sp.) showed sensitivity to the OCs. In addition, many OC-tolerant strains showed no changes in abundance of their community with increased OC doses (e.g. MOTU numbers 5, 9, 4, 10, 21, 14, 30, 53, 24 and 54: *Devosia* sp., *Pseudolabrys* sp., *Rhodoplanes* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Novosphingobium* sp., *Micrococcineae* sp., *Methylovirgula* sp., *Sphingomonas* sp.). Interestingly, MOTU53 and 54 display a high sequence identity with strains F1H1, Effluent 2 and Effluent12 that are resistant to OCs.

The third case was observed with a significant increase of some bacterial strain abundance (Fig. 4). Rhizospheric

Fig. 4 Spatial and temporal distribution of the main MOTUs. The columns in the diagram represent the 42 most abundant MOTUs. The lines in the diagram represent samples in pot 1 (maroon circles), pot 2 (red hexagons), pot 3 (yellow squares) and control (green diamonds). Square size indicates the frequency of strains in each sample: 0.01 (square with the smallest size), 0.03 (square with a smaller size), 0.05 (square with a small size) and 0.07 (square with a big size). Colour indicates the distribution of strains as opportunist (light pink), sensitive (light blue) and unaffected (light yellow). T15, samples at 15 days; T45, samples at 45 days. The asterisks indicate similar to cultivated strains (Table S1 in the Supplementary Material)



bacterial communities of plants exposed to OCs were dominated by the orders *Rhizobiales*, *Caulobacterales*, *Burkholderiales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales* and *Xanthomonadales* (e.g. MOTU numbers 16, 18, 20, 25, 28, 27, 26, 29, 34, 32, 35, 38, 39, 51, 43, 45, 44, 57, 2, 59, 50, 65 and 55). It should be stressed that MOTU2 (*Pseudomonas* sp.) and MOTU57 (*Acidovorax* sp.) share a high sequence similarity with the strains F2V13 and F2V7, which were isolated from contaminated pots. MOTU2 (F2V7) showed tolerance to OC exposure (Table S1 in the Supplementary Material).

Discussion

The composition and dynamic of the microbial community play a key role in the rhizosphere functioning (Bais et al. 2006; Abhilash et al. 2009). The community assembly of bacteria in rhizosphere exposed to organic pollutants is little

understood. Most of the previous studies have reported efficiency of pollutant biodegradation (Kidd et al. 2008; Abhilash et al. 2009; Becerra-Castro et al. 2011; Toyama et al. 2011). However, the bacterial clades responsible for these biodegradations remain partially characterized. The previous molecular studies regarding organic pollutant degradation in the rhizosphere showed specificities depending on soil types, plant species and pollutant class (Kuiper et al. 2004; Ruiz-Rueda et al. 2009; Toyama et al. 2010). In this study, we examined the phylogenetic structure of bacterial communities from *P. australis* rhizosphere exposed to a gradient of OC pollutants (γ HCH, chlorobenzenes (CBs)). The bacterial SSCP pattern assessment previously shown to be specific for a given of bacterial community (Zinger et al. 2007) was performed for each concentration of OC mixed pollution exposure. Here, the bacteria profiles in rhizosphere showed effects supported by bootstrapping for most exposures. Therefore, relevant changes in bacterial diversity can be

detected in function of the degree of exposition to OCs. Here, exposure must have favoured the selection of strains able to degrade the OC compounds. This observation is consistent with previous reports in which pesticide-mineralizing strains could be isolated only from agricultural soils (El-Fantroussi 2000; Nishino et al. 2000).

A large number of distinct colony morphotypes were isolated from the rhizosphere soil of *P. australis* (Fig. S1 in the Supplementary Material). Of the 78 isolates that were analysed by partial 16S rDNA sequence analysis, a diversity of sequence types was observed from seven different classes, including the genera commonly found in the soil environment as *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Exiguobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Arthrobacter* sp. and *Sphingomonas* sp. Previous studies published similar cultivable strains isolated from *Phragmites* sp. rhizosphere (Ruiz-Rueda et al. 2009; Toyama et al. 2009; Zhang et al. 2013) and described these strains as biodegraders of chlorinated compounds (Vidali 2001; Rapp and Gabriel-Jürgens 2003; Phillips et al. 2005). From *P. australis* rhizosphere, only six isolates could not be reliably assigned to a genus, based upon the 16S rDNA sequence similarities. Genera such *Arcicella*, *Hevizibacter* and *Flavobacterium* were specifically isolated from samples not exposed to OCs. These bacteria isolates were not able to grow in the presence of OCs, demonstrating their sensitivity to OCs (in single and mixed exposure). On the other hand, *Firmicutes* (e.g. *Bacillus* sp., *Exiguobacterium* sp.) were only isolated from the rhizosphere of *P. australis* exposed to OCs and showed tolerance to all OCs. On the 78 isolates, 60.3 % showed tolerance of each OC and to the joint mixture of OCs. The isolation of numerous bacterial strains tolerant to OCs supports that they are widespread in the environment and they are probably involved in degradation. Thus, biotechnological processes for OC degradation should consider in situ solutions in priority. There is also the perspective of isolating autochthonous strains to use in bio-augmentation procedures. However, further studies are needed to better understand the biodegradation processes.

The combined occurrence of γ HCH and CB tolerance might be due to common mechanisms, which have been demonstrated for aerobic/anaerobic degradation of these compounds. Biodegradation of γ HCH and CBs has been reported for bacterial strains possessing dehalogenase activities (Adrian et al. 2000; Ricking and Schwarzbauer 2008; Lal et al. 2010). The fact that some strains showed better growth on the medium containing OC suggests that OCs can be used as a substrate. Further studies are necessary to ascertain the tolerance and/or degrading ability of selected strains isolated from *P. australis* rhizosphere to the possible intermediates produced during the degradation of OCs.

From the rhizosphere, cultivable strains represent a minor percentage of the microbial communities (Stursa et al. 2009). Therefore, in order to determine whether there was selection

for specific bacterial phylotypes in the presence of OCs, molecular phylogenetic techniques were used to characterize the natural microbial biota without cultivation (Zinger et al. 2007). The microbial diversity was determined using 454 pyrosequencing, where the rarest MOTUS₉₇ % (i.e. containing less than five sequences) was not considered in the analysis of microbial communities due to its ambiguity. Our results showed a significant effect of OC exposures at the phylum and subphylum levels and even at the finer taxonomic level (Fig. S2 in the Supplementary Material; Fig. 4). In the presence of OCs (whatever the time of exposure), two MOTUS (46-*Tistrella* and 66-*Amorphus*) were not detected and appeared sensitive to OCs. However, only few MOTUs were found strictly specific to one type of OC exposures and the differences of microbial communities between the expositions were rather expressed in terms of abundance (Fig. 4). *P. australis* rhizosphere exposed to OCs was dominated by phylotypes related to α -, β -, γ -Proteobacteria. Some MOTUs (2, 57, 50, 55 and 65) were specific to these types of OC exposures. Interestingly, two of these MOTUs (2 and 57) exhibiting a sharp increase in the presence of OCs were cultivated here as bacterial strains and MOTU2 showed tolerance to these OCs. Among these dominant MOTUs, specific genera were identified which were previously described as chlorinated organic pollutant degraders: *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Devosia* sp. and *Sphingobium* sp. (Rapp and Gabriel-Jürgens 2003; Phillips et al. 2005; Verma et al. 2009; Degtjarik et al. 2013), while *Rhodobacter* sp. strain was isolated from polluted ponds (Srinivas et al. 2008). Then, it is obvious that OC concentrations imitating contaminated groundwater induced an adaptation of rhizospheric bacterial population dominated by OC-tolerant strains. OC exposures induced microbial community adaptation in the *P. australis* rhizosphere where 55 % of MOTUs appeared to be opportunists, 25 % of tolerant strains (for which, abundance was unaffected by the OC exposures) and 20 % of sensitive strains. These modifications in the microbial structure communities highlighted (1) the dynamic of the rhizosphere microflora, (2) the opportunism of some bacterial strains and (3) the adaptation of the rhizosphere functioning exposed to OCs.

These results may thus be useful to predict microbial successions in the framework of longer timescale studies with OC mixed pollution stressors. Under OC exposures, *P. australis* plants provide a protective habitat to microbial strains by releasing nutritive exudates and stimulating selective strain growth. Opportunist and tolerant strains (as single bacterial strain or as a syntrophic bacterial consortium) could insure the rhizodegradation of OCs; subsequently, the microbe-mediated degradation occurs in the rhizosphere, in the plant itself or in both (Barac et al. 2004). Moreover, a major limiting factor for the phytoremediation of recalcitrant organic pollutants is often their low bioavailability. Biosurfactant produced by microorganisms can increase

contaminant availability, plant uptake and/or microbial degradation (Bais et al. 2006). Some strains have been described to produce biosurfactants (e.g. *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp.) (Becerra-Castro et al. 2011), improving bioavailability of HCH isomers. These strains were detected in isolates in the *P. australis* rhizosphere. Overall, our results indicate that *P. australis* harbours active microbial population which can tolerate OCs and potentially improve the OC remediation process.

Acknowledgements This work is part of the VALORSITE-PHYCO project funded by AXELERA and in collaboration with PHYTORESTORE (Jardins Filtrants®) (patent: FR 961504 A1). The authors wish to thank Martha and John Willison and Brigitte Manship for their proofreading.

References

- Abhilash PC, Jamil S, Singh N (2009) Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol Adv* 27:474–488
- Adrian L, Szewzyk U, Wecke J, Gorisch H (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408:580–583
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Anderson MJ (2001) Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Can J Fish Aquat Sci* 58:626–639
- Antoinette Y, Pilas-Begue A, Baudrier F, Fresneau A, Jacquet T (2011) Decontamination treatment of water contaminated by emergent pollutants and/or micropollutants, especially by organochlorine compounds. Patent FR 961504 A1
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol* 22:583–588
- Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernandez A, Weyens N, Acea MJ, Vangronsveld J (2011) Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant Soil* 340:413–433
- Braeckvelt M, Mirschel G, Wiessner A, Rueckert M, Reiche N, Vogt C, Schultz A, Paschke H, Kusch P, Kaestner M (2008) Treatment of chlorobenzene-contaminated groundwater in a pilot-scale constructed wetland. *Ecol Eng* 33:45–53
- Bueno M, Fillat MF, Strasser RJ, Maldonado-Rodriguez R, Marina N, Smienk H, Gomez-Moreno C, Barja F (2004) Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena*—fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Environ Sci Pollut Res* 11:98–106
- Chaudhry Q, Schröder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, Marecik R (2002) Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 9:4–17
- Cottin N, Merlin G (2010) Fate of chlorinated benzenes in laboratory peat and pozzolana filters. *Water Air Soil Pollut* 213:425–435
- Degtjarik O, Chaloupkova R, Rezacova P, Kutny M, Damborsky J, Smatanova IK (2013) Differences in crystallization of two LinB variants from *Sphingobium japonicum* UT26. *Acta Crystallogr F* 69:284–287
- Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw* 22:1–20
- El-Fantroussi S (2000) Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Appl Environ Microbiol* 66:5110–5115
- Faure M, San Miguel A, Ravel P, Raveton M (2012) Concentration responses to organochlorines in *Phragmites australis*. *Environ Pollut* 164:188–194
- Feidieker D, Kämpfer P, Dott W (1995) Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic-compounds and HCH in the subsurface environment. *J Contam Hydrol* 19:145–169
- Field JA, Sierra-Alvarez R (2008) Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environ Pollut* 155:1–12
- Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* 176:20–30
- Gomez-Hermosillo C, Pardue JH, Reible DD (2006) Wetland plant uptake of desorption-resistant organic compounds from sediments. *Environ Sci Technol* 40:3229–3236
- Gury J, Zinger L, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (2008) Exonuclease activity of proofreading DNA polymerases is at the origin of artifacts in molecular profiling studies. *Electrophoresis* 29:2437–2444
- Kidd PS, Prieto-Fernandez A, Monterroso C, Acea MJ (2008) Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil* 302:233–247
- Kindt R, Coe R (2005) Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi, ISBN 92-9059-179-X
- Krutz LJ, Beyrouthy CA, Gentry TJ, Wolf DC, Reynolds CM (2005) Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. *Biol Fertil Soils* 41:359–364
- Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17:6–15
- Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler HPE, Holliger C, Jackson C, Oakshott JG (2010) Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:58–80
- Lorah MM, Voytek MA (2004) Degradation of 1,1,2,2-tetrachloro ethane and accumulation of vinyl chloride in wetland sediment microcosms and in situ porewater: biogeochemical controls and associations with microbial communities. *J Contam Hydrol* 70:117–145
- Ma XM, Burken JG (2002) VOCs fate and partitioning in vegetation: use of tree cores in groundwater analysis. *Environ Sci Technol* 36:4663–4668
- Ma XM, Havelka MM (2009) Phytotoxicity of chlorinated benzenes to *Typha angustifolia* and *Phragmites communis*. *Environ Toxicol* 24:43–48
- Macek T, Mackova M, Kas J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv* 18:23–34
- Manickam N, Mau M, Schlomann M (2006) Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp ITRC1. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:580–588
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795–799
- McGill BJ, Etienne RS, Gray JS, Alonso D, Anderson MJ, Benecha HK, Domelas M, Enquist BJ, Green JL, He FL, Hurlbert AH, Magurran

- AE, Marquet PA, Maurer BA, Ostling A, Soykan CU, Ugland KI, White EP (2007) Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecol Lett* 10:995–1015
- Miglioranza KSB, de Moreno JEA, Moreno VJ (2004) Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Sojak from a shallow lake in Argentina. *Water Res* 38:1765–1772
- Miya RK, Firestone MK (2001) Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J Environ Qual* 30:1911–1918
- Monferran MV, Wunderlin DA, Nimptsch J, Pflugmacher S (2007) Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 68:2073–2079
- Muratova AY, Dmitrieva TV, Panchenko LV, Turkovskaya OV (2008) Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. *Int J Phytoremediat* 10:486–502
- Nishino SF, Paoli GC, Spain JC (2000) Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl Environ Microbiol* 66:2139–2147
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H, Wagner H (2011) vegan: community ecology package. R package version 2.0-0. <http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>. Accessed 9 Sept 2011
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290
- Phillips TM, Seech AG, Lee H, Trevors JT (2005) Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16:363–392
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Rapp P, Gabriel-Jürgens LHE (2003) Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiology* 149:2879–2890
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, Coissac E (2011) ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 39:e145–e156
- Ricking M, Schwarzbauer J (2008) HCH residues in point-source contaminated samples of the Teltow Canal in Berlin, Germany. *Environ Chem Lett* 6:83–89
- Ruiz-Rueda O, Hallin S, Baneras L (2009) Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiol Ecol* 67:308–319
- San Miguel A, Ravanel P, Raveton M (2013) A comparative study on the uptake and translocation of organochlorines by *Phragmites australis*. *J Hazard Mater* 244:60–69
- Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC (2001) Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol* 67:3557–3563
- Shaw LJ, Burns RG (2007) Influence of the rhizosphere on the biodegradation of organic xenobiotics—a case study with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. In: Heipieper HJ (ed) *Bioremediation of soils contaminated with aromatic compounds: effects of rhizosphere, bioavailability, gene regulation and stress adaptation*. Springer, Berlin, pp 5–30
- Srinivas TNR, Kumar PA, Sasikala C, Sproer C, Ramana CV (2008) *Rhodobacter ovatus* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a polluted pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1379–1383
- Stursa P, Uhlík O, Kurzawova V, Koubek J, Ionescu M, Strohalm M, Lovecka P, Macek T, Mackova M (2009) Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. *Plant Soil Environ* 55:389–396
- Toyama T, Sato Y, Inoue D, Sei K, Chang YC, Kikuchi S, Ike M (2009) Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of *Phragmites australis*. *J Biosci Bioeng* 108:147–150
- Toyama T, Momotani N, Ogata Y, Miyamori Y, Inoue D, Sei K, Mori K, Kikuchi S, Ike M (2010) Isolation and characterization of 4-tert-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. *Appl Environ Microbiol* 76:6733–6740
- Toyama T, Murashita M, Kobayashi K, Kikuchi S, Sei K, Tanaka Y, Ike M, Mori K (2011) Acceleration of nonylphenol and 4-tert-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. *Environ Sci Technol* 45:6524–6530
- Verma M, Kumar M, Dadhwal M, Kaur J, Lal R (2009) *Devosia albobilva* sp. nov. and *Devosia crocina* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:795–799
- Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem* 73:1163–1172
- Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian CG, Schäffer A, Weber R (2011) Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res* 18:152–162
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267
- Zhang JY, Zhao W, Pan J, Qiu LM, Zhu YM (2005) Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environ Int* 31:855–860
- Zhang W, Wu XK, Liu GX, Chen T, Zhang GS, Dong ZB, Yang X, Hu P (2013) Pyrosequencing reveals bacterial diversity in the rhizosphere of three *Phragmites australis* ecotypes. *Geomicrobiol J* 30:593–599
- Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb Ecol* 54:203–216
- Zinger L, Shahnavaz B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009) Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *ISME J* 3:850–859
- Zinger L, Lejon DPH, Baptist F, Bouasria A, Aubert S, Geremia RA, Choler P (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PLoS One* 6:e19950

« Rien est vrai, tout est vivant. »

Edouard Glissant.

Résumé

Les microorganismes occupent une place centrale dans la diversité du vivant et les processus écosystémiques, notamment dans le sol où ils sont en interaction avec les plantes. Cette thèse vise à caractériser l'influence respective des plantes et du contexte abiotique dans la distribution spatiale des microorganismes. Le travail s'appuie sur un modèle simplifié de la biologie des sols, les plantes en coussins des falaises de haute montagne. Nous avons suivi une seule espèce aux morphotypes variés, *Silene acaulis*, une espèce ingénieure de l'écosystème dont la croissance mène à la création d'un sol *de novo*. L'échantillonnage comprend le prélèvement de sol de plante et de sol extérieur comme témoin, pour des coussins distribués le long de gradients altitudinaux et géologiques. Des méthodes moléculaires ont été utilisées pour décrire la diversité microbienne et le génotypage des coussins.

Les coussins structurent la beta diversité bactérienne et fongique à l'échelle régionale en agissant comme un tampon à échelle micro-locale sur les effets de la roche mère et de l'altitude en homogénéisant le pH et par un apport de nutriments. Cet effet ingénieur est d'autant plus fort que la contrainte abiotique augmente et varie selon le génotype des coussins. La beta diversité bactérienne diffère de la beta diversité fongique. Alors que les communautés bactériennes sont sensibles au pH du sol et convergent sous les coussins, les communautés fongiques sont corrélées à la génétique des coussins, particulièrement les clades aux modes de vie biotrophes/pathogènes. Ce travail montre que les plantes sont un filtre biotique majeur de la biogéographie microbienne.

Mots-clé : microorganismes, diversité moléculaire, écologie des communautés, plante en coussin, interactions plante-microbes, biogéographie, écosystème alpin.

Abstract

Microorganisms are key component of Earth biodiversity and ecosystem processes, especially in soils where they interact with plants. The objectives of the PhD was to characterize the plant and abiotic respective influence on microbial spatial distribution. The work was based on a simplified soil biology model, the alpine cushion plants. We choose one species composed of variable morphotype, *Silene acaulis*, an ecosystem engineer species that creates *de novo* soil through growth. Sampling design includes soil within cushions and outside, spanning altitudinal and geological gradients. Molecular approaches were used to describe diversity and to genotype cushions.

Cushions structures bacterial and fungal regional beta diversity through a micro-local buffering of the influence of abiotic context, homogeneizing soil pH and by nutrient supply. This engineering effect increased in stressful conditions and varied according to plant genotype. Betadiversity differed between bacteria and fungi. Bacterial communities are mainly influenced by pH and converge within cushions while fungal communities correlate to cushion genetic, especially plant-associated biotrophs fungal clades. This work shows that plants act as a major biotic filter on microbial biogeography.

Key-words : microorganisms, molecular diversity, community ecology, cushion plants, plant-microbes interactions, biogeography, alpine ecosystem.