



HAL
open science

Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par des métabolites secondaires du complexe d'espèces *Fallopia* spp.

Clément Bardon

► **To cite this version:**

Clément Bardon. Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par des métabolites secondaires du complexe d'espèces *Fallopia* spp.. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10308 . tel-01408067

HAL Id: tel-01408067

<https://theses.hal.science/tel-01408067>

Submitted on 3 Dec 2016

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.



THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation,

DIPLOME DE DOCTORAT

Micro-organismes, interactions, infections

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue à huis-clos le 2 décembre 2014

par

M Clément Bardon

TITRE :

« Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par des métabolites secondaires du complexe d'espèces
Fallopia spp. »

Directeurs de thèse : M Gilles Comte, M Franck Poly, Mme Florence Piola et Mme Feth el Zahar Haichar

JURY : M Sébastien Barot (rapporteur)

Mme Geneviève Chiapusio (rapporteur)

M Gilles Comte

M Thierry Heulin

M Pierre Joly

M Franck Poly

INVITES: Mme Florence Piola

Mme Feth el Zahar Haichar

Résumé

L'azote est souvent considéré comme le premier facteur limitant la croissance des plantes dans les écosystèmes terrestres (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008). Ainsi, les études sur le contrôle du fonctionnement microbien et la sélection des microorganismes des sols par les plantes se sont principalement intéressées au cycle de l'azote (N) (Chapman *et al.*, 2006). Certaines plantes peuvent inhiber la nitrification ou la minéralisation de l'azote des sols par la libération de métabolites secondaires. Cependant, bien que la dénitrification soit considérée comme une voie majeure de perte d'azote des sols (25-90%) (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011), l'inhibition de la dénitrification par les métabolites secondaires de plantes n'a jamais été démontrée. Or il a été constaté à de nombreuses reprises qu'aux voisinages de certaines plantes la dénitrification du sol était réduite. C'est le cas notamment du complexe d'espèces invasives *Fallopia* spp. pour lequel les principaux facteurs connus pour influencer ce processus ne pouvaient expliquer cette réduction (Dassonville *et al.*, 2011).

Ces résultats ont conduit à poser l'hypothèse centrale de ma thèse qui est que l'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par libération de métabolites secondaires existe chez *Fallopia* spp.

Les métabolites secondaires extraits de *Fallopia* spp. ont été testés sur l'activité de dénitrification et la respiration aérobie d'une collection de souches dénitrifiantes ainsi que sur une communauté dénitrifiante complexe. La caractérisation par UHPLC-DAD-QTOF des métabolites secondaires de *Fallopia* spp. a permis d'identifier des composés candidats. Ceux-ci ont été purifiés puis testés au laboratoire à différentes concentrations sur des souches pures et des communautés complexes dénitrifiantes pour valider leur activité inhibitrice de la dénitrification. Afin d'évaluer la spécificité et le mode d'action à l'échelle cellulaire de ces composés, leurs actions sur les membranes bactériennes, sur les activités des NO₃- (NAR) et NO₂-reductases (NIR) et sur la transcription des gènes correspondants ont été étudiées chez une bactérie rhizosphérique modèle (*Pseudomonas brassicacearum*) grâce respectivement à de la microscopie électronique, des mesures d'activités enzymatiques et des fusions traductionnelles. D'un point de vue environnemental, la sensibilité des communautés dénitrifiantes du sol à ces composés a été évaluée en fonction de leur exposition préalable à *Fallopia* spp.

Nos résultats démontrent pour la 1^{ière} fois que les plantes (ici *Fallopia*) peuvent inhiber la dénitrification par la libération de procyanidines de type B qui induisent en anaérobiose des modifications physiologiques chez les dénitrifiants. Ces composés affectent spécifiquement le fonctionnement de la NO₃-réductase transmembranaire par un changement conformationnel. Selon les sols, les communautés peuvent être plus ou moins sensibles notamment en fonction de leur exposition précédente à *Fallopia* spp.. Nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur les interactions entre plantes et microorganismes et améliorent notre compréhension sur la capacité des plantes à modeler le fonctionnement microbien des sols en particulier celui du cycle de l'azote.

Summary

Nitrogen is often considered as the first limiting factor of plant growth in terrestrial ecosystems (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008). Thus studies on plant-driven microbial functioning and selection by secondary metabolites have mostly focused on the effect of plant on the nitrogen (N) cycle (Chapman *et al.*, 2006). Some plants can inhibit the nitrification and the nitrogen mineralization processes in soils through the release of secondary metabolites (Subbarao *et al.*, 2009; Dietz *et al.*, 2013; Heumann *et al.*, 2013). However, while denitrification is considered as a major way of N losses in soils (25-90%) (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011), the denitrification inhibition by plant secondary metabolites was never demonstrated. However, it has been observed several times that the denitrification in soils near some species was reduced. For example, the invasive complex species *Fallopia* spp. was shown to reduce denitrification in soils without affecting principal factors known to control this process (Dassonville *et al.* 2011).

These findings conducted to the main hypothesis of my thesis, that *Fallopia* spp. is responsible of a biological denitrification inhibition (BDI) through the release of secondary metabolites.

Extracted secondary metabolites from *Fallopia* spp. were tested on the denitrification and the aerobic respiration of a set of pure denitrifying bacteria strains as well as on a soil complex denitrifying community. The characterization of secondary metabolites by UHPLC-DAD-QTOF allows identifying candidates. They were purified and tested at different concentrations on pure strains and complex denitrifying communities to validate their inhibitory effect on the denitrification. In order to investigate their specificity and their mode of action, their effects on bacterial membranes, the NO₃-reductases (NAR) and the NO₂-reductases (NIR) activities as well as these enzymes translation, were studied on a model rhizospheric bacteria (*Pseudomonas brassicacearum*), using electronic microscopy, enzymatic activities and translational fusions. In an environmental approach, the sensitivity of soil denitrifying communities to these compounds was investigated in function of their exposition to *Fallopia* spp..

Our results demonstrate for the first time, that plants (here *Fallopia* spp.) can inhibit denitrification through the release of B-type procyanidins that induce physiological changes in denitrifying bacteria under anaerobic conditions. These compounds affect specifically the membrane-bound NO₃-reductase through conformational changes. Less sensitive soils denitrifying communities may be selected in soils previously exposed to *Fallopia* spp. Our finding provides new insight into plant-soil interactions and improves our understanding of plants abilities to shape microbial soil functioning.

Remerciements

Trois ans déjà sont passés depuis mes débuts en thèse et une histoire est en train de se terminer... Trois années pleines de péripéties et de rebondissements avec ses protagonistes qui ont permis à cette histoire d'exister et sans qui elle ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui.

Merci, à Geneviève Chiapusio et Sébastien Barot, d'avoir accepté sans hésitations de relire ce manuscrit malgré le timing. Merci également d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. J'espère que ces travaux vous plairont.

Merci à Thierry Heulin et Pierre Joly d'avoir accepté d'examiner mes travaux. J'espère que ces travaux vous passionneront comme ils m'ont passionné.

Merci à mes directeurs de thèse officieux Franck, Florence et Zahar pour leur confiance et leur soutien intarissable pendant ces trois années. Je me suis bien éclaté à travailler avec vous !! Vous avez été tous les trois de super directeurs de thèses !! Merci pour votre aide.

Je remercie tous les membres de l'équipe 5, Franck, Amélie, Thomas, Xavier, Nadine, Julien, Marie, Agnès, Catherine, Fahran, Lyse, Jonathan, Sonia, Bruno. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur. L'équipe 5 forme une sacrée équipe.

Je remercie également tous les membres de l'équipe d'écologie végétale et zones humides d'avoir accueilli un fantôme pendant trois. Je suis désolé d'avoir hanté les couloirs.

Je remercie les membres de mes comités de pilotages, Christian Gallet, Laurent Philippot, Wafa Achouak et Nathalie Fromin pour leur éclairage scientifique et leur aide dans la conception de cette thèse.

Je remercie Guillaume, Florian et Gilles pour leur accueil au CESN. Merci surtout à toi Guillaume de m'avoir accordé du temps et de m'avoir aidé dans la conception de ce projet.

Je remercie mes différents stagiaires, Manon, Boris et Magalie pour leur aide dans la réalisation de ces travaux de thèse. Merci pour votre enthousiasme et votre implication.

Je remercie mes colocataires, Amélie Cantatel et Geneu, pour cette bonne humeur qui règne dans notre bureau. Je suis assez content que nous n'ayons pas pris le temps de discuter ensemble, sans quoi je n'aurais pas pu finir cette thèse ;-).

Je remercie Nadine Guillaumaud, de m'avoir supporté tous les midis depuis trois ans, hors jours fériés et vacances. Pour te remercier je te laisserai quelques choses dans les congélateurs et la 421 quand je partirai, car je suis convaincu que je partirai avant toi du laboratoire ;-).

Merci à Julien Guy Oh Nette d'avoir squatté mon bureau pour le café et non pour ma personne.

Merci à Jonathan d'avoir pris le relai avec mes manip. J'espère qu'elles te prendront autant la tête qu'à moi. Et surtout merci pour les champignons.

Je remercie Thomas de m'avoir accompagné à la piscine pendant ma période de rédaction. Franck prévois ton maillot mercredi prochain.

Je remercie les anciens étudiants nouveaux thésards ou fantômes thésards, pour la bonne ambiance au laboratoire et les bonnes soirées.

Enfin, je remercie celles et ceux que j'aurais pu oublier. Vous êtes tellement nombreux.

Je souhaite dédier cette thèse à ma famille, mes proches, mes amis. A mes parents pour leur amour, leurs soutiens, leurs conseils de tous les jours depuis 27 ans. Je sais que vous n'avez pas choisi. Raison de plus pour dire qu'une fidélité pareille ca force le respect. A mes frères pour avoir tapé suffisamment fort mais pas trop sur ma tête pour que quelque chose de pas trop mal en sorte. A mes neveux, qui sont à des milliers d'années lumières de comprendre le travail de tonton. A mes amis. Et enfin à la plus belle de toutes mon Ardéchoise ...

Préambule (Ma vision de la Biologie):

L'univers est un tout, un ensemble : l'énergie, les atomes, les molécules, les étoiles et les galaxies, la terre, les vents, les marées, la vie, la pensée. Dans cet univers coexistent et se mêlent des formes qui se rangent sur une échelle de complexité croissante. » (de Rosnay, 1988).

Un système complexe est un système constitué d'un grand nombre d'éléments interagissant non-linéairement et simultanément (Kwapien & Drozdz, 2012). Ces systèmes sont ouverts, inter-échantent des informations ou de la matière avec l'environnement et modifient constamment leur structure interne et leurs organisations d'activité par des processus d'auto-organisation (Kwapien & Drozdz, 2012). Il en résulte que ces systèmes sont flexibles et s'adaptent aux conditions extérieures (Kwapien & Drozdz, 2012). La plus frappante des propriétés de ces systèmes complexes est l'existence de propriétés émergentes qui ne peuvent pas simplement dériver ou être prédites par la connaissance de la structure du système et les interactions entre ses éléments individuels (Kwapien & Drozdz, 2012). Les systèmes complexes s'organisent en différents niveaux avec des sous-systèmes (Bose, 2013). Ainsi les phénomènes observés à l'échelle globale du système mais pas lorsque les composants du système sont isolés, sont appelés propriétés émergentes (Bose, 2013). L'idée d'émergence est associée avec quelque chose de nouveau ou d'imprédictible observé à l'échelle du système mais pas aux niveaux inférieurs ; « le tout est plus que la somme de ses parties » (Bose, 2013).

«*Alles ist Chemie* ». Tout est chimie, disait le chimiste allemand Justus von Liebig (1803-1873) et il semblerait que ses propos soient toujours d'actualité. En effet, ce sont les réactions chimiques qui gouvernent le fonctionnement du vivant. Ainsi, selon la définition de la NASA «*la vie est un système chimique autorégulé capable de subir l'évolution Darwinienne* » (Chodasewicz, 2014). La biologie ne semble donc pas déroger à la règle du tout chimique et des systèmes complexes. Le vivant peut donc être considéré comme un système complexe (Sorger, 2005; Bruggeman & Westerhoff, 2007; Bose, 2013) basé sur la chimie. Ainsi, la conformation des protéines leur confèrent toute leur activité au sein des systèmes (*i.e.* la cellule) car en effet la structure linéaire des protéines ne permet généralement pas d'expliquer leurs activités (Bruggeman & Westerhoff, 2007) ou encore les effets synergiques de composés biologiques sur une activité peuvent être considérés comme des propriétés émergentes du vivant.

La vie serait apparue sur Terre il y a entre 3,8 et 3,5 milliards d'années (de Rosnay, 1988). Remontant aux origines de la vie ce sont des conditions particulières et la chimie élémentaire qui ont favorisé l'apparition du vivant à partir d'éléments simples comme l'O₂, le N₂, le NO, le CO, le CO₂ *etc* (Potier, 2003). En effet, les scientifiques s'accordent pour dire que c'est la chimie élémentaire de la « soupe primordiale » qui a permis la naissance du premier être-vivant, il y a 3,5 à 3,8 milliards d'années, par l'apparition de la chimie probiotique (de Rosnay, 1988). Et les choses sont allées en se complexifiant. Le temps a joué son rôle et l'émergence de nouvelles caractéristiques dans ce système complexe a donné naissance au monde vivant dans lequel nous vivons avec sa complexité d'interactions chimiques.

La principale caractéristique du vivant serait donc que ces unités depuis la cellule (*i.e.* cellule, organisme, super-organisme, communautés, écosystème *etc*) interagissent par le biais de la chimie, formant ainsi un système chimique complexe autorégulé. Nous pouvons ainsi raisonnablement nous poser la question; à quel niveau de complexité des interactions chimiques, l'évolution nous a conduit ces quelques 3,5 dernières milliards d'années ?

A l'échelle cellulaire nous savons que ce sont les réactions chimiques qui gouvernent le fonctionnement de la cellule (Chodasewicz, 2014). Les processus biochimiques étudiés depuis les débuts de la biologie ont clairement montré leur implication dans la réalisation du vivant. Prenons l'exemple de la découverte de la phosphorylation réversible des protéines comme mécanismes de régulation biologique, qui valut le prix Nobel de physiologie à Edmond Fischer et Edwin G. Krebs en 1992. A l'échelle de l'organisme ce sont à la fois les réactions intracellulaires et intercellulaires qui régissent le fonctionnement de l'organisme. L'exemple du mécanisme hormonal de maintien de l'homéostasie du taux de sucre dans le sang du corps humain par l'intermédiaire du glucagon et de l'insuline sécrétés par les cellules *alpha* et *beta* du pancréas (Ferner, 1951) est un bon exemple de l'autorégulation de l'organisme. A l'échelle de la communauté ce sont les réactions intracellulaires, intercellulaires, interindividuelles et intraindividuelles qui régissent le fonctionnement des communautés. Ainsi par allélopathie les plantes pourraient modeler leur environnement et en retour ces modifications joueraient sur leur propre évolution (Pollock *et al.*; Ridenour & Callaway, 2001). Les exemples font légions ... Et la liste des niveaux d'interactions chimiques pourrait aller ainsi *crescendo* de l'écosystème, au biome, ou la biosphère. L'hypothèse Gaïa formulée la première fois par Lovelock (1995) fait ainsi de la biosphère un super-organisme autorégulé, et donc un être vivant à part entière, s'autorégulant autour d'un état favorable à la vie et subissant l'évolution Darwinienne (Lovelock, 1995; Lenton, 2014). Bien qu'ayant été controversée à ses débuts,

car jugée téléologique, la théorie Gaïa semble moins en proie à la critique du fait de la validation de nombreux de ses principes de base (Lenton, 2014).

Il semble donc que le vivant par l'intermédiaire de la chimie puisse s'autoréguler à toutes les échelles du globe (Lenton, 2014). Une multitude de théories ont ainsi été élaborées pour définir les phénomènes d'auto-organisation à toutes les échelles possibles et imaginables du vivant (Odling-Smee, J *et al.*, 2003; van der Putten *et al.*, 2013; Lenton, 2014), qui en fait pourraient être vues comme des déclinaisons de la définition du vivant; « *la vie est un système chimique autorégulé capable de subir l'évolution Darwinienne* » (Chodasewicz, 2014). Il ne s'agirait en fait que de sous-systèmes complexes... Où tout est chimie !!

Beaucoup de chemin reste à parcourir pour percer les mystères du vivant et j'espère pouvoir apporter ma pierre à l'édifice. Tout ça pour dire que durant ces trois ans je n'ai pas compris grand-chose à la Biologie et que « vous ne comprendrez pas grand-chose » en lisant cette thèse. L'ignorance est le moteur de la pensée et de la recherche (Firestein, 2014) et « *je pense donc je suis* » comme disait Descartes. Alors heureusement que l'on n'a pas résolu tous les mystères parce qu'en plus de ne pas être, je serais toujours devant ma télé.



Table des matières :

INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : LES INTERACTIONS ENTRE PLANTES ET MICROORGANISMES, DES RELATIONS COMPLEXES.	15
INTRODUCTION	17
I. Interactions non spécifiques entre plantes et microorganismes	19
1. Les microorganismes de la rhizosphère influencent les plantes via leurs actions sur la disponibilité en nutriments	19
2. Les plantes influencent les microorganismes de la rhizosphère.....	26
II. La spécificité d'hôte dans les relations entre plante et microorganismes	30
1. Les relations plantes/ microorganismes pathogènes	30
2. Les symbioses mutualistes	31
3. Les symbioses associatives	32
4. Rôle des médiateurs chimiques dans les symbioses entre plantes et microorganismes	35
III. De la spécificité dans les interactions entre plantes et communautés/groupes fonctionnels microbiens ?.....	36
1. Certaines plantes prennent le contrôle de la minéralisation	38
2. Certaines plantes prennent le contrôle de la nitrification	40
3. Certaines plantes sont-elles capables de prendre le contrôle de la dénitrification ?.....	42
IV. « Ces prises de contrôle » par les plantes, les théories du « plant-soil feedback ».....	47
CONCLUSION.....	50
CHAPITRE 2 TRAVAUX EXPERIMENTAUX : L'INHIBITION BIOLOGIQUE DE LA DENITRIFICATION (BDI) PAR <i>FALLOPIA</i> SPP..	51
INTRODUCTION	53
I. Les Renouées asiatiques prennent-elles le contrôle de la dénitrification ?	53
II. Les renouées asiatiques	54

III.	Activité biologique des composés contenus dans les renouées.....	56
IV.	Hypothèses de travail.....	56
V.	Déroulement du manuscrit.....	57
PARTIE 1 EST-CE QUE L'INHIBITION BIOLOGIQUE DE LA DENITRIFICATION PAR LES PLANTES EXISTE ?		59
INTRODUCTION.....		63
I.	Materials and Methods	65
1.	Plant growth and extract recovery.....	65
2.	Metabolic activity bioassay.....	66
3.	Aerobic and anaerobic respiration activity of strains of denitrifying bacteria	67
4.	Secondary metabolites analysis.....	68
5.	Soil experiment	68
6.	Measurements of microbial activities	69
7.	Abundance of total bacteria and denitrifying bacteria	69
8.	Data and statistical analyses.....	70
II.	Results	71
1.	Metabolic activity measurements using Biolog bioassay.....	71
2.	Aerobic respiration and denitrification by four strains of denitrifying bacteria	72
3.	Effect of Fallopia extract fractions on the anaerobic metabolic activity of <i>P. fluorescens</i>	73
4.	Fallopia extracts and fraction analyses.....	74
5.	Effects of Fallopia japonica extracts on denitrification in soil	76
III.	Discussion	77
1.	Fallopia <i>spp.</i> compounds reduce the anaerobic metabolism of denitrifying bacteria.....	77
2.	Types of molecules involved in denitrification inhibition	78
3.	Confirmation of BDI on complex soil denitrifying community.....	80
CONCLUSION.....		81
PARTIE 2 QUELLES SONT LES MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'INHIBITION BIOLOGIQUE DE LA DENITRIFICATION PAR FALLOPIA SPP.?		83
INTRODUCTION.....		87

I. Materials and Methods	88
1. Plant growth and <i>Fallopia</i> extracts recovery	88
2. Effect of <i>Fallopia</i> extracts on aerobic and anaerobic strains respiration activities	89
3. Estimation of proanthocyanidins amounts in <i>Fallopia</i> extracts	89
4. <i>Fallopia</i> extracts properties	89
5. Proanthocyanidins analysis in <i>Fallopia</i> extracts	90
6. Procyanidins purification from <i>Fallopia</i> extract	90
7. BDI ability of major compounds encountered in <i>Fallopia</i> extracts	91
8. Procyanidins effect on denitrifying soil communities	91
9. Data and statistical analyses	91
II. Results	92
1. Effect of <i>Fallopia</i> extracts on respiration of Gram positive and Gram negative denitrifying bacteria	92
2. Estimated concentration of proanthocyanidins in <i>Fallopia</i> extracts and <i>Fallopia</i> extract properties	94
3. Correlations between aerobic respiration or denitrification inhibitions and the estimated concentration of proanthocyanidins in <i>Fallopia</i> extracts and <i>Fallopia</i> extract properties	95
4. Identification of proanthocyanidins encountered in <i>Fallopia</i> extracts and effects of identified and purified compounds on denitrifying bacteria	96
5. Effect of grape seed procyanidins on denitrifying bacteria in pure culture or in soil communities	99
III. Discussion	100
1. Biological denitrification inhibition of Gram-negative and Gram-positive bacteria by <i>Fallopia</i> extracts	100
2. Putative molecules and mechanisms involved in inhibition of denitrification by compounds from <i>Fallopia</i> extracts	100
3. B-type Procyanidins of <i>Fallopia</i> inhibit denitrification of bacteria	101
4. Procyanidins of grape seed induce similar effects on denitrifying strains and denitrification of soils ..	102
CONCLUSION.....	103
SUPPLEMENTARY	104
PARTIE 3 QUELS SONT LES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA DENITRIFICATION PAR LES PROCYANIDINES DE <i>FALLOPIA</i> SPP.?	107
INTRODUCTION.....	111
I. Materials and Methods	113
1. Procyanidins purification	113
2. Measurements of microbial activities	114

3.	Cell permeability and viability measurements	114
4.	Transmission electronic microscopy (TEM)	115
5.	Cell Nitrate-reductase and Nitrite reductase activities	115
6.	Free nitrate-reductase activity	116
7.	Measures of NO ₃ reductase and NO ₂ reductase genes translation	116
8.	Data and statistical analyses	116
II.	Results	118
1.	Effect of procyanidins on aerobic respiration and denitrification of <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	118
2.	Effect of procyanidins on cell membrane permeability and cell viability	120
3.	Effect of procyanidins on cell NO ₃ -reductase and NO ₂ -reductase	121
4.	Effect of procyanidins on the activity of free NO ₃ -reductase	123
5.	Effect of procyanidins on nitrate-reductase (narG) and nitrite-reductase (nirS) gene translations	124
III.	Discussion	125
1.	Procyanidins inhibit denitrification not because of general antimicrobial properties	126
2.	Procyanidins affect membrane integrity without affecting cell viability	126
3.	Procyanidins inhibit the cell nitrate-reductase activity	127
4.	Procyanidins acts through the membrane destabilization and change of NO ₃ reductase conformational form 128	
5.	Influence of procyanidins on NarG and NirS protein synthesis	128
	CONCLUSION.....	129
	 PARTIE 4 INHIBITION BIOLOGIQUE DE LA DENITRIFICATION (BNI): LA COURSE A L'ARMEMENT ENTRE LES RENOUEES ASIATIQUES ET LES COMMUNAUTES DENITRIFIANTES	131
	 INTRODUCTION.....	135
I.	Matériels et méthodes	137
1.	Matériel biologique	137
2.	Mesures des activités microbiennes : nitrification et dénitrification	137
3.	Mesure de la vitesse de dégradation des procyanidines dans les sols	138
II.	Résultats	139
1.	Effets de la présence de <i>Fallopia</i> spp. sur la dénitrification et la nitrification des sols	139
2.	Effet de l'histoire des sols sur la capacité des procyanidines à inhiber la dénitrification	142
3.	Effet de l'histoire des sols sur leur capacité à dégrader les procyanidines	143
III.	Discussion	144

1. Effets de <i>Fallopia</i> spp. <i>in situ</i> sur la dénitrification et la nitrification potentielles des sols	144
2. Spécificité de l'inhibition de la dénitrification par les procyanidines	145
3. Sensibilité des sols aux procyanidines variables en fonction des sols	146
4. Devenir des procyanidines dans le sol	146
CONCLUSION.....	148
PARTIE 5 L'INHIBITION BIOLOGIQUE DE LA DENITRIFICATION PROFITE-T-ELLE A FALLOPIA SPP. EN PARTICIPANT A SES CARACTERISTIQUES DE CROISSANCE EXCEPTIONNELLES ?.....	151
INTRODUCTION.....	155
I. Matériels et méthodes	155
1. Matériel biologique	155
2. Dispositif expérimental	156
3. Mesures expérimentales	157
II. Résultats attendus et avancée de l'expérimentation	158
CONCLUSION.....	159
DISCUSSION GENERALE	161
I. Les concepts d'inhibition biologique des différents processus du cycle de l'azote : même histoire, même cheminement scientifique ?	164
II. Inhibition des processus du cycle de l'azote par les plantes : phénomènes fortuits ou sélectionnés ?	168
1. Spécificité et mécanismes d'action	168
2. Production d'inhibiteurs chez les plantes	171
III. Les inhibitions des processus du cycle de l'azote sont-ils des phénomènes répandus ?	174
IV. Réaction des microorganismes aux phénomènes d'inhibition des processus du cycle de l'azote..	178
V. Vers la démonstration d'un retour bénéfique pour la plante : l'inhibition biologique des processus du cycle de l'azote dans le cadre des théories du « plant-soil feedback »	179
CONCLUSION.....	181

PERSPECTIVES182

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES185

Introduction Générale

Tous les biologistes s'accordent pour dire que les microorganismes sont la forme de vie la plus ancienne sur Terre comme le confirment les restes de cellules procaryotes fossilisées (Trevors, 2002). Apparus, il y a environ 3,4 milliards d'années les procaryotes sont les êtres vivants les plus nombreux sur Terre (Trevors, 2002). Ils constituent environ 500 milliards de tonnes de carbone ce qui représente à eux seuls près de la moitié du carbone organique sur toute la surface du globe (Whitman *et al.*, 1998). Si bien qu'aujourd'hui il ne reste plus un milieu où les procaryotes sont absents. De l'atmosphère (Smith, 2013) en passant par les sols (Schleifer, 2004) et l'eau (Orcutt *et al.*, 2011) ou encore des feuilles (Whipps *et al.*, 2008) aux tractus digestif de tous les animaux (Duncan & Edberg, 1995), les procaryotes sont partout et en grand nombre. Ainsi, chacun d'entre nous contiendrait entre 10 et 100 fois plus de cellules bactériennes que nos propres cellules (*i.e.* 10^{14-15} contre 10^{13}) (Schleifer, 2004). Les procaryotes du sol montrent une diversité telle que l'on estime que moins de 5% ont été identifiés et décrits (Schleifer, 2004). Bien qu'invisibles à l'œil nu, ils catalysent un grand nombre de transformations des cycles biogéochimiques (Whitman *et al.*, 1998). Ils ont façonné la Terre en enrichissant l'atmosphère en oxygène (Berla *et al.*, 2013) (*i.e.* les cyanobactéries premiers organismes photosynthétiques) et façonnent encore aujourd'hui le monde dans lequel nous vivons en tant que moteur des cycles biogéochimiques.

La diversification des plantes terrestres se serait produite il y a entre 530 et 590 millions d'années (Trevors, 2002) alors que les procaryotes avaient déjà depuis longtemps colonisé tous les environnements du globe. Les plantes ont donc dû composer avec ces voisins microscopiques qui sont devenus au fil du temps et de l'évolution des ennemis, des concurrents, des voisins cordiaux ou encore des alliés indispensables. L'apparition des premières plantes à racines se serait produite au milieu du Dévonien il y a environ 385 millions d'années (Brundrett, 2002) et il est maintenant bien admis que les racines représentent une zone d'interactions privilégiée entre les plantes et les microorganismes du sol (Hartmann *et al.*, 2009; Haichar *et al.*, 2014) ayant donné lieu à des processus de forte coévolution entre ces deux entités (Chisholm *et al.*, 2006; Occhipinti, 2013).

Dans le cadre de la théorie du « plant-soil feedback » il est admis que les plantes vont influencer les communautés microbiennes du sol qui vont elles-mêmes agir en retour sur les

plantes de manière bénéfique (*i.e.* symbiose, cycles biogéochimiques) ou délétère (*i.e.* pathogènes, cycles biogéochimiques) (Kulmatiski *et al.*, 2008; van der Putten *et al.*, 2013).

Hormis les effets indirects de modifications des facteurs abiotiques résultant soit de l'action des microorganismes soit de l'action des plantes sur leur environnement il est maintenant admis que les plantes et les microorganismes vont agir les uns sur les autres par l'intermédiaire d'une grande diversité de composés chimiques (Bertin *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2009). Les 385 derniers millions d'années de coévolution ont conduit à l'installation de relations étroites et spécifiques entre les plantes et les microorganismes dont les médiateurs sont des composés chimiques aux propriétés souvent insoupçonnées témoignant de cette forte coévolution.

Bien souvent pour illustrer les phénomènes de coévolution entre plantes et microorganismes, les plantes prennent le rôle d'hôtes accueillant en leur sein les microorganismes (Occhipinti, 2013). Ainsi, il est bien admis que les phénomènes de coévolution ont été forts entre les plantes et certains microorganismes symbiotiques mutualistes, comme par exemple les mycorhizes (Brundrett, 2002) ou les *Rhizobia* (Provorov, 1998), ou encore certains pathogènes (Kniskern & Rausher, 2001; Chisholm *et al.*, 2006). Mais alors que la forme de vie la plus ancienne est la forme libre des microorganismes (Trevors, 2002) l'existence de leur forte coévolution avec les plantes a longtemps été sous-estimée. De plus, nous savons maintenant que la rhizosphère des plantes est souvent associée à des genres microbiens libres qui lui sont propres (Bulgarelli *et al.*, 2013). Ces interactions fortes entre les microorganismes libres et les plantes sont étudiées surtout dans le cadre d'interactions impliquant certains genres voir espèces de microorganismes particuliers comme par exemple des souches bactériennes favorisant la croissance des plantes (PGPR : Plant-Growth Promoting Rhizobacteria) (Lugtenberg & Kamilova, 2009), ou plus récemment les bactéries nitrifiantes du genre *Nitrosomonas* et certaines *Poaceae* (Subbarao *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012). Ainsi, les relations fortes de coévolution entre les plantes et certains grands groupes fonctionnels de microorganismes libres largement diversifiés n'ont à notre connaissance jamais vraiment été explorées.

La communauté fonctionnelle des dénitrifiants regroupe essentiellement des bactéries libres d'une grande diversité puisqu'elles appartiennent à la plupart des genres bactériens (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). Les dénitrifiants bactériens sont un groupe fonctionnel très ancien apparu avant les plantes, il y a au moins 2.72 milliards d'années comme le témoignent des

mesures isotopiques de l'azote dans des sédiments anciens (Thomazo *et al.*, 2011). Il est donc probable que les phénomènes de coévolution entre les plantes et les bactéries dénitrifiantes aient été intenses donnant lieu à l'apparition d'interactions particulières. L'effet des plantes sur les dénitrifiants n'a été à ce jour abordé et décrit que du point de vue indirect, c'est à dire en intégrant des interactions de types trophiques où les plantes affectent la disponibilité des éléments nécessaires au processus de dénitrification (disponibilité en oxygène, en nitrate et en sources de carbone). La communauté scientifique semble rester sceptique face à l'existence de phénomènes d'interactions directes impliquant des composés chimiques pouvant affecter de manière ciblée les dénitrifiants, probablement du fait de la grande diversité de ces microorganismes.

La dénitrification représente une part importante des pertes biologiques d'azote des sols (25% à 90 %) (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011) et l'azote est considéré comme le principal facteur limitant la croissance des plantes en milieu terrestre (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008). De plus, il est admis que la compétition entre les microorganismes et les plantes pour l'azote est intense (Hodge *et al.*, 2000; Kuzyakov & Xu, 2013). Ainsi, la productivité végétale dépend en grande partie des processus du cycle de l'azote et des pertes en azote du sol occasionnées par ces processus (*i.e.* dénitrification et lessivage) (van der Heijden *et al.*, 2008).

Dans le cadre des théories du « plant-soil feedback » l'effet avéré de composés végétaux ciblant les dénitrifiants laisserait entrevoir une réduction des pertes en azote des sols au voisinage de certaines plantes ayant en retour un effet supposé bénéfique sur leur croissance.

Les objectifs de cette thèse sont d'explorer les relations entre les plantes, à travers un complexe d'espèces modèles *Fallopia* spp. et la communauté bactérienne dénitrifiante. Ces travaux ont été réunis dans une partie expérimentale. Dans un premier temps il s'agit de démontrer l'existence d'interactions particulières entre plantes et bactéries dénitrifiantes ; ensuite, de déterminer la nature et d'isoler les médiateurs impliqués dans ces relations entre *Fallopia* spp. et les dénitrifiants. Puis les mécanismes d'actions de ces médiateurs sur les dénitrifiants sont étudiés. Ensuite, nous explorons les mécanismes de coévolution entre dénitrifiants et *Fallopia* spp. et enfin, dans le cadre du « plant-soil feedback », nous présentons une expérience préliminaire sur le retour à la plante de ces mécanismes de coévolution. Au préalable, j'ai entrepris de rédiger une synthèse bibliographique regroupant l'essentiel des

connaissances nécessaires pour assurer à vous lecteurs la bonne compréhension du travail effectué durant mes trois années de thèse.

Bonne lecture.

Chapitre 1 Synthèse bibliographique : Les interactions entre plantes et microorganismes, des relations complexes.

Introduction

La zone d'influence des plantes sur le fonctionnement microbien du sol est principalement la rhizosphère, bien que les plantes puissent agir aussi sur le fonctionnement des sols par l'intermédiaire de leurs litières (Hattenschwiler *et al.*, 2005) voire de l'émission de composés volatiles (Loreto *et al.*, 2014). Le terme rhizosphère a été défini pour la première fois par Hiltner (1904), pour décrire une zone d'activité microbienne intense autour des racines des légumineuses du fait de la libération par les racines de quantités importantes de matière organique. Depuis, le terme rhizosphère a pris un sens plus général et désigne la fraction du sol immédiatement influencée physiquement et biologiquement par les racines des plantes (Walker *et al.*, 2003). Un nombre important de microorganismes comme des bactéries et des champignons coexistent au sein de la rhizosphère qui vont fortement influencer sur la croissance des plantes (van der Heijden *et al.*, 2008). A l'inverse les plantes vont également influencer le développement des microorganismes en créant un environnement sélectif qui va fortement influencer les abondances et la composition de ces microorganismes (Hartmann *et al.*, 2009). On estime que les champignons sont entre 10 et 20 fois et les bactéries entre 2 et 20 fois plus abondants au niveau de la rhizosphère en comparaison du sol nu (Morgan *et al.*, 2005). Deux types de diversité peuvent être distinguées au sein des communautés microbiennes, la diversité taxonomique et la diversité fonctionnelle (Mendes *et al.*, 2014). Les bactéries sont considérées comme les microorganismes les plus abondants des sols (Barriuso *et al.*, 2008) les études autour de la diversité des microorganismes se sont donc principalement intéressées à elles. Les comparaisons de diversité microbienne entre sols rhizosphériques et non-rhizosphériques ont démontré que la pression de sélection racinaire réduit la diversité taxonomique bactérienne des sols rhizosphériques en comparaison des sols non-rhizosphériques. Marilley *et al.* (1998) ont ainsi pu démontrer que la diversité bactérienne diminuait plus l'on se rapprochait de la zone d'influence des racines de *Lolium perenne* et *Trifolium repens* (*i.e.* sol nu : $H' = 1.42$; sols rhizosphériques $H' = 1.34 - 1.31$; sols endorhizosphériques $H' = 1.15 - 0.99$). Les comparaisons de diversité fonctionnelle entre sols quant à elles ont été initialement réalisées autour de la capacité des microorganismes des sols à utiliser des sources de carbones à l'aide de micro-plaques Biolog (Biolog, Hayward, California, USA) (Derry *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 2001). Tam *et al.* (2001) ont pu démontrer que la diversité fonctionnelle basée sur la capacité des microorganismes à utiliser des sources de carbone était plus importante dans les sols rhizosphériques de plantes de toundra (*i.e.* *Dryas integrifolia*, *Salix arctica* *Carex spp.*) que dans les sols non-

rhizosphériques (*i.e.* rhizosphériques $H' = 3.023 \pm 0.197$; non-rhizosphériques $H' = 2.770 \pm 0.154$). Ces résultats montraient déjà que les plantes étaient capables de sélectionner activement les microorganismes associés à leur rhizosphère à différents niveaux de diversité. Néanmoins, le lien entre diversité taxonomique et diversité fonctionnelle au sein de la rhizosphère des plantes reste encore mystérieux (Barriuso *et al.*, 2008). Les progrès techniques sur le séquençage de l'ADN métagénomique des sols et l'annotation des séquences apportent cependant quelques réponses. Dans une étude récente basée sur une comparaison des séquences génétiques d'un point de vue taxonomique et fonctionnel du sol rhizosphérique et non-rhizosphérique du soja (*Glycine max*), Mendes *et al.* (2014) ont pu démontrer que le soja sélectionne les communautés bactériennes aussi bien au niveau taxonomique que fonctionnel. D'un point de vue fonctionnel, les auteurs démontrent que le soja sélectionne les communautés bactériennes en lien avec l'azote (*i.e.* fixation, nitrification et dénitrification), le potassium (*i.e.* assimilation du potassium chez les bactéries), le phosphore (*i.e.* solubilisation du phosphore), le fer (*i.e.* assimilation du fer chez les bactéries) et le transport membranaire (*i.e.* système de sécrétion de type IV, impliqué dans les interactions symbiotiques). Cette sélection des groupes fonctionnels au sein de la rhizosphère du soja est un exemple qui démontre l'existence d'interactions fortes entre plantes et microorganismes particulièrement en lien avec leur nutrition respective et les interactions symbiotiques.

Les interactions entre plantes et microorganismes peuvent être de natures très différentes, soit non spécifiques soit au contraire très spécifiques. Dans ce dernier cas, les études portent aussi bien sur des interactions bénéfiques (*i.e.* symbioses) que néfastes (*i.e.* parasitisme) mais dans la plupart des cas, elles concernent une espèce de microorganisme précise et démontrent le rôle majeur du dialogue moléculaire via des médiateurs chimiques dans la reconnaissance et la spécificité des interactions entre les partenaires impliqués (Hassan & Mathesius, 2012; Wirthmueller *et al.*, 2013). Les interactions spécifiques entre plantes et microorganismes ont donc essentiellement été étudiées d'un point de vue taxonomique. Cependant, dans le cas des groupes fonctionnels microbiens très diversifiés taxonomiquement, peu d'études à ce jour démontrent l'existence d'interactions spécifiques faisant intervenir des médiateurs chimiques (Subbarao *et al.*, 2009; Heumann *et al.*, 2013).

Par ces interactions spécifiques, les plantes seraient capable de prendre le contrôle des microorganismes et ainsi modifier les conditions des sols afin de promouvoir leur croissance (Kulmatiski *et al.*, 2008; van der Putten *et al.*, 2013).

Dans cette synthèse bibliographique nous explorerons dans un premier temps les interactions non-spécifiques entre les microorganismes du sol et les plantes en lien avec leur nutrition. Ensuite, nous explorerons des exemples démontrant l'existence d'interactions spécifiques entre certains microorganismes, restreints taxonomiquement, et certaines plantes ainsi que le rôle des médiateurs chimiques dans ces interactions. Puis, nous exposerons des exemples démontrant l'existence d'interactions spécifiques, impliquant des médiateurs chimiques, entre certaines plantes et des groupes fonctionnels diversifiés taxonomiquement. Enfin, nous discuterons des effets de ces inhibitions spécifiques des groupes fonctionnels microbiens sur le développement des plantes (Kulmatiski *et al.*, 2008; van der Putten *et al.*, 2013).

I. Interactions non spécifiques entre plantes et microorganismes

1. Les microorganismes de la rhizosphère influencent les plantes via leurs actions sur la disponibilité en nutriments

Dans son article sur la rhizosphère, Hiltner (1904) suggérait que le développement intense des microorganismes au sein de la rhizosphère pouvait très fortement influencer la croissance des plantes (Bowen & Rovira, 1961). Néanmoins, il y a encore de cela 50 ans, mis à part les rhizobia, les mycorhizes et les pathogènes, l'influence des microorganismes du sol sur la croissance des plantes était peu connue (Bowen & Rovira, 1961).

Les facteurs abiotiques comme la lumière et la disponibilité en nutriments (C, N, P, Fe, Mg, CO₂...) sont depuis longtemps considérés comme prépondérants dans le développement des plantes (Garner & Allard, 1919). Depuis la découverte du rôle des microorganismes sur les transformations et la disponibilité des éléments minéraux et les cycles biogéochimiques (C, N, P, Fe, Mg...) (Lerman & Division, 1988) les travaux de Hiltner (1904) passe pour une évidence. Les plantes dépendent fortement des microorganismes pour leur nutrition et notamment pour leur nutrition azotée souvent considérée comme l'un des premiers facteurs limitants leur croissance (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008) (Encadré 1).

Encadré 1: La nutrition azotée des plantes

Les plantes absorbent essentiellement les formes inorganiques de l'azote (i.e NO_3 et NH_4) (Hodge *et al.*, 2000) en délaissant les formes organiques aux microorganismes. Il est cependant difficile de comparer les effets du NH_4 et du NO_3 sur la croissance des plantes du fait des caractéristiques physiques diamétralement opposées de ces deux ions (Agronomy, 1980). D'autant plus que certaines plantes affichent une préférence pour l'une ou l'autre forme d'azote. De manière générale l'assimilation d'ammonium semble être moins coûteuse en énergie (Salsac *et al.*, 1987) car l'ion est directement assimilé, sous l'action de la glutamine synthase, alors que l'assimilation du nitrate nécessite d'abord sa double réduction en NO_2 puis en NH_4 (Tischner, 2000). Néanmoins, il apparaît que l'ion NH_4 est toxique pour la plante à certaines concentrations et que cette toxicité peu contre balancer l'avantage énergétique de l'assimilation du NH_4 plutôt que du NO_3 (Britto & Kronzucker, 2002). Ainsi, Britto & Kronzucker (2002) ont pu montrer que l'orge (*Hordeum vulgare*) mis à pousser en hydroponie dans une solution contenant 10mM de NH_4 atteignait une taille réduite par rapport à l'orge cultivé sous 10mM de NO_3 . De plus, la faible toxicité du NO_3 lui confère l'avantage d'être facilement stockable dans les tissus végétaux (Bloom *et al.*, 2002). Le NH_4 chargé positivement est souvent retenu sur les complexes organo-minéraux du sol, le rendant ainsi moins accessible que le NO_3 (Bothe *et al.*, 2006). A l'inverse, le NO_3 du fait de sa charge négative est plus mobile et susceptible d'être lessivé donc perdu (Bothe *et al.*, 2006). Néanmoins, sa mobilité lui confère une capacité de diffusion vers les racines plus élevée (Bloom *et al.*, 2002).

a. Les microorganismes fournissent des nutriments aux plantes.

Des effets bénéfiques sur les plantes existent *via* l'action des microorganismes sur les constituants du sol qui conduit à la formation de nutriments ou de composés favorisant la croissance des plantes. Par exemple, la dégradation de la matière organique par les champignons ou les bactéries entraîne la libération d'azote assimilable par les plantes (Hattenschwiler *et al.*, 2005). Ainsi, la majorité de l'azote des sols contenu dans la matière organique (96-98%) et inaccessible aux plantes (Bennett & Schimel, 2004) est libéré sous l'action d'exoenzymes microbiennes sous des formes disponibles pour les plantes (Bennett &

Schimel, 2004). Ceci illustre en partie l'importance des microorganismes dans les cycles biogéochimiques, notamment celui de l'azote (encadré 2).

Les bactéries libres fixatrices d'azote atmosphérique occupent une place de choix puisqu'elles contribuent à compenser une partie des pertes en azote des sols résultant du lessivage et de la dénitrification. Ceci grâce à leur capacité à fixer le N₂ atmosphérique, via leur nitrogenase codé par les gènes *nif*. A l'inverse de ces bactéries, les plantes ne possèdent pas cette enzyme et malgré que l'atmosphère soit le plus grand réservoir d'azote disponible sur Terre (~78% de N₂ dans l'atmosphère soit ~ 50% de l'azote terrestre total), il leur est inaccessible (Galloway *et al.*, 2004). Il a été montré que leur activité favorise l'assimilation de l'azote par les plantes (Cleveland *et al.*, 1999).

Les microorganismes jouent également un rôle central dans l'altération des minéraux, les rendant ainsi disponibles pour les plantes. Les bactéries et les champignons notamment dans la rhizosphère, exercent une action significative sur la dissolution d'éléments minéraux (phosphore, potassium, fer, magnésium...) des roches du sol et contribuent à la nutrition minérale de la plante (Berthelin, 1988). Des enzymes produites par des bactéries du sol comme les phosphatases, les phytases, les phosphonatases et les C-P lyases permettent à partir de phosphates organiques insolubles, de libérer du phosphore soluble accessible aux plantes (Vassilev *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007). La libération de phosphore à partir des minéraux s'opère quant à elle par la production d'acide organique, comme l'acide gluconique (Vassilev *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007). Ces propriétés sont communes à un grand nombre de genres bactériens et ne se cantonnent pas qu'aux bactéries.

En plus d'avoir des effets bénéfiques indirects sur le développement des plantes, les microorganismes peuvent également avoir des effets négatifs.

Encadré 2: Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est réalisé dans sa majeure partie par les microorganismes du sol (Jetten, 2008) dont dépend la disponibilité des différentes formes d'azote indispensables au développement des organismes (Fig. 1). Il s'agit d'un ensemble de processus de transformation de l'azote sous toutes ses formes. Les micro-organismes libres et symbiotiques fixateurs de N_2 atmosphérique, principal réservoir d'azote, fournissent de l'ammonium pouvant être assimilé par les êtres vivants. Les nitrifiants oxydent l'ammonium en nitrite et nitrate, formes de l'azote également assimilables par les plantes. Enfin, les dénitrifiants, réduisent les formes oxydées de l'azote en formes gazeuses (NO , N_2O et N_2) qui retournent dans l'atmosphère. La dénitrification prend une place très importante dans le cycle de l'azote car elle est responsable de la principale perte biologique d'azote du sol (Both *et al.*, 2006).

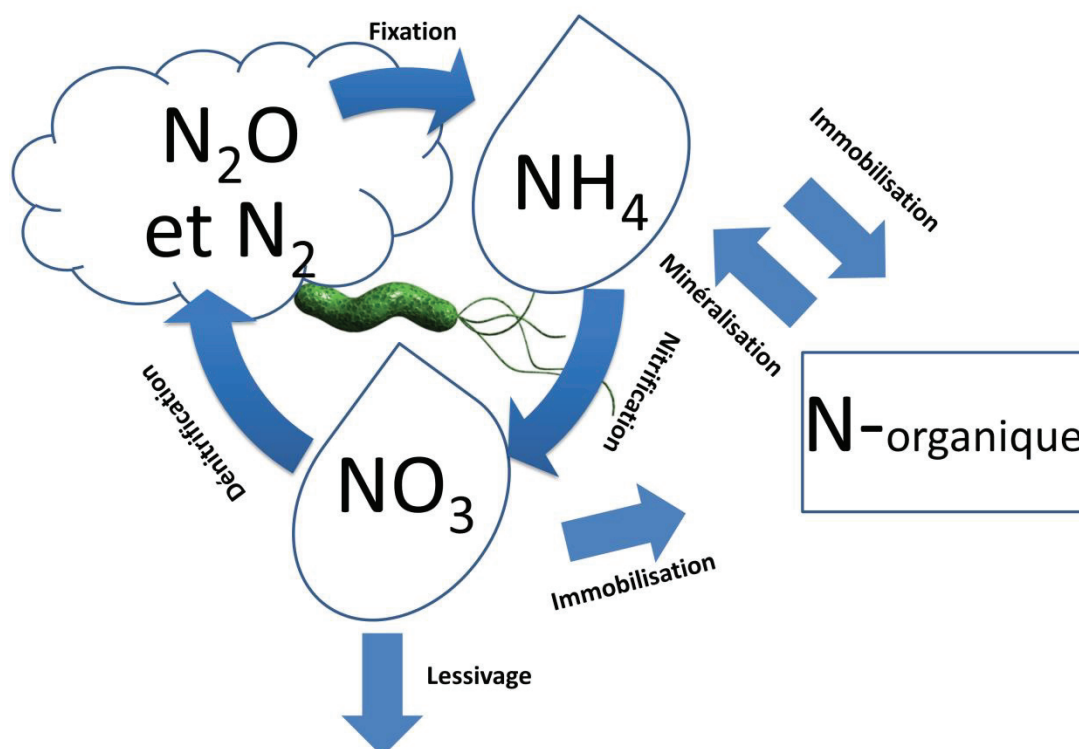


Figure 1 : Schéma des différents processus du cycle de l'azote.

Mis à part leur implication dans les processus clés du cycle de l'azote (*i.e.* fixation, nitrification, dénitrification, minéralisation, immobilisation), du fait que l'azote est un élément essentiel chez tous les organismes vivants, les microorganismes vont utiliser l'azote pour la

production de biomasse (Geisseler *et al.*, 2010). Les microorganismes sont à la fois capables d'utiliser l'azote minérale et l'azote organique (Geisseler *et al.*, 2010). Ils sont les premiers acteurs de la formation de l'azote minéral (*i.e.* minéralisation) dans les sols par la dégradation de l'azote organique (Geisseler *et al.*, 2010). Il est admis que le NH_4 est la source d'azote préférentiellement assimilée par les microorganismes car moins coûteuse en énergie (Merrick & Edwards, 1995). Néanmoins, les microorganismes sont capables d'utiliser le nitrate bien que son assimilation plus coûteuse en énergie, nécessite avant, sa réduction par la nitrate-réductase assimilative (*i.e.* ANR) en NO_2 puis la réduction du NO_2 par la nitrite-réductase avant d'être assimilée sous la forme de NH_4 (Merrick & Edwards, 1995). L'utilisation du NO_3 semble être induite par la présence de NO_3 ou de NO_2 et la limitation en NH_4 . L'utilisation de l'azote issue de la matière organique sera elle plus coûteuse en énergie mais la compétition pour ce substrat sera moins intense (Hodge *et al.*, 2000).

L'azote étant le premier facteur limitant dans beaucoup d'écosystèmes terrestres (Vitousek & Howarth, 1991a; Reinhart & Callaway, 2006), les organismes vivants vont être fortement dépendants des processus microbiens liés à l'azote, notamment aux pertes du milieu et aux transformations de l'azote dans toutes ses formes (Vitousek & Howarth, 1991a). Des processus de compétition vont donc s'instaurer entre les microorganismes moteurs du cycle de l'azote et les plantes.

b. Les activités des microorganismes peuvent aussi limiter la disponibilité en nutriments pour les plantes.

Les microorganismes peuvent influencer indirectement la croissance des plantes par des phénomènes de compétitions pour les différents éléments essentiels à leur développement comme l'azote, le phosphore ou le fer (Hodge *et al.*, 2000; van der Heijden *et al.*, 2008; Lemanceau *et al.*, 2009; Kuzyakov & Xu, 2013) que les microorganismes sont supposés assimiler plus facilement et plus rapidement (Hodge *et al.*, 2000; Kuzyakov & Xu, 2013).

La compétition entre microorganismes et plantes pour l'azote minéral (NH_4 et NO_3) est connue pour être intense. La compétition pour le nitrate est plus intense que celle pour l'ammonium. En effet, le nitrate est généralement consommé quasi aussi rapidement qu'il est produit avec un taux d'assimilation plus élevé des microorganismes que celui des plantes (Jackson *et al.*, 1989 in Knops, Bradley *et al.* 2002). Bien souvent ce sont les microorganismes qui sont considérés comme les compétiteurs les plus efficaces pour l'azote

minéral du fait de leur plus grand rapport surface/volume, de leur temps de génération court et de leur vitesse de croissance élevée (Hodge *et al.*, 2000; Knops *et al.*, 2002; Kuzyakov & Xu, 2013). Dans une étude récente Kuzyakov *et al.* (2013) ont pu référencer les K_m et V_{max} d'assimilation du NH_4 , du NO_3 et des acides aminés chez les plantes (35 études ; 436 K_m et V_{max}) et les microorganismes (42 études ; 249 K_m et V_{max}). Les auteurs ont calculé les moyennes de ces paramètres et en ont déduit les cinétiques moyennes d'assimilation de ces substrats azotés chez les plantes et les microorganismes. Les auteurs en ont conclu que les microorganismes étaient beaucoup plus efficaces dans l'assimilation des formes inorganiques de l'azote (*i.e.* NH_4 , et NO_3), avec des K_m et V_{max} moyens respectivement plus faible et plus fort que celui des plantes (Fig. 2).

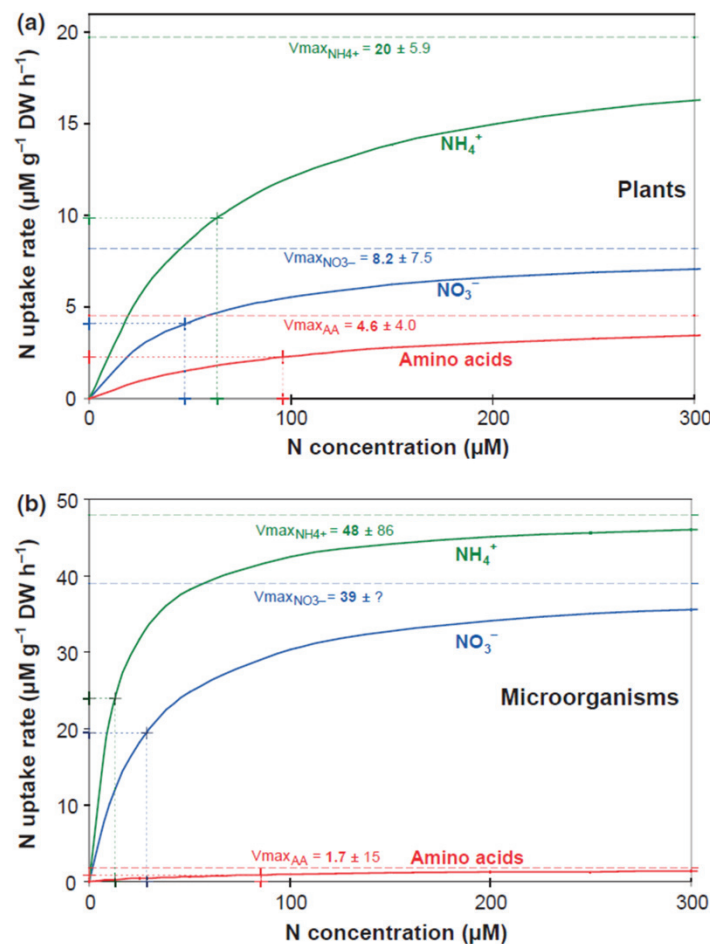


Figure 2 : Cinétique de Michaelis-Menten de l'assimilation de l'azote sous la forme de NO_3 , NH_4 ou d'acides aminés. Les paramètres ont été calculés à partir de données d'études sur les plantes (35 études ; 436 K_m et V_{max}) et les microorganismes (42 études ; 249 K_m et V_{max}) et rapportés en masse sèche racinaire pour les plantes et masse sèche microbienne pour les microorganismes. Les cinétiques montrent clairement à toutes les concentrations mais plus particulièrement aux faibles, que les microorganismes sont beaucoup plus efficaces dans l'acquisition du NO_3 et du NH_4 . D'après, Kuzyakov & Xu (2013)

En revanche, sur le long terme le rapide turn-over de la biomasse microbienne offre l'opportunité aux racines de capturer l'azote réintroduit dans le milieu suite à la lyse cellulaire des microorganismes (Knops *et al.*, 2002). Ainsi, tout évènement affectant l'intégrité cellulaire des microorganismes (*i.e.* gel-dégel, sécheresse-réhydratation, toxines...), en réduisant les populations microbiennes et rendant disponible l'azote via la lyse cellulaire, faciliterait l'assimilation de l'azote par les plantes.

Des facteurs limitant le développement microbien apporteraient également un avantage aux plantes dans l'assimilation des formes inorganiques de l'azote en modifiant la valeur compétitive. De plus, tout facteur limitant l'accès des microorganismes aux formes inorganiques de l'azote augmenterait la disponibilité pour les plantes.

Cette compétition pour les nutriments entre microorganismes et plantes pourrait être plus importante en milieux pauvres qu'en milieu riche. Hattenschwiler *et al.* (2005) suggèrent que la contribution des microorganismes à la productivité des plantes est plus fortes dans ces milieux pauvres (Fig. 3).

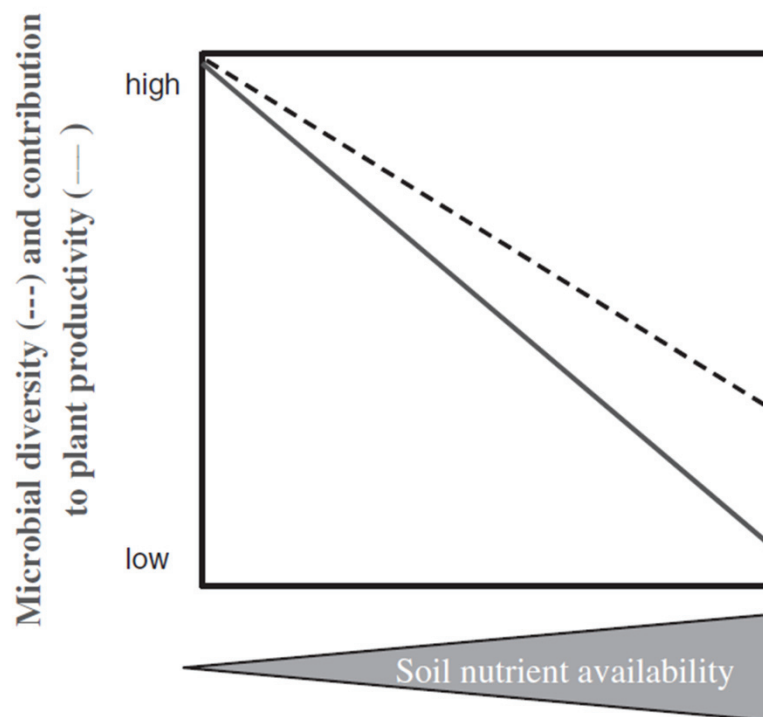


Figure 3 : Relation hypothétique entre la disponibilité en nutriments et la contribution microbienne à la productivité des plantes (van der Heijden *et al.*, 2008). Les microorganismes sont supposés être les plus importants producteurs de nutriments pour la plante dans les écosystèmes pauvres.

Ceci s'expliquerait par la forte dépendance des plantes aux processus microbiens pour la disponibilité en nutriments. Ainsi, les plantes sont souvent dépendantes des mycorhizes et des bactéries fixatrices d'azote, dans les écosystèmes pauvres où elles sont plus vulnérables aux pertes en azote. En effet, la moindre perte en nutriment dans un écosystème pauvre est immédiatement suivie d'une perte de productivité végétale.

Ainsi, quasiment tous les microorganismes seraient capables de jouer sur la croissance des plantes sans que des relations fortes ne se soient installées, soit par compétition pour les nutriments soit en tant que moteur des cycles biogéochimiques donnant accès aux nutriments aux plantes. Ce qui complique encore la situation c'est que les microorganismes ne sont pas les seuls « maîtres du jeu », les plantes sont également capables d'influencer les microorganismes. Les plantes influencent les microorganismes de la rhizosphère

2. Les plantes influencent les microorganismes de la rhizosphère

Au milieu du 20^{ème} siècle il était admis que les facteurs abiotiques comme la température, l'humidité ou le pH étaient les principaux facteurs influençant le fonctionnement microbien des sols (Smith, 1948). Ainsi, l'influence des facteurs biotiques comme les plantes ont longtemps été sous-estimés (Hobbie, 1992). Néanmoins, il est maintenant bien connu que les plantes peuvent influencer le fonctionnement microbien des sols (Berg & Smalla, 2009; Hartmann *et al.*, 2009) et fortement interagir avec les microorganismes, au point même d'être considérées comme au moins aussi importantes que les facteurs abiotiques (Hobbie, 1992).

Il est maintenant admis que les plantes influencent les communautés microbiennes du sol au sein de leur rhizosphère par le phénomène de rhizodéposition (Encadré 3) (Philippot *et al.*, 2013). Ainsi, la grande majorité des composés produits par les racines se retrouvent libérés au niveau de la rhizosphère et sont à même d'agir sur les microorganismes (Bertin *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2009). Ces composés incluent des sucres et des polysaccharides (*i.e.* arabinose, fructose, glucose, maltose, mannose, oligosaccharides), des acides aminés (*i.e.* arginine, asparagine, cysteine, cystine, glutamine, acide aspartique), des acides organiques (*i.e.* acide acétique, benzoïque, ferulique, malique), des composés phénoliques, des polyphénols, des enzymes, des acides gras, des vitamines ... (Bertin *et al.*, 2003).

La disponibilité en matière organique est un facteur important pour le développement des microorganismes hétérotrophes et c'est pourquoi la rhizodéposition joue un rôle majeur dans la colonisation de la rhizosphère (Jones *et al.*, 2009).

Encadré 3: La rhizodéposition

La rhizodéposition correspond au carbone libéré par les racines, elle représente une proportion importante de l'assimilation photosynthétique (Lynch & Whipps, 1991) (Fig. 4). Il a en effet été estimé que jusqu'à 20% du carbone fixé lors de la photosynthèse soit 27 % du carbone alloué aux racines pouvait être libéré dans le sol par rhizodéposition chez les céréales (Lynch, 1990; Jones *et al.*, 2009).

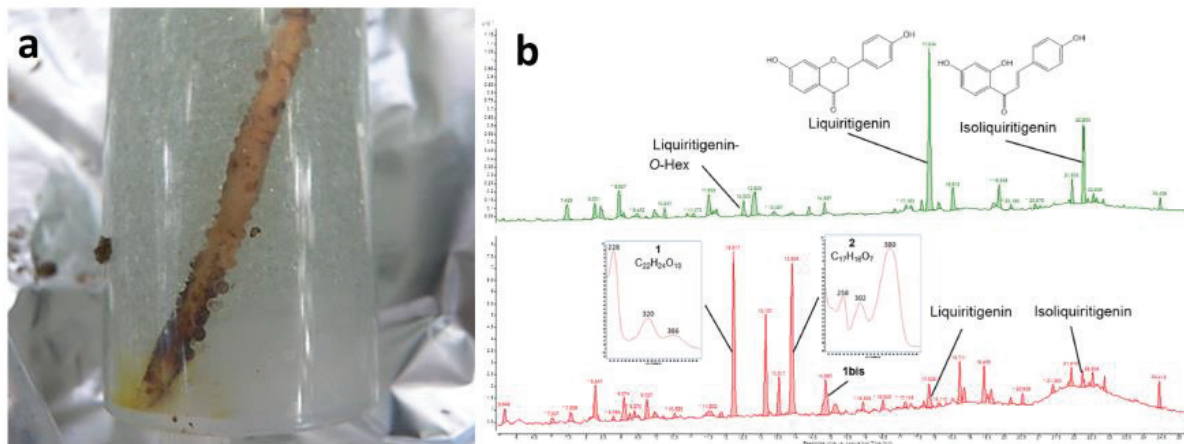


Figure 4 : a) Photographie illustrant le phénomène d'exsudation racinaire chez *Eperua falcata* et b) chromatogrammes correspondants à l'analyse des exsudats de *E. falcata* par HPLC. D'après Michalet *et al.* (2013).

Plusieurs fractions sont généralement distinguées :

- Les exsudats : composés hydrosolubles de faible poids moléculaire, transférés des cellules épidermiques racinaires au sol par diffusion passive en réponse aux gradients de concentration existant entre le cytosol racinaire et la solution du sol (Jones *et al.*, 2004). Ce phénomène concerne les molécules telles que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les vitamines et les ions inorganiques. Ces molécules sont généralement dégradées en quelques heures par les microorganismes du sol (Kuzyakov and Demin, 1998).
- Les sécrétions : composés de haut poids moléculaire tels que le mucilage, les protéines, les polymères d'hydrate de carbone et les enzymes. Cette fraction assure la lubrification nécessaire à la progression de la racine dans le sol (Guckert *et al.*, 1975).

- Les lysats : cellules desquamées de la coiffe racinaire, lysats solubles, chevelu racinaire en décomposition et cellules corticales (Foster, 1988).
- Les gaz : tel que le CO₂, le O₂ et l'éthylène.

L'effet rhizosphère est connu des microbiologistes depuis de nombreuses années (Barber, 1995; Davet, 1996). Il s'illustre par une forte augmentation de la diversité et des abondances des microorganismes du fait d'une disponibilité accrue en nutriments carbonés au sein de la rhizosphère (Prashar *et al.*, 2014). Lynch (1990) a ainsi montré que la quantité de carbone introduite dans le sol par les racines pouvait atteindre 11% de la quantité nette de carbone fixée par les parties aériennes, faisant ainsi de la rhizosphère un milieu propice au développement des microorganismes hétérotrophes de tous genres.

Néanmoins, malgré l'abondance en nutriments carbonés au sein de la rhizosphère, il semble que d'autres phénomènes tels que la modification des conditions environnementales (pH, Redox, ...) ou la compétition pour d'autres nutriments (comme montré précédemment) puissent jouer un rôle important dans la sélection des communautés microbiennes et leur fonctionnement. Ainsi, les microorganismes (*i.e.* bactéries et champignons) et notamment le groupe bactérien modèle des *Pseudomonads* ont développé une stratégie particulière d'acquisition du fer. En effet, ils synthétisent et libèrent des molécules de faible poids moléculaire (généralement moins de 1000 Daltons) appelées sidérophores («capteur de fer» en grecque) montrant une forte affinité et des propriétés chélatantes du fer (Guerinot, 1994) qui sont ensuite transportés jusqu'à la cellule via des récepteurs membranaires spécifiques (Neilands, 1981). Tout d'abord, les sidérophores et les récepteurs associés ne sont synthétisés par les bactéries que dans des conditions où le fer est limitant (Lemanceau *et al.*, 2009) suggérant l'effet que pourrait entraîner la compétition pour le fer avec les plantes sur le fonctionnement de ces microorganismes. Dans un deuxième temps, Robin *et al.* (2006 ;2007) ont comparé les populations de *Pseudomonads* entre un tabac sauvage et un tabac transgénique surexprimant la ferritine (*i.e.* protéine de stockage du fer). Cette surexpression entraînait une augmentation de l'assimilation du fer chez la plante conduisant à une réduction de la biodisponibilité du fer au sein de la rhizosphère. Les auteurs ont pu démontrer que les populations de *Pseudomonads* différaient en terme de composition d'espèces entre ces deux rhizosphères (Robin *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 2007). Ils ont également mis en évidence que

les *Pseudomonads* issus de la rhizosphère présentant une déplétion en fer étaient moins sensibles à la privation en fer (Robin *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont montré également l'influence des plantes sur les caractéristiques physico-chimiques des sols. Les deux facteurs physico-chimiques admis comme influençant le plus le fonctionnement microbien sont certainement le pH et le potentiel redox (Hinsinger *et al.*, 2009). Il a été montré que les plantes pouvaient agir sur ces facteurs au sein de leur rhizosphère par la libération ou l'assimilation d'ions (Hinsinger *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2009). Les plantes sont ainsi capable de moduler jusqu'à deux unités le pH du sol (Hinsinger *et al.*, 2009) ce qui pourrait avoir de fortes conséquences sur le développement et le fonctionnement d'un grand nombre de microorganismes (Fig. 5b).

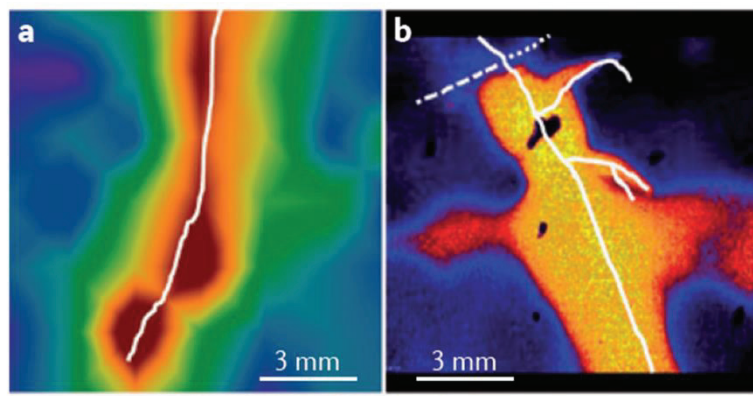


Figure 5: a) Profil d'oxygène le long d'une racine de *Juncus effusus* et b) Profil de pH le long d'une racine de blé dur (tiré blanc) et de pois chiche (trait plein blanc) d'après Philippot *et al.* (2013) reproduit d'après a) Blossfeld *et al.* (2011) et b) Blossfeld *et al.*(2013).

En plus de ces deux variables, les racines des plantes peuvent également influencer fortement la disponibilité en oxygène au sein de la rhizosphère notamment en favorisant sa diffusion limitant ainsi l'hypoxie (Blossfeld *et al.*, 2011)(Fig. 5a).

Dans les exemples précédemment cités, toutes les interactions sont non spécifiques puisque, qu'elles soient des microorganismes vers les plantes ou des plantes vers les microorganismes, elles touchent indifféremment la plupart des plantes ou la plupart les microorganismes. Toutefois il existe aussi des interactions présentant des spécificités très fortes qui impliquent une reconnaissance parfaite entre les deux acteurs de l'interaction.

II. La spécificité d'hôte dans les relations entre plante et microorganismes

Au cours de l'évolution les interactions entre plantes et microorganismes ont donné lieu à l'émergence de relations particulièrement fortes notamment dans le cas des symbioses (Chisholm *et al.*, 2006; Occhipinti, 2013) et des interactions avec des pathogènes. Bary (1879) a défini pour la première fois le terme de symbiose comme des « organismes différents (*i.e.* espèces différentes) vivants ensemble » et les a classées en deux catégories, les symbioses antagonistes ou pathogènes (*i.e.* bénéficiaires pour au moins un des partenaires mais délétère pour les autres) et les symbioses mutualistes (*i.e.* bénéficiaires à tous les partenaires), mais actuellement le terme de symbiose n'est plus employé que pour les associations bénéfiques (*i.e.* symbioses mutualistes et associatives). La symbiose antagoniste a perdu son sens premier et dans la littérature elle est maintenant désignée par les termes parasitisme et pathogénie.

De plus en plus d'études s'attardent à faire la comparaison des mécanismes mis en œuvre dans les interactions symbiotiques et celles impliquant des pathogènes car dans les deux cas, il existe un dialogue moléculaire généralement basé sur un échange de signaux chimiques entre les partenaires. C'est ce dialogue qui est à l'origine de la spécificité des interactions et qui souvent détermine la reconnaissance d'un agent symbiotique ou d'un parasite.

Une description exhaustive des différentes interactions spécifiques qui existent entre plantes et microorganismes n'est pas l'objet de cette synthèse, seuls quelques exemples sont présentés afin d'illustrer la spécificité d'hôte et la place des médiateurs chimiques dans ces interactions.

1. Les relations plantes/ microorganismes pathogènes

Les plantes sont utilisées comme source de nutriments par pléthore de pathogènes microscopiques, allant des bactéries aux champignons. Les conséquences des microorganismes pathogènes sur le développement des plantes sont bien connues. Il est admis que l'infection d'une plante par un pathogène aura pour effet de réduire la production végétale ce qui définit leur type d'interaction (Wirthmueller *et al.*, 2013). Bien que le spectre d'infection d'un pathogène à l'autre forme un continuum, certains pathogènes se cantonnent à quelques familles de plantes (Barrett *et al.*, 2009). Cette interaction particulière entre un pathogène et une famille de plantes résulte de liens évolutifs forts illustrant une forte spécificité d'interaction. Ainsi, certains microorganismes pathogènes ne sont capables de parasiter que quelques espèces végétales. Le champignon *Puccinia graminis* est considéré

comme l'un de ces spécialistes avec une gamme d'hôtes réduite. *P. graminis* est notamment capable d'infester le blé chez lequel il peut totalement détruire une récolte. Notamment, la race Ug99 du champignon *P. graminis* infeste près de 90% des variétés de blé cultivées à travers le monde et est aujourd'hui considérée comme une menace pour la production alimentaire mondiale (Singh *et al.*, 2011). Ce pathogène a été recensé sur près de 500 espèces hôtes regroupant 107 genres mais ces hôtes sont regroupés chez seulement deux familles végétales, les Poacées et les Berbéridacées montrant une spécificité à l'échelle de la famille végétale dans son spectre de pathogénicité (Barrett *et al.*, 2009; Farr & Rossman, 2009).

2. Les symbioses mutualistes

Chez les symbioses mutualistes on retrouve notamment les symbioses mycorrhiziennes impliquant des champignons et des plantes, les symbioses entre les *Rhizobiaceae* et les *Fabaceae* ou entre les plantes actinorhiziennes et les bactéries du genre *Frankia*. Dans cette dernière, la spécificité d'hôte s'illustre très bien par l'utilisation des groupes d'ineffectivité longtemps utilisés pour caractériser les souches de *Frankia* spp.. Une phylogénie basée sur le 16S rRNA a permis d'identifier 4 clades principaux chez les bactéries du genre *Frankia* tout en les regroupant en fonction de leur spécificité d'hôte: #1- les souches infectant les genres végétaux *Alnus*, *Myrica*, *Morella* et *Casuarina* #2-les souches non-isolées présentes dans les nodules des genres *Datisca*, *Coriaria* et les familles des *Rosaceae* et *Rhamnaceae*, # 3-les souches infectant les *Elaeagnaceae* et *Gymnostoma* #4-un groupe hétérogène et large regroupant les souches non-infectives ainsi que des souches infectives du genre *Alnus* (Normand & Fernandez, 2009) (Fig. 6).

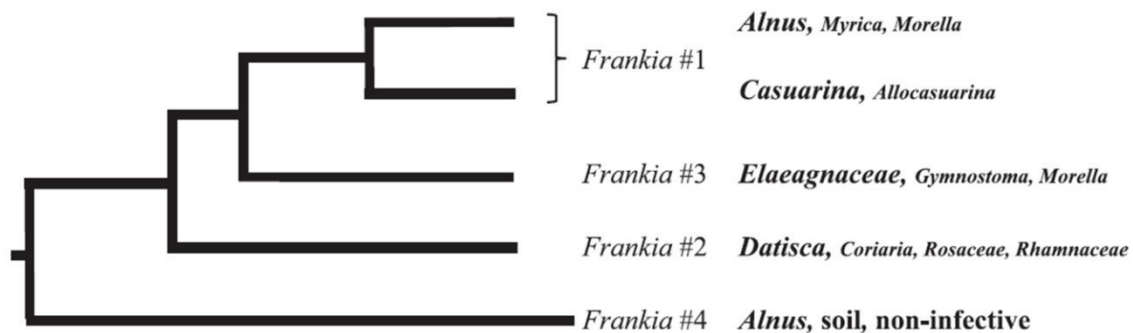


Figure 6: Arbre phylogénétique de *Frankia* spp. basé sur le 16S rRNA. Faite avec les clades reconnus en accord avec Normand *et al.*(2009) dans Kucho *et al.* (2010).

Ces résultats démontrent l'existence d'interactions spécifiques entre symbiotes mutualistes et plantes associées.

3. Les symbioses associatives

Les symbioses associatives sont définies comme des interactions non obligatoires fournissant des bénéfices réciproques, les bactéries impliquées sont regroupées dans la catégorie des PGPR (Encadré 4).

Ce type de symbiose est pour l'heure encore, moins bien connu que les symbioses mutualistes. Les mécanismes impliqués sont encore flous et il est difficile de clairement mettre en évidence une spécificité forte, toutefois certains éléments laissent supposer une certaine spécificité.

Encadré 4: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

Les PGPR se définissent comme toute bactérie de la rhizosphère ayant un effet bénéfique pour une plante (Glick, 1995). Les PGPR regroupent des bactéries aux effets bénéfiques sur les plantes pouvant être spécifiques mais pas seulement. Les effets des PGPR sur les plantes ont été revus de nombreuses fois et englobent une large gamme d'effets bénéfiques directs ou indirects des bactéries de la rhizosphère sur les plantes (Vessey, 2003; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Dutta & Podile, 2010; Vacheron *et al.*, 2013). Les PGPR englobent à la fois des bactéries symbiotiques mutualistes ou des bactéries libres (Vacheron *et al.*, 2013). Il est donc difficile de décrire tous les mécanismes d'action des PGPR, toutefois on peut distinguer des mécanismes de :



Figure 7 : Photographie de racines de radis de plants âgés de 17 jours issus de graines germées dans du méthylcellulose à 1% inoculées avec a) une souche productrice d'auxine *Pseudomonas corrugata* SPB2184 ou b) sans souche d'après Lugtenberg & Kamilova (2009).

- bio-fertilisation (N, C, P ...) comme la solubilisation des phosphates ou la fixation d'azote atmosphérique,
- phyto-stimulation par la production de phytohormone comme des auxines (Fig. 7), des cytokinines, de l'éthylène, des gibbérellines et de l'acide abscisique (ABA),
- rhizo-remédiation par la dégradation des polluants,
- bio-contrôle des pathogènes par la production de certains composés toxiques comme le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), l'acide cyanidrique (CN)...

Par exemple, le genre bactérien *Burkholderia* est un groupe de bactérie non dominante du sol mais retrouvé en abondance dans le sol rhizosphérique de certaines plantes (*i.e* riz, maïs, coton, petit pois) (Van *et al.*, 2000; Vial *et al.*, 2011). Il serait jusqu'à 100 fois plus abondant dans le sol rhizosphérique du maïs que dans le sol nu (Fig. 8). Les processus de promotion de *Burkholderia* au sein de la rhizosphère de certaines plantes restent méconnus (Vial *et al.*, 2011). Les bactéries du genre des *Burkholderia* sont parmi les bactéries les plus diversifiées dans leur utilisation des sources de carbone (Mahenthiralingam *et al.*, 2005). Ainsi, cette capacité à utiliser une large gamme de source de carbone pourrait promouvoir leur développement au sein de certaines rhizosphères (Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Vial *et al.*, 2011). Néanmoins, des déterminants génétiques dans leur sélection ne sont pas à exclure et il se pourrait que les *Burkholderia* aient fortement coévolué avec certaines plantes (O'Sullivan *et al.*, 2007).

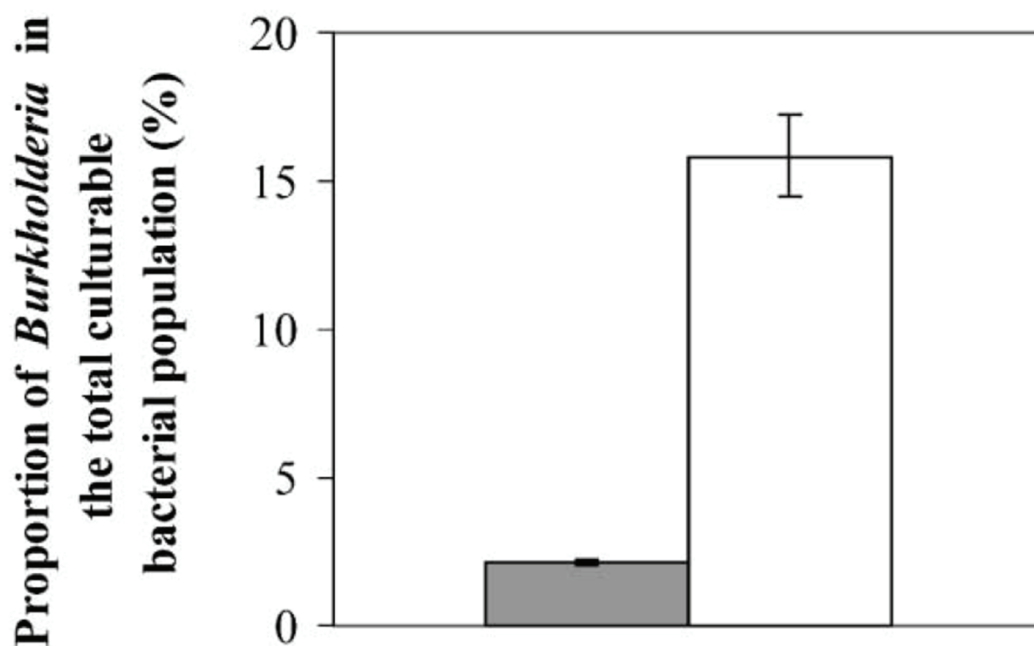


Figure 8 : Proportion de *Burkholderia* dans le total de bactéries cultivables dans les sols nus (gris) ou le sol rhizosphérique du maïs (blanc). Les barres d'erreur indiquent des erreurs-standards. D'après Mahenthiralingam *et al.* (2005).

Les *Burkholderia* en retour d'être promues au sein de la rhizosphère seraient capables de stimuler la croissance de certaines plantes par la production de phytohormones comme l'auxine, l'acide indole-3- acétique, ou encore par la solubilisation des phosphates ou l'exclusion de pathogène par la production de substances antimicrobiennes (Bevivino *et al.*, 1994; Bevivino *et al.*, 2000; Vial *et al.*, 2007). Ainsi, Van *et al.* (2000) ont pu démontrer que

l'inoculation de la souche *B. vietnamiensis* TVV75 pouvait promouvoir de 13 à 22% la croissance du riz. Contrairement à d'autres symbioses les mécanismes de reconnaissance entre la plante et les PGPR ne sont pas encore élucidés mais l'implication de médiateurs chimiques n'est pas à exclure.

4. Rôle des médiateurs chimiques dans les symbioses entre plantes et microorganismes

Les études les plus approfondies sur les symbioses associatives ou mutualistes et les relations plantes pathogènes précédemment abordées montrent que l'établissement de telles spécificités d'hôtes résultent de fortes coévolutions génétiques entre les plantes hôtes et les microorganismes (Brundrett, 2002; Chisholm *et al.*, 2006). Lors de l'identification des mécanismes impliqués dans ces interactions, il a été démontré que ces relations intimes faisaient intervenir des médiateurs chimiques, transporteurs d'informations spécifiques ou assurant un rôle de défense. Sans ces médiateurs la reconnaissance des partenaires plantes/microorganismes ne pourraient exister. Ils sont à la fois les acteurs et les témoins de ces relations intimes entre plantes et microorganismes.

La coévolution des pathogènes avec leur hôte est le résultat de stratégies d'invasions hautement adaptées à des mécanismes de défense des plantes (Wirthmueller *et al.*, 2013). Les mécanismes de défense étant complexes nous ne nous attarderons pas sur des mécanismes précis. Simplement, pour pouvoir infester une plante, un pathogène devra détourner le système immunitaire des plantes par l'intermédiaire de molécules inhibant la réponse immunitaire (Wirthmueller *et al.*, 2013). A l'inverse, des mécanismes de parades faisant généralement intervenir des composés chimiques pourront être sélectionnés chez les plantes contre l'invasion des pathogènes (Anderson *et al.*, 2010). Ces sélections multiples de résistances ou de parade chez l'un et l'autre des partenaires porte le nom de course à l'armement (Anderson *et al.*, 2010).

Dans le cas des symbioses mutualistes la coévolution entre les partenaires est connue pour être forte. Dans ce cadre, il est fréquent que les plantes libèrent des molécules comme des flavonoïdes dans le but d'attirer le futur symbiote, en agissant souvent de manière spécifique (Hassan & Mathesius, 2012). Ce mécanisme porte le nom de chimiotactisme. Ainsi, le coumerol (isoflavonoïde), a été identifié comme médiateur particulier dans la symbiose mycorrhizienne entre des champignons ectomycorrhiziens (*Glomus mosseae* et *Glomus fasciculatus*) et le soja (*Glycine max*) (Morandi *et al.*, 1984).

Dans le cas des symbioses mutualistes associant les *Fabaceae* aux *Rhizobia*, les plantes vont libérer des molécules notamment de la famille des flavonoïdes aux propriétés chimiotactiques et inducteurs de gènes *nod* (Jain & Nainawatee, 2002; Shaw *et al.*, 2006). Les facteurs *nod* produits par les *Rhizobia* vont ensuite entraîner la déformation des poils d'absorbants initiant la formation des nodules. Ainsi, 30 flavonoïdes différents qui pouvaient induire des gènes *nod* ont été isolés chez 9 genres végétaux différents (Cooper, 2004). Ils pouvaient selon les associations agir comme inducteurs chez certains *Rhizobia* ou au contraire comme anti-inducteurs de gènes *nod* (Cooper, 2004). Ces propriétés des flavonoïdes comme médiateurs de la symbiose mutualiste *Fabaceae* et *Rhizobia* illustrent le dialogue moléculaire entre ces deux partenaires qui résulte de la coévolution de ces organismes. De nombreux phénomènes similaires ont été décrits dans le cadre d'autres symbioses comme les symbioses actinorhiziennes ou les symbioses mycorrhiziennes.

Comme le montrent ces exemples, la spécificité des interactions plantes-microorganismes a beaucoup été regardée à l'échelle des organismes eux-mêmes, (*i.e.* une plante *versus* une espèce de microorganismes) or depuis peu de temps, de plus en plus de travaux tendent à aborder les interactions qui pourraient exister entre les plantes et les communautés microbiennes des sols.

III. De la spécificité dans les interactions entre plantes et communautés/groupes fonctionnels microbiens ?

Les plantes pourraient sélectionner de manière spécifique les communautés microbiennes associées à leur racines par l'intermédiaire d'une multitude de composés (Hartmann *et al.*, 2009; Bulgarelli *et al.*, 2013). En effet, la composition de la communauté microbienne associée aux racines semble être influencée par l'espèce de plante mais également par le génotype (Germida & Siciliano, 2001; DeAngelis *et al.*, 2009; Gottel *et al.*, 2011). Elle ne résulterait donc pas d'effets stochastiques de sélection des communautés. Ainsi, Gottel *et al.* (2011) ont pu montrer en comparant par pyrosequençage de gènes taxonomiques, la structure des communautés fongiques et bactériennes endosphériques et rhizosphériques chez des individus de *Populus deltoides* provenant de deux sites très distincts, que certaines plantes pouvaient sélectionner leurs communautés libres de microorganismes associées aux racines depuis le réservoir que constitue la communauté du sol nu, mais qu'en plus ces communautés tendaient à être similaires indépendamment de la composition initiale du sol (Fig. 9a et 9b). Si ces résultats illustrent un fort pouvoir de sélection des plantes de leurs communautés

microbiennes rhizosphériques, les mécanismes restent encore méconnus. De plus, les raisons fonctionnelles ayant conduit à la sélection de ces communautés restent encore inexplicées. Néanmoins, nous pouvons supposer que cette sélection particulière de communautés revêt un intérêt pour les plantes probablement en lien avec leur nutrition ou la prévention de l'installation de pathogènes.

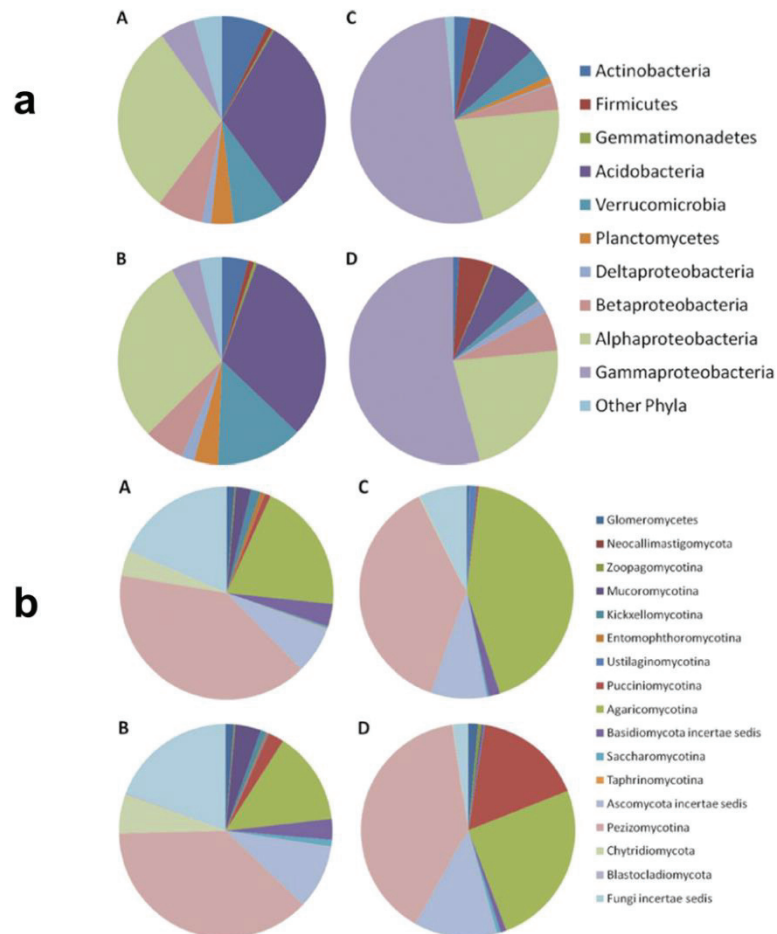


Figure 9 : a) Composition des communautés bactériennes et b) fongiques de la rhizosphère (A et B) et de l'endorhizosphère (C et D) de *Populus deltoides* issus de deux sols différents, upland (A et C) et bottomland (B et D). D'après Gottel *et al.* (2011).

A l'inverse de substances stimulatrices (*i.e.* sucres, acides aminés ...), les plantes produisent des substances antimicrobiennes à fort pouvoir sélectif (Hartmann *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013) comme des polyphénols ou des protéines (Baetz & Martinoia, 2014). Les études attribuent souvent à ces métabolites secondaires des pouvoirs toxiques généraux et un rôle de défense des plantes contre les pathogènes (Hawes *et al.*, 2000; Baetz & Martinoia, 2014). Cependant, certains de ces composés pourraient avoir des effets spécifiques dans leurs activités biologiques ou leur toxicité en ciblant certaines activités ou catégories de microorganismes (Baetz & Martinoia, 2014). Néanmoins, les effets d'inhibition d'activité ou

des effets néfastes sur certains groupes, communautés, espèces microbiennes sont difficiles à mettre en évidence. En effet, l'effet rhizosphère, qui promeut le développement microbien dans la rhizosphère des microorganismes de manière non-spécifique, peut rendre difficile la mise en évidence de contre sélection de microorganismes ou l'inhibition d'activité particulière par la rhizosphère. En effet, certaines molécules pourraient promouvoir l'ensemble des microorganismes, comme les sucres, et d'autre pourraient avoir des effets inhibiteurs spécifiques. Ce qui est alors observé au niveau de la rhizosphère est la résultante de ces deux mécanismes. Le sol nu ne constitue donc pas une référence parfaite pour déterminer les effets de sélection et de contre-sélection de la rhizosphère.

Il existe toutefois des travaux qui tendent à montrer les effets des plantes sur des groupes fonctionnels microbiens. Les principaux éléments disponibles dans la littérature sur ces interactions concernent principalement des acteurs du cycle de l'azote (Encadré 2). Le contrôle biologique des processus du cycle de l'azote n'a longtemps été supposé qu'au travers d'études montrant un effet des plantes sur le fonctionnement des communautés microbiennes impliquées dans le cycle de l'azote des sols (Ishikawa *et al.*, 2003; Lata *et al.*, 2004; Rauber *et al.*, 2008). La minéralisation et la nitrification considérés comme les deux principales étapes limitantes du cycle de l'azote (Bothe *et al.*, 2006), ont fait l'objet d'une attention particulière dans ce contexte.

1. Certaines plantes prennent le contrôle de la minéralisation

La minéralisation correspond à la libération de NH_4 et NO_3 par la dégradation de la matière organique azotée sous l'action des microorganismes du sol (Bothe *et al.*, 2006). Les apports en azote dans les sols pour les plantes dépendent fortement de la minéralisation de l'azote organique en azote inorganique (*i.e.* NO_3^- et NH_4^+) (Van der Krift & Berendse, 2001) (Encadré 2). Sans cette minéralisation les formes minérales de l'azote ne pourraient être accessibles aux plantes. Les plantes peuvent influencer la minéralisation de l'azote (Chapman *et al.*, 2006) Knops *et al.* (2002) ont proposé deux processus distincts pouvant entraîner à la fois une augmentation ou une réduction de ce processus. Premièrement, les plantes influencent la minéralisation de l'azote des sols par la qualité de leur litière ou des détritiques produits (Fig.10a). En effet, une part des détritiques produits serait incorporée en grande quantité dans la matière organique inactive du sol dite récalcitrante et une plus petite quantité dans la matière organique active plus sujette à la dégradation par les microorganismes. La qualité de la matière organique apportée dans le sol joue ainsi grandement sur la vitesse de dégradation de la matière organique active. Ensuite, il est possible de voir l'azote organique en un seul

pool dont la décomposition est dépendante des apports en substrat carboné par les plantes (Fig.10b). Ainsi, la minéralisation nette serait davantage dépendante de l'immobilisation de l'azote par les microorganismes, elle-même pilotée par les apports en substrats carbonés par les plantes. Bien sur Knops *et al.* (2002) stipulent clairement que ces deux théories ne sont pas opposables et que ces deux modes de fonctionnement opèrent sur un continuum dépendant des espèces et du sol considéré.

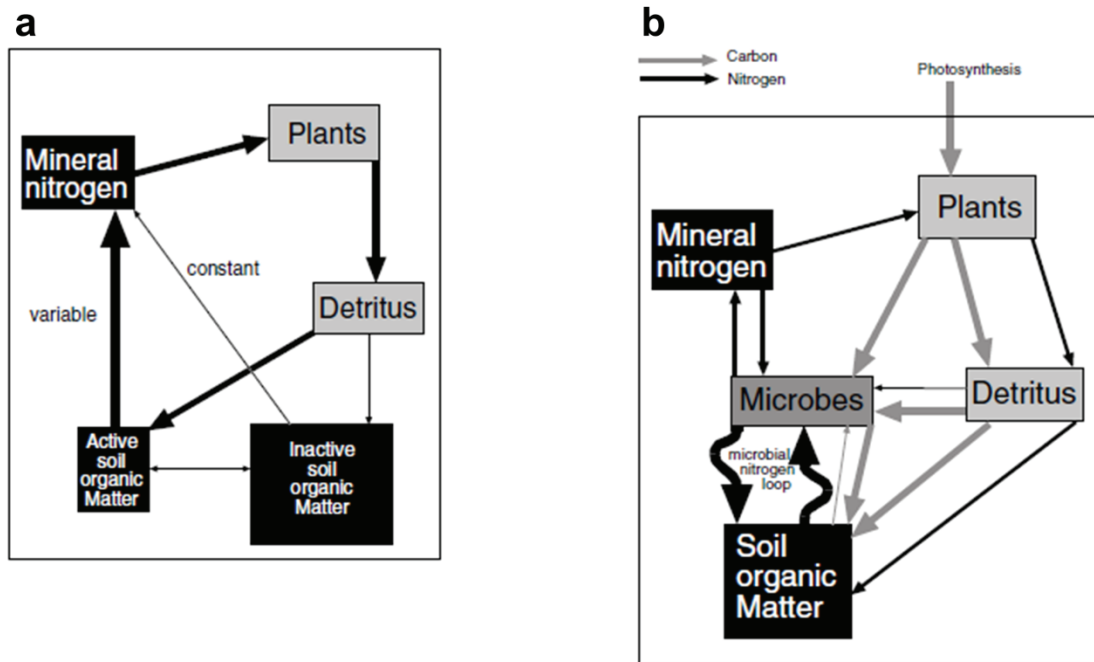


Figure 10 : Schémas conceptuels de l'influence des plantes sur la minéralisation par la qualité de la litière (Knops *et al.*, 2002).

Mis à part ces processus de contrôle par la qualité de la litière il semble que les plantes puissent piloter plus activement la minéralisation. En effet, de nombreuses molécules isolées à partir d'extraits de plantes ont montré des effets inhibiteurs directs sur la minéralisation de l'azote des sols. Ces composés du groupe des terpenoïdes, des stéroïdes ou des flavonoïdes (Mishra & Flaig, 1979; Heumann *et al.*, 2011a; Dietz *et al.*, 2013; Heumann *et al.*, 2013) agissent comme antimicrobiens sans effets spécifiques (Heumann *et al.*, 2013).

Il a été également suggéré que dans le cas des flavonoïdes l'accès à la matière organique soit réduit. Il est connu que les tannins (polymères de flavonoïdes) sont capables de piéger la matière organique par complexation des protéines, limitant ainsi son accessibilité aux microorganismes (Bradley *et al.*, 2000). Il semble d'ailleurs que cette stratégie soit profitable aux plantes en association avec des champignons mycorhiziens éricoïdes (Kraus *et al.*, 2003). En effet, les mycorhizes éricoïdes produisent des enzymes extracellulaires comme des

polyphénols oxydases et des tannins carboxyles estérases capables de dégrader les complexes protéines-tannins (Bending & Read, 1996; Kraus *et al.*, 2003). En outre, l'inhibition de la minéralisation de l'azote par des composés antimicrobiens généraux a pour effet d'augmenter le pool d'azote organique des sols non accessible pour les plantes mais seulement pour des microorganismes. De manière générale l'inhibition de la minéralisation de l'azote entraîne un feedback négatif chez les plantes dépourvues d'associations symbiotiques mycorhiziennes et un feedback positif chez celles mettant en place cette stratégie d'assimilation de la ressource azotée par symbiose (Joanisse *et al.*, 2009). La minéralisation n'est pas le seul processus microbien qui peut être modulé par les plantes.

2. Certaines plantes prennent le contrôle de la nitrification

La nitrification est considérée comme le deuxième processus, avec la minéralisation qui va conditionner les formes et la disponibilité en azote pour les plantes (Bothe *et al.*, 2006). La nitrification est un processus en deux étapes par lequel le NH_4 est consécutivement oxydé en NO_2 puis NO_3 par des groupes d'organismes différents (Encadré 2). La première étape (*i.e.* nitrification) d'oxydation du NH_4 en NO_2 est réalisée par des bactéries et archées autotrophes les AOB (*i.e.* Ammonia oxidizing bacteria) et les AOA (*i.e.* Ammonia oxidizing archaea). La seconde étape correspond à l'oxydation du NO_2 en NO_3 . Elle est assurée par des bactéries principalement autotrophes les NOB (*i.e.* Nitrite oxidizing bacteria). La nitrification est considérée comme un processus important induisant indirectement des pertes d'azote pour les sols. En effet, la formation de NO_3 peut entraîner des pertes importantes d'azote des sols par dénitrification et lessivage et ainsi entraîner des baisses de productivité végétale (Ryden *et al.*, 1984; Philip Robertson, 1997). La nitrification dépend fortement des facteurs abiotiques comme la teneur en oxygène, le pH et la disponibilité en NH_4 (Bothe *et al.*, 2006). En agissant sur ces paramètres du sol, les plantes vont donc être capables d'agir sur la nitrification. Au même titre que les facteurs abiotiques, il semble que les facteurs biotiques notamment les plantes puissent également jouer un rôle important dans la régulation de la nitrification (Subbarao *et al.*, 2013b) (Fig. 11).

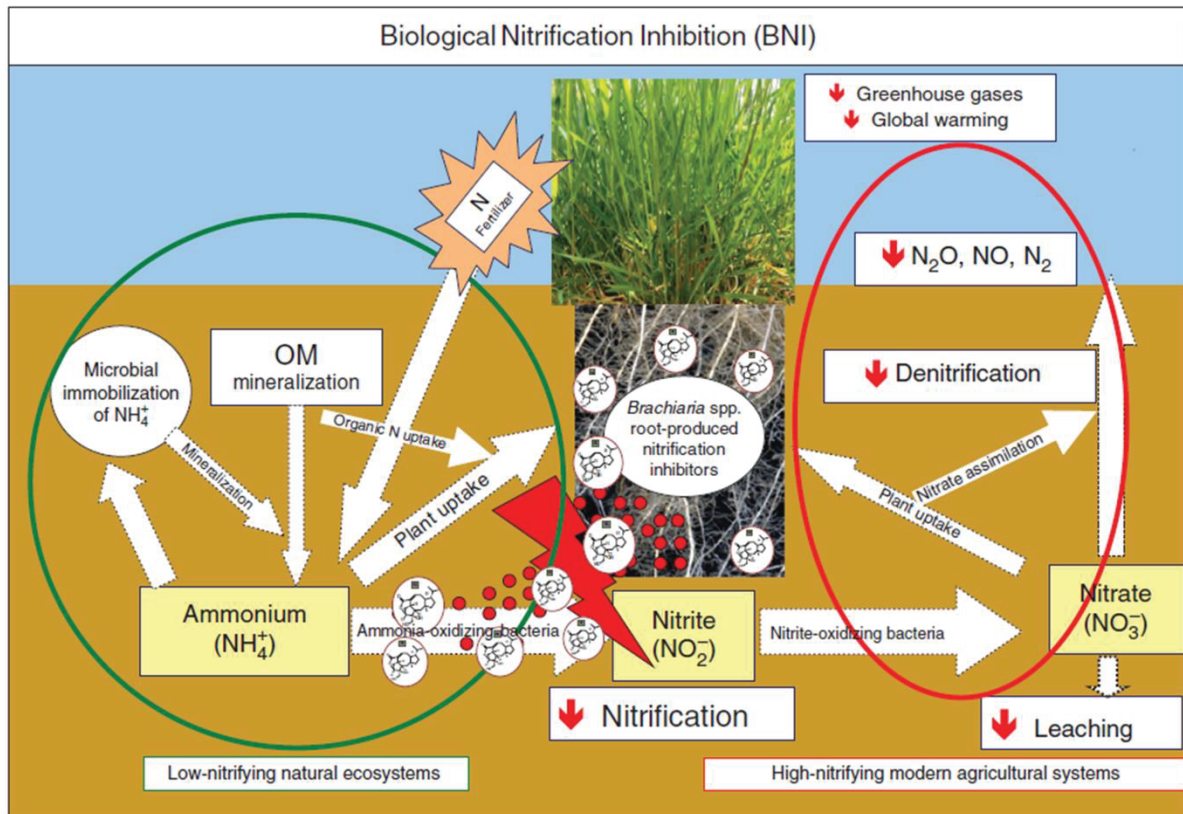


Figure 11 : Représentation schématique de l'inhibition biologique de la nitrification (BNI) en lien avec le cycle de l'azote (Subbarao *et al.*, 2013b). Les composés exsudés par les racines inhibent la conversion du NH₄ en NO₂. Dans les écosystèmes avec une teneur importante en inhibiteur (e.g. brachialactone) comme *Brachiaria humidicola*, le flux d'azote du NH₄ au NO₃ est restreint et ce sont le NH₄ et l'azote organique qui s'accumulent dans le sol et le système racinaire. Dans les systèmes avec peu d'inhibiteurs, comme dans les sols cultivés, la nitrification s'opère à des taux importants convertissant le NH₄ en NO₃ susceptible d'être rapidement perdu par lessivage ou dénitrification.

Ainsi, Subbarao *et al.* (2009) ont montré qu'une graminée, *Brachiaria humidicola*, était capable d'inhiber biologiquement la nitrification par la libération de brachialactone entraînant une limitation des pertes d'azote par dénitrification et lessivage (Fig. 12).

Ce phénomène de BNI (biological nitrification inhibition) ne semble pas se limiter à une seule espèce ou un seul composé. En effet, de nombreuses plantes avec leurs propres composés inhibiteurs ont pu être mis en évidence (*Sorghum bicolor* et sorgoleone ; *B. humidicola* et brachialactone) (Subbarao *et al.*, 2007b; Zakir *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2013b; Tesfamariam *et al.*, 2014).

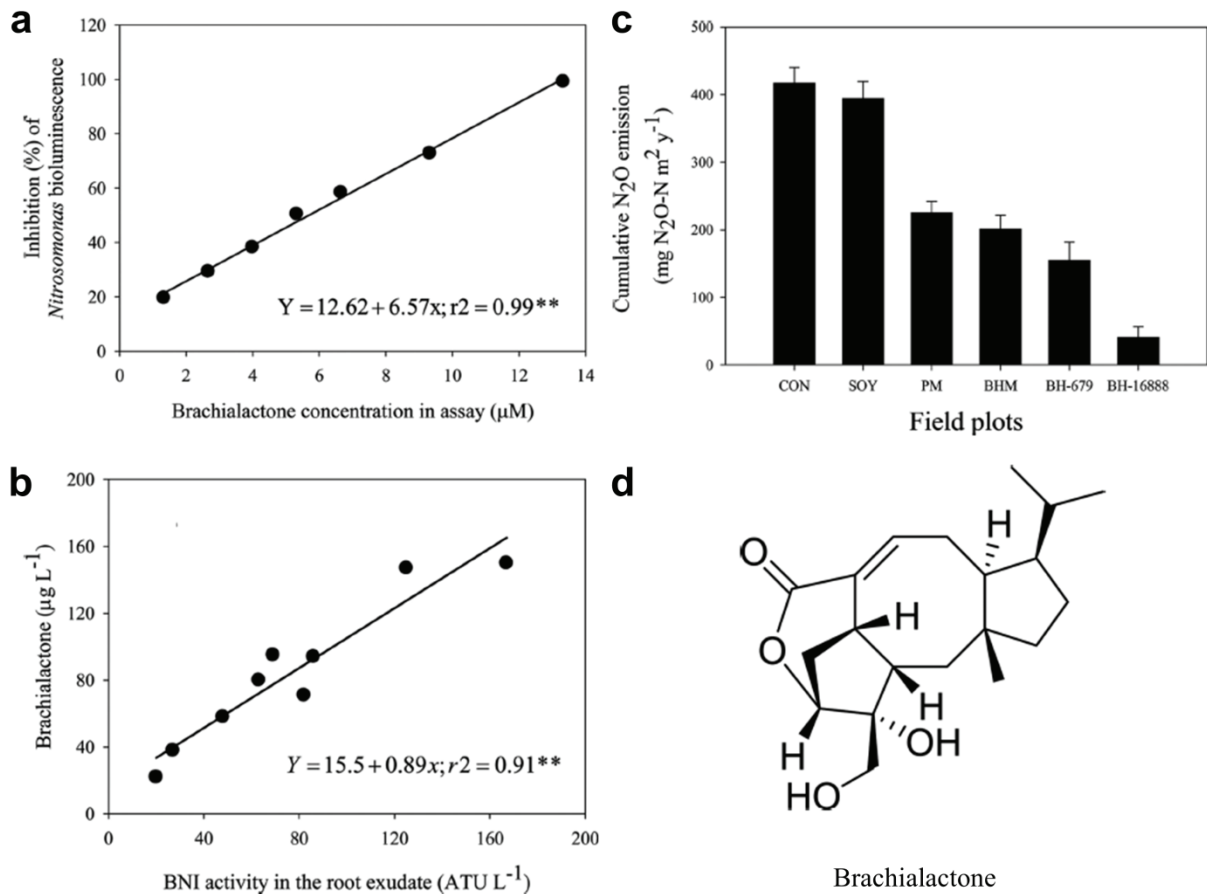


Figure 12 : a) Inhibition de l'expression du gène *luxAB* de *Nitrosomonas europaea* impliqué dans la nitrification en fonction de la concentration en brachialactone. b) Concentration en brachialactone retrouvée dans les exsudats de différents génotypes de *B. humudicola* en fonction de l'inhibition de l'expression du gène *luxAB* de *Nitrosomonas europaea*. c) Emissions de N_2O cumulées au champ dans un sol contrôle (CON), sous soja (SOY), sous *Panicum maximum* (PM) ainsi que trois cultivars de *B. humudicola* (BHM, BH-679 et BH-16888). d) Structure chimique de la brachialactone. D'après Subbarao *et al.* (2009).

3. Certaines plantes sont-elles capables de prendre le contrôle de la dénitrification ?

a. La dénitrification

La dénitrification désigne la réduction du nitrate (NO_3) en nitrite (NO_2) puis en oxyde nitreux et en di-nitrogène (N_2). Ce processus intervient en anaérobiose ou à faible concentration en oxygène. Les dénitrifiants utilisent les formes d'azote oxydées comme accepteurs terminaux d'électrons dans leur chaîne respiratoire en remplacement du dioxygène (O_2) (McDevitt *et al.*, 2000). Ainsi, la dénitrification peut être considérée comme une forme de respiration alternative (Encadré 5).

Encadré 5: Les chaînes respiratoires et les bactéries

Les chaînes respiratoires se retrouvent chez tous les êtres vivants. Elles conditionnent le fonctionnement des organismes en assurant l'apport énergétique nécessaire à la réalisation de l'ensemble des réactions du métabolisme des cellules vivantes. Ces chaînes respiratoires se retrouvent notamment chez les bactéries chez lesquelles elles présentent une certaine similarité (Poole & Cook, 2000).

Les chaînes respiratoires sont composées d'un ensemble d'enzymes transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique. Ces enzymes vont permettre de ré-oxyder les coenzymes, nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et ubiquinone (Coenzyme-Q), réduits lors du cycle de Krebs. Le transport d'électrons le long de la membrane plasmique jusqu'à un accepteur terminal est le moteur de ces oxydations. Chez les bactéries il existe une grande diversité d'oxydases couplées à une grande diversité de cytochromes. De manière simplifiée les cytochromes assurent le transport des électrons et vont fournir l'énergie aux oxydases pour l'oxydation des coenzymes. Ces réactions entraînent une sortie de proton H^+ vers l'espace périplasmique et donc l'établissement d'un gradient transmembranaire. Le rééquilibrage de ce gradient est assuré par des ATP-synthases. L'entrée de protons H^+ dans le cytoplasme à travers les ATP-synthase permet ainsi la phosphorylation de l'Adénosine monophosphate (AMP) et l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) la principale molécule porteuse de l'énergie cellulaire (Fig 13).

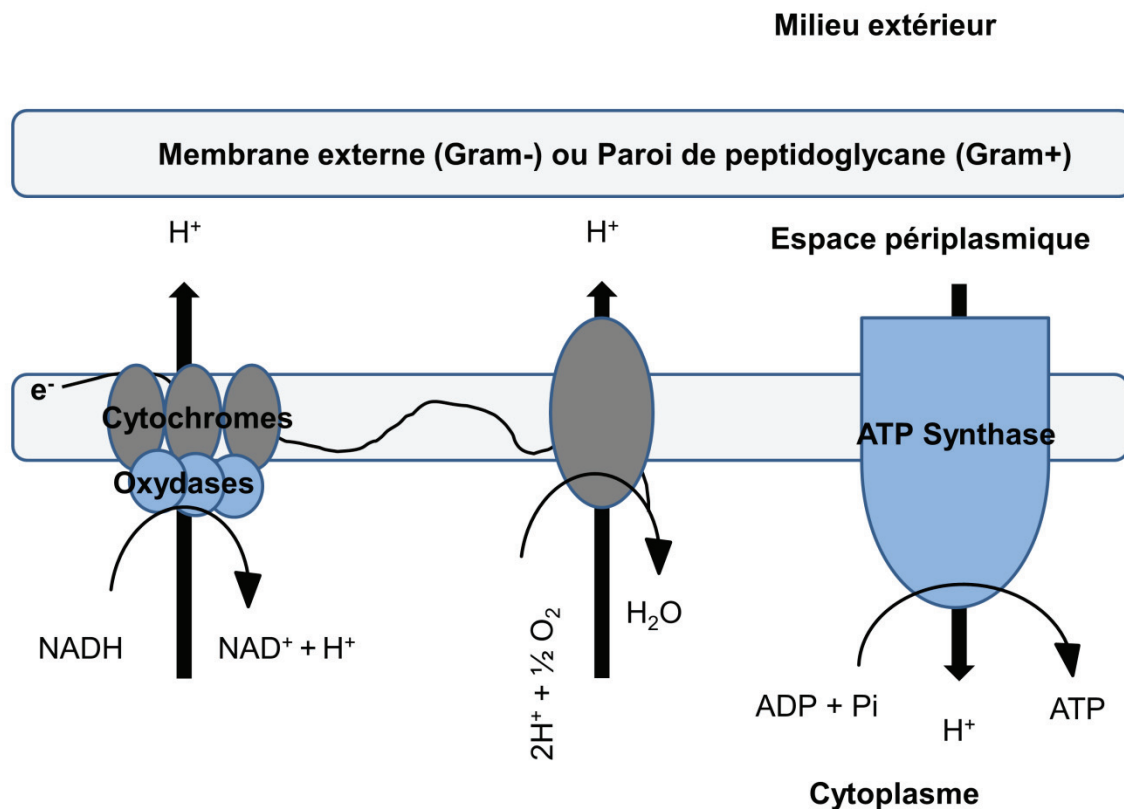


Figure 13 : Schéma simplifié de la chaîne respiratoire aérobie bactérienne.

La première forme de respiration mise en évidence fut la respiration aérobie utilisant le dioxygène comme accepteur terminal d'électron. Les formes de respiration découvertes par la suite se sont définies en opposition avec la respiration aérobie étant toutes répertoriées dans la catégorie de respiration anaérobie. Parmi elles on retrouve la respiration fer, la respiration nitrate (dénitrification), la respiration sulfate (sulfato-réduction), la respiration soufre (sulfo-réduction), la respiration carbonate (acétogénèse et méthanogénèse) et la respiration fumarate. La méthanogénèse, la sulfato-réduction et la dénitrification sont les plus connues et leurs accepteurs terminaux d'électrons sont respectivement le dioxyde de carbone (CO_2), l'ion sulfate (SO_4^{2-}) et l'ion nitrate (NO_3^-). Parmi ces trois respirations anaérobies, la dénitrification prend une part importante dans le cycle de l'azote comme mentionné précédemment.

La dénitrification (*i.e.* chaîne respiratoire anaérobie) se décompose en quatre étapes (Fig. 9), la réduction du NO_3 en nitrite (NO_2), du NO_2 en oxyde nitrique (NO), puis du NO en oxyde nitreux (N_2O) et enfin du N_2O en N_2 (Both *et al.*, 2006).

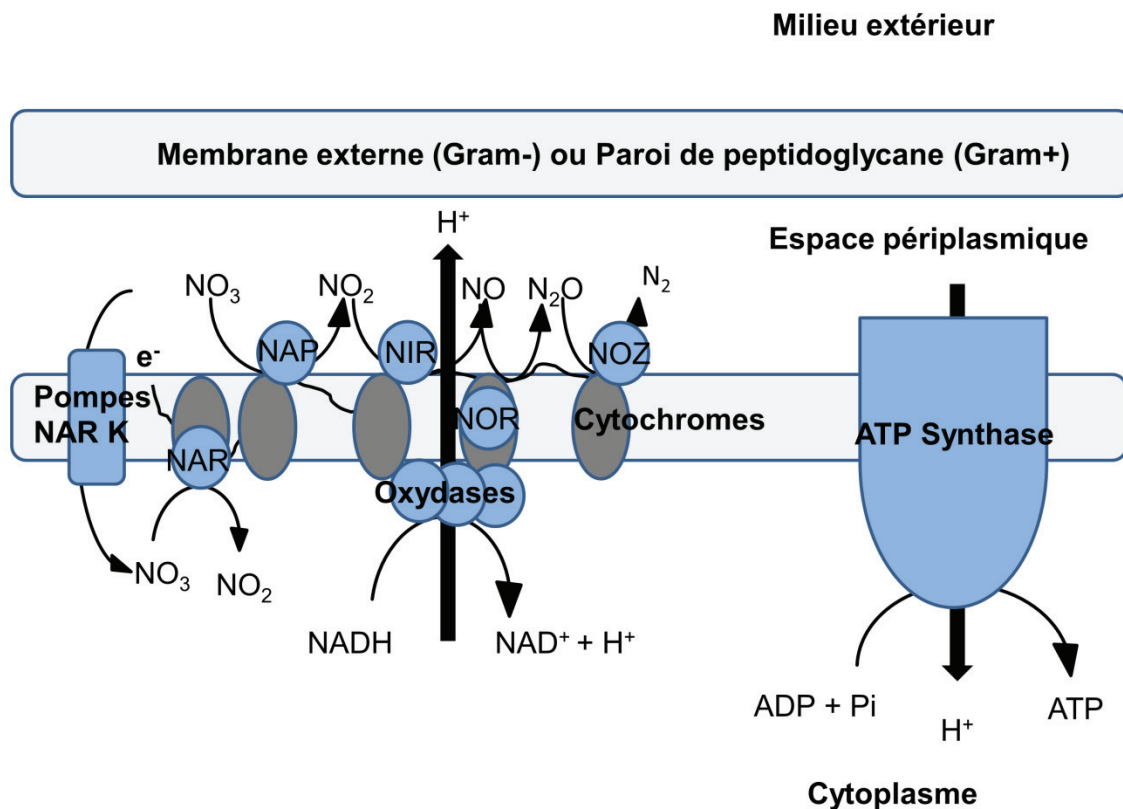


Figure 14 : Schéma des étapes de la dénitrification et localisation des enzymes.

La réduction du nitrate est associée à deux enzymes homologues, la nitrate réductase transmembranaire (Nar) et la périplasmique (Nap), respectivement codées par les gènes *narG* et *napA* (cette dernière n'étant pas présente chez tous les dénitrifiants). Selon les microorganismes, la réduction du nitrite fait intervenir deux nitrites réductases l'une couplée à du cuivre et l'autre au cytochrome *cd1*. Elles sont codées par des gènes différents, respectivement *nirK* et *nirS*. La NO-réductase est une enzyme transmembranaire codée par le gène *norB*. (Wallenstein *et al.*, 2006). Enfin, la N₂O-reductase est une enzyme périplasmique codée par le gène *nosZ* (Khalil, 2003). Cette dernière est inhibée par le dithionite, le monoxyde de carbone et l'acétylène (Paccard, 1995) (Fig. 14).

b. Régulation de la dénitrification

La dénitrification est une fonction inductible qui nécessite donc des conditions favorables pour s'exprimer. Les facteurs de régulation qui interviennent directement sur cette fonction, facteurs qualifiés de proximaux, sont l'oxygène, ainsi que la disponibilité en azote oxydé et en substrat carboné. La disponibilité en substrat organique est, après l'aération, le principal facteur de régulation de la dénitrification dans les sols. En effet, les bactéries dénitrifiantes sont en majorité hétérotrophes, elles tirent leur énergie de l'oxydation des matières organiques

(organotrophes) (Bothe *et al.*, 2006). Une minorité peut aussi être autotrophe et oxyder des composés minéraux (chimioolithotrophes) (Bothe *et al.*, 2006).

c. Les dénitrifiants

Les bactéries dénitrifiantes représentent la majorité des organismes dénitrifiants bien que certains champignons (Shoun *et al.*, 1992) et archées (Philippot, 2002) soient capables de réaliser ce processus. Les dénitrifiants regroupent un grand nombre de taxa phylogénétiquement différents dont beaucoup ne sont pas capables de réaliser la chaîne complète (Wallenstein *et al.*, 2006).

d. L'inhibition de la dénitrification ?

La nitrification et la minéralisation sont considérées comme les étapes limitantes du cycle de l'azote (Bothe *et al.*, 2006). C'est probablement pourquoi, les études de contrôle biologique des processus du cycle de l'azote ont surtout portées sur ces deux processus et les effets des plantes sur les autres ont été sous-estimés. Ainsi, le principe d'inhibition biologique de la dénitrification n'a jamais été soupçonné alors que la dénitrification est la principale voie biologique de perte d'azote du sol (Both *et al.*, 2006). Il est alors connu que la productivité des plantes va fortement dépendre du processus de dénitrification (van der Heijden *et al.*, 2008).

L'émergence de la dénitrification (*i.e.* 2.72 milliards d'année) et bien antérieure à l'émergence des plantes terrestres (*i.e.* 530-560 millions d'années) (Thomazo *et al.*, 2011). Alors que les champignons sont plus jeunes que les dénitrifiants (*i.e.* 150 millions d'années), les plantes ont fortement coévoluées avec eux donnant naissance aux mycorhizes. Ainsi, il est également probable que les plantes aient fortement coévoluées avec les dénitrifiants.

La pression de sélection basée sur la compétition pour le nitrate pourrait être d'autant plus intense dans les milieux pauvres en azote et où la dénitrification est importante (*i.e.* milieux humides) guidant la coévolution entre ces deux entités. Les premières formes de plantes terrestres étaient très dépendantes à la présence d'eau dans les sols (Pirozynski & Malloch, 1975). Or, les sols saturés en eau sont des sites propices à de fortes pertes d'azote (*i.e.* N₂O et N₂) par dénitrification (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). Il est donc probable qu'aux prémices de la vie terrestre pour les plantes, la compétition entre plantes et microorganismes dénitrifiants ait été très intense.

Néanmoins, la dénitrification est un processus impliquant une grande diversité de bactéries à l'échelle de la communauté. Il n'existe pas de processus type, ce qui laisse la communauté scientifique dubitative face à un éventuel contrôle de la dénitrification par les plantes, imputable à un « mécanisme spécifique et universel » à tous les dénitrifiants.

Les interactions entre microorganismes du cycle de l'azote et les plantes semblent fortes. L'instauration d'une spécificité d'interaction comme le BNI entre certaines plantes et certaines communautés du cycle de l'azote démontre que la spécificité d'interaction n'est pas réservée uniquement aux relations symbiotiques ou pathogéniques. Ceci laisse entrevoir la capacité de certaines plantes à « prendre le contrôle du cycle de l'azote » pour influencer sur leur propre développement, en ciblant spécifiquement une communauté compétitrice.

IV. « Ces prises de contrôle » par les plantes, les théories du « plant-soil feedback »

Les effets unilatéraux des plantes sur des microorganismes et des microorganismes sur les plantes ont souvent été étudiés. Néanmoins, la prise en compte des interactions bidirectionnelles et antagonistes est plus rare alors qu'il est bien connu que des effets délétères ou bénéfiques pour les plantes peuvent résulter de leurs effets sur les microorganismes (van der Putten *et al.*, 2013). La prise en compte de ces effets rentre dans le cadre des théories dites de « Plant-Soil feedback » (Ehrenfeld *et al.*, 2005; van der Putten *et al.*, 2013). Ces théories ont connues un essor ces 10 dernières années (Kulmatiski *et al.*, 2008). Il s'agit d'un domaine peu étudié mais en plein développement, reliant l'écologie aux processus évolutifs (van der Putten *et al.*, 2013) (Encadré 6). Le phénomène de « plant-soil feedback » permettrait d'expliquer la capacité de certaines plantes à pousser dans des milieux pauvres (van der Putten *et al.*, 2013) et pourrait expliquer que certaines espèces végétales connues pour modifier des conditions physicochimiques des sols soient invasives (Ehrenfeld, 2003; Reinhart & Callaway, 2006).

Bien que la théorie du « plant-soil feedback » soit bien admise au sein de la communauté scientifique, dans le cadre des inhibitions biologiques du cycle de l'azote, les effets bénéfiques qui pourraient en résulter sont très rarement démontrés et passent souvent par des démonstrations théoriques (Subbarao *et al.*, 2006b). Ainsi, peu d'expériences se sont intéressées à démontrer les effets des inhibitions biologiques du cycle de l'azote sur les plantes.

Encadré 6: Concept du « Plant-soil feedback »

« Plant-soil feedback »:

« Plant-soil feedback » direct: effets interspécifiques ou conspécifiques des modifications des conditions biotiques ou abiotiques des sols par les plantes par l'intermédiaire des racines ou de la litière. Effets de ces modifications sur elles-mêmes ou leur descendance.

« Plant-soil feedback » indirect : effets interspécifiques ou hétérospécifiques des modifications des conditions biotiques ou abiotiques des sols par les plantes par l'intermédiaire des racines ou de la litière. Effets de ces modifications sur d'autres plantes (Fig. 15).

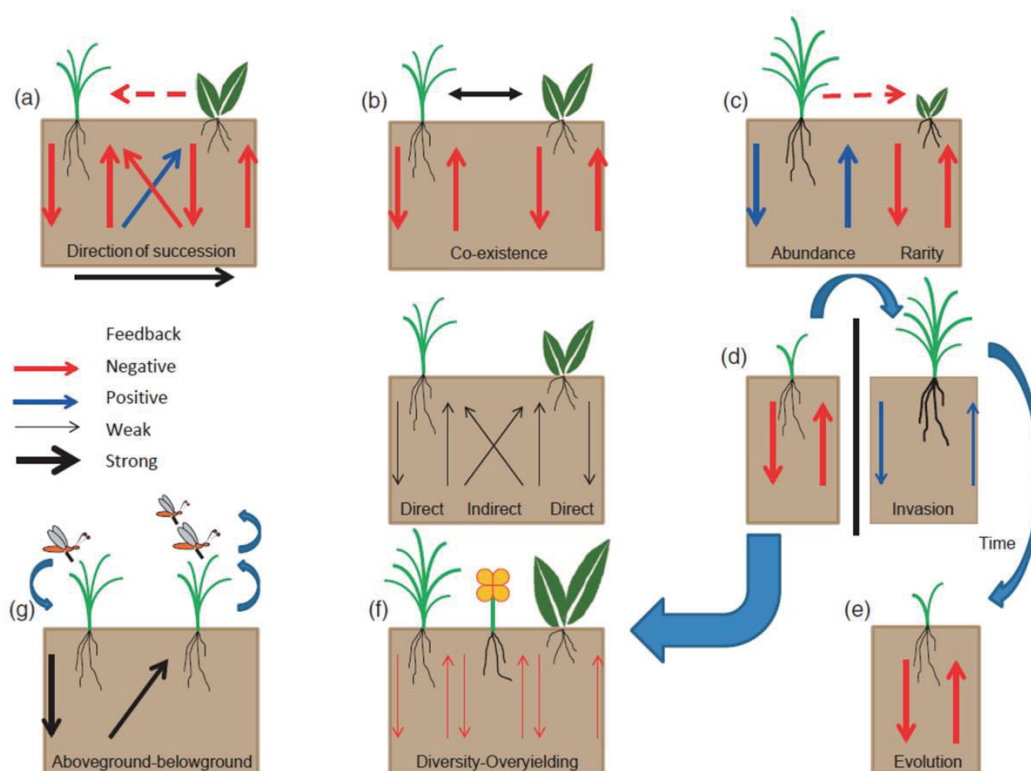


Figure 15 : Le « plant-soil feedback » conceptualisé à l'échelle de la communauté des plantes (van der Putten *et al.*, 2013).

(a) Comment le changement indirect de feedback peut contribuer au remplacement d'une espèce par une autre selon le principe des successions écologiques.

(espèce primaire ➡ secondaire).

(b) Comment un feedback négatif peut opérer lorsque des plantes coexistent.

(c) Comment un feedback positif ou négatif peut respectivement entraîner une augmentation d'abondance ou une raréfaction d'espèces.

(d) Comment une espèce contrainte à un feedback négatif dans son milieu d'origine peut devenir invasive lorsqu'elle est introduite dans un nouveau milieu où elle présentera un feedback neutre ou positif.

(e) Comment un feedback peut devenir négatif au cours du temps chez une espèce introduite.

(f) Comment des plantes en monoculture peuvent avoir un feedback négatif alors qu'il pourrait être neutre en mélange du fait que les pathogènes spécialisés du sol se trouvent dilués. Ainsi, les plantes produisent plus de biomasse en mélange qu'en monoculture.

(g) Illustre comment les interactions aériennes avec d'autres organismes peuvent modifier les interactions souterraines, comme dans le cas de l'herbivorie.

Dans le cas du BNI il est admis que l'inhibition de la nitrification entraîne une diminution des pertes d'azote des sols par lessivage du NO_3 ou dénitrification (Subbarao *et al.*, 2008; Zakir *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009; Tesfamariam *et al.*, 2014). Néanmoins, peu d'expériences ont pu à notre connaissance mettre en évidence un retour bénéfique pour les plantes. Boudsocq *et al.* (2009) ont cependant pu démontrer par modélisation que *Hyparrhenia diplandra*, une *Poaceae* de savane connue pour inhiber la nitrification des sols (Lata *et al.*, 2004), en inhibant la nitrification pouvait augmenter la production primaire d'un écosystème en augmentant la fertilité azotée des sols par une limitation des pertes du système.

La limitation des pertes en azote des sols est donc certainement un moyen pour les plantes d'influer positivement sur leur développement.

Conclusion

En conclusion, bien que les plantes et les microorganismes du sol puissent influencer l'un sur l'autre de manière non-spécifique, des relations spécifiques faisant intervenir des médiateurs chimiques se sont installées entre certaines plantes et microorganismes symbiotiques ou pathogènes. Cependant, les interactions spécifiques entre plantes et microorganismes ne semblent pas se limiter aux microorganismes symbiotiques ou pathogènes ainsi qu'à quelques espèces. Certaines plantes semblent capables d'interactions spécifiques avec certains compétiteurs du cycle de l'azote présentant une grande diversité taxonomique. Les plantes sont ainsi capables d'influencer certaines communautés microbiennes du cycle de l'azote par l'intermédiaire de métabolites secondaires. Cette prise de contrôle pourrait faire partie d'une stratégie hautement perfectionnée sélectionnée chez certaines plantes dans le but de promouvoir leur croissance. Néanmoins, bien que certaines études se soient intéressées aux mécanismes d'inhibition de la nitrification et la minéralisation de l'azote par les plantes, aucune étude ne s'est à ce jour intéressée au processus de dénitrification qui représente une voie de perte importante de l'azote des sols. Et pour cause aucun indice sur son existence n'a à ce jour été relevé. De plus, la communauté scientifique semble rester sceptique face à l'éventuelle existence d'inhibiteurs spécifiques de la dénitrification produits par les plantes car, en comparaison des nitrifiants, il s'agit d'une communauté encore plus diversifiée.

**Chapitre 2 Travaux expérimentaux : L'inhibition
biologique de la dénitrification (BDI) par *Fallopia* spp..**

Introduction

I. Les Renouées asiatiques prennent-elles le contrôle de la dénitrification ?

Dans une étude récente, Dassonville *et al.* (2011) ont montré que la dénitrification potentielle était réduite sur les sites envahis par les Renouées asiatiques sans que cette réduction ne puisse être expliquée par les facteurs abiotiques des sols, généralement connus pour contrôler la dénitrification (*cf.* : section régulation de la dénitrification) (Fig. 16). Ces résultats nous ont donc conduit à émettre l'hypothèse d'une inhibition biologique de la dénitrification par les Renouées asiatiques.

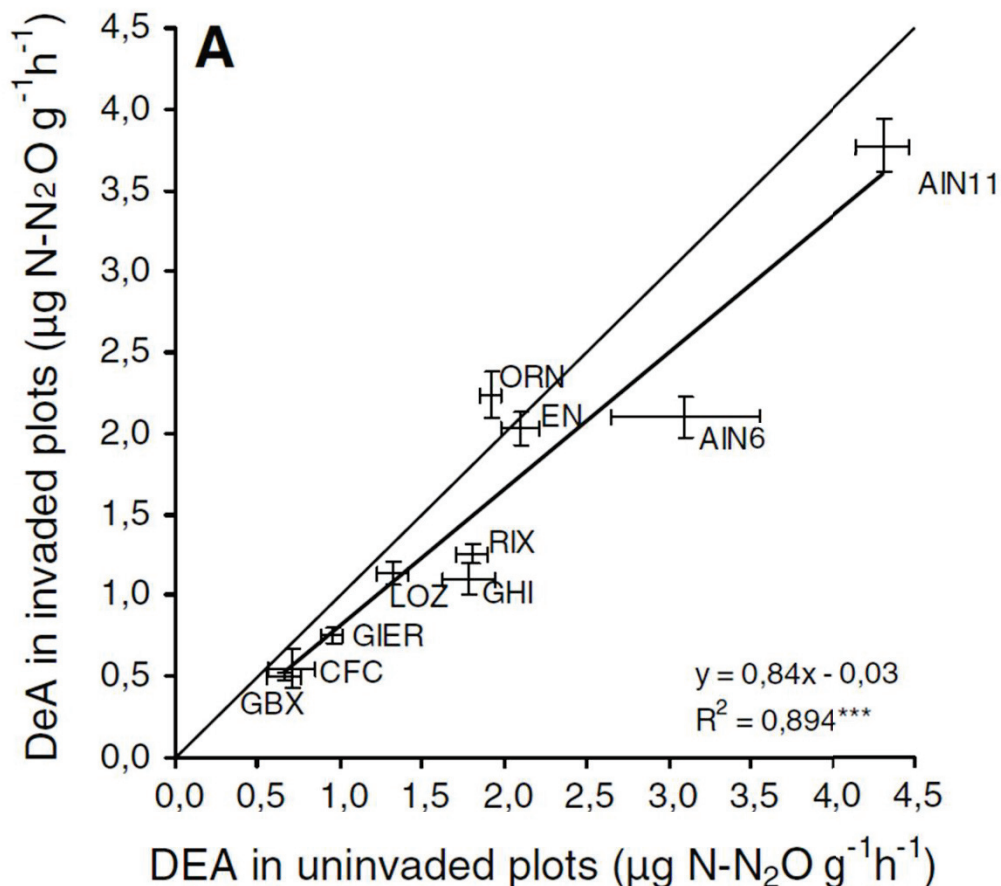


Figure 16 : Denitrification enzyme activity (DEA) (*i.e.* dénitrification potentielle) de sols envahis en fonction du sol correspondant non envahis sur 10 sites du Rhône et de Belgique. Les points au-dessus de la ligne centrale montrent une augmentation de la DEA et les points au-dessous une réduction dans les sols colonisés par les Renouées asiatiques (Dassonville *et al.*, 2011).

II. Les renouées asiatiques

Les Renouées Asiatiques (*Fallopia sp.*) forment un complexe d'espèces invasives. Ce complexe regroupe *Fallopia japonica* (Houtt.), *Fallopia sachalinensis* (F.Schmidt, Nakai) et leurs hybrides interspécifiques *F. x bohemica*. Originaires d'Asie, respectivement du Japon et de l'île de Sakhaline elles sont considérées avec leurs hybrides *F. x bohemica* comme de véritables fléaux des zones tempérées, en Amérique du Nord (Urgenson *et al.*, 2009; Gammon & Kesseli, 2010) et en Europe (Marigo & Pautou, 1998) comme en France (Fig. 17). Introduites au début du 19^{ème} siècle comme plantes ornementales, fourragères et mellifères (Marigo & Pautou, 1998) elles ont rapidement colonisé toute l'Europe. Aujourd'hui, *F. japonica* et *F. sachalinensis* respectivement classées dix-septième et soixante-quatrième espèces les plus invasives d'Europe sur 150 répertoriées (Lambdon *et al.*, 2008).

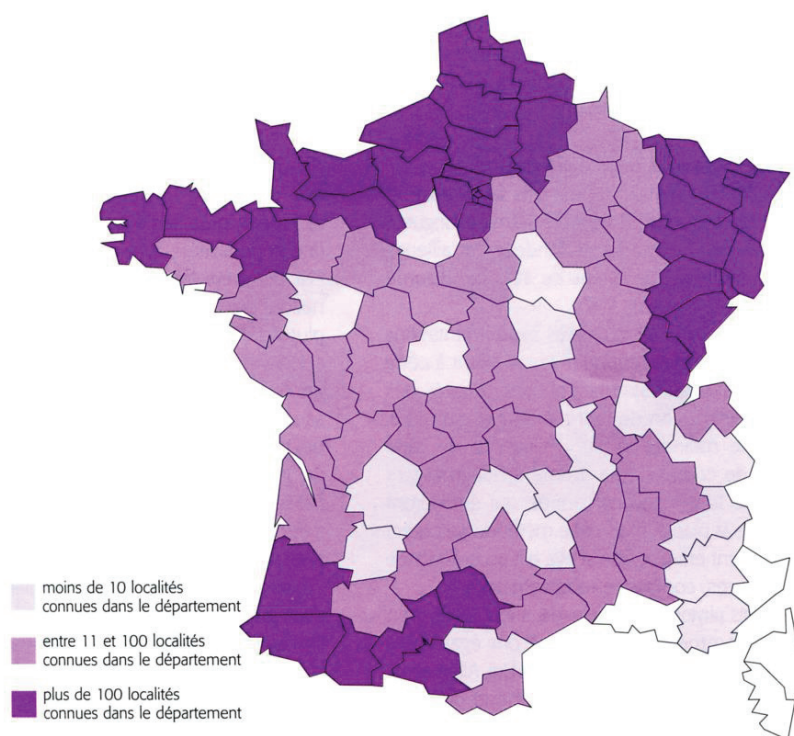


Figure 17 : Carte de distribution des Renouées asiatiques en France (Muller & Aboucaya, 2004)

Les espèces *Fallopia japonica* et *Fallopia sachalinensis*, respectivement octoploïdes (pour le génotype invasif européen) et tétraploïdes sont gynodioïques et se reproduisent par reproduction sexuée et multiplication végétative (Tiebre *et al.*, 2007). Les hybrides *Fallopia x bohemica* sont de niveaux de ploïdie divers (4n, 6n, 8n...) (Tiebre *et al.*, 2007). Ces hybrides semblent être plus invasifs (Pysek *et al.*, 2003), avec une capacité de régénération

plus grande (Bimova *et al.*, 2003) et une capacité de dispersion plus élevée que les espèces parentales (Mandak *et al.*, 2004).

Au Japon, *Fallopia japonica* est considérée comme une espèce pionnière capable de pousser sur des milieux extrêmement pauvres, comme les sols volcaniques du Mont Fuji qu'elle semble même enrichir en azote (Hirose & Tateno, 1984; Adachi *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent une forte tolérance des Renouées à la contrainte nutritive.

La grande taille des Renouées, leur mode de propagation clonal et la densité des patches contribuent à modifier la structure et la chimie des écosystèmes (Aguilera *et al.*, 2010) (Fig. 18). De plus, la forte production de biomasse des parties aériennes permettrait un retour d'une grande quantité d'azote au sol via la litière (Dassonville *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2010).



Figure 18 : Photographie d'un champ envahi par les Renouées asiatiques

III. **Activité biologique des composés contenus dans les renouées**

Les racines sèches de renouées sont utilisées en médecine chinoise traditionnelle depuis des siècles et également recensées dans les pharmacopées coréennes et japonaises (Shan *et al.*, 2008). Les Renouées sont connues pour produire de nombreuses substances bioactives comme des flavonoïdes, des stilbènes, des anthraquinones et divers autres composés phénoliques (Vastano *et al.*, 2000; Vrchatova & Sera, 2008). Des études récentes ont montré que les renouées possédaient des propriétés allélopathiques sur d'autres plantes. Ces études suggèrent que les Renouées inhibent la germination de plantes modèles (Vrchatova & Sera, 2008) et plus précisément la croissance et la germination d'espèces natives de systèmes envahis (Murrell *et al.*, 2011).

Des études en recherche médicale ont également mis en évidence le pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques de *Fallopia japonica* (Shan *et al.*, 2008; Ban *et al.*, 2010). Ceci suggère que les effets allélopathiques des Renouées ne se cantonneraient pas au règne végétal. Ainsi, Shan *et al.* (2008) suggèrent que l'action antibactérienne des extraits serait principalement due à la présence d'anthraquinones (émodyne et physcion) et de stilbènes (picéide et resveratrol), les composés majoritaires des extraits de rhizomes. Ils révèlent que les extraits bruts de *Fallopia japonica* ainsi que l'émodyne et le picéide altèrent l'intégrité des membranes bactériennes. Ces deux derniers composés pourraient pénétrer à travers les membranes cellulaires, agir sur la double couche phospholipidique et inhiber les enzymes membranaires (Shan *et al.*, 2008). D'autres études suggèrent également un effet antifongique en plus des effets sur les bactéries et les plantes, des extraits de rhizomes des Renouées (Wurms *et al.*, 1999; Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2006).

Ceci laisse présager un effet biocide général des métabolites secondaires de *Fallopia japonica*, *Fallopia sachalinensis* et de leurs hybrides. Néanmoins, ceci n'est pas en contradiction avec le fait que certains processus biologiques soient plus ou moins affectés. De plus, ces résultats sont à relativiser car les effets doses des molécules doivent être pris en compte.

IV. **Hypothèses de travail**

Une hypothèse forte émanant des travaux de Dassonville *et al.* (2011) et des travaux sur les propriétés allélopathiques, antifongiques et antibactériennes des Renouées (Wurms *et al.*,

1999; Kim *et al.*, 2004; Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008; Vrchatova & Sera, 2008), est que l'effet observé sur les bactéries dénitrifiantes du sol résulterait en partie de la production par la plante de métabolites secondaires régulant le fonctionnement et la dynamique de ces bactéries.

La dénitrification est la principale voie biologique de perte d'azote du sol (Radersma & Smit, 2011) et bien souvent, l'azote est le premier facteur limitant la croissance des plantes (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008). Ainsi, une diminution de la dénitrification pourrait avoir pour conséquence d'augmenter la disponibilité en nitrate pour la plante en limitant les pertes gazeuses pour le sol. Cette augmentation pourrait en retour profiter à la croissance de la plante et donc augmenter sa valeur sélective par rapport aux espèces natives. Une telle faculté pourrait participer aux caractéristiques de croissance exceptionnelles des Renouées asiatiques (Fig. 18).

V. Déroulement du manuscrit

Mon sujet de thèse s'est inscrit dans le cadre conceptuel des inhibitions biologiques des processus du cycle de l'azote avec l'hypothèse que les Renouées asiatiques (*i.e Fallopi*a spp.) inhibent la dénitrification par l'intermédiaire de métabolites secondaires ciblant spécifiquement les processus de la dénitrification (Fig. 19). Mes trois années de thèse m'ont permis de mettre en évidence pour la 1^{ière} fois l'existence de l'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par des métabolites secondaires produits par les Renouées asiatiques. Ces composés ont pu être identifiés, isolés et leur activité inhibitrice a été caractérisée. Les mécanismes d'action de ces composés au niveau cellulaire ont également été identifiés. Ensuite, dans un quatrième volet j'ai pu mettre en évidence l'existence d'une sensibilité différente des sols à ces inhibiteurs. Enfin, dans un cinquième volet la fin de ma thèse m'a permis d'amorcer des travaux non encore finalisés en vue de déterminer si l'inhibition de la dénitrification pouvait être associée à un retour profitable pour les Renouées asiatiques.

Ces cinq volets vous seront présentés dans ce manuscrit, sous la forme de cinq parties distinctes qui seront ensuite discutées lors d'une discussion générale.

J'ai souhaité que chaque partie suivante puisse se lire comme des articles indépendants. Néanmoins ceci peut apporter une certaine redondance dans les raisonnements.

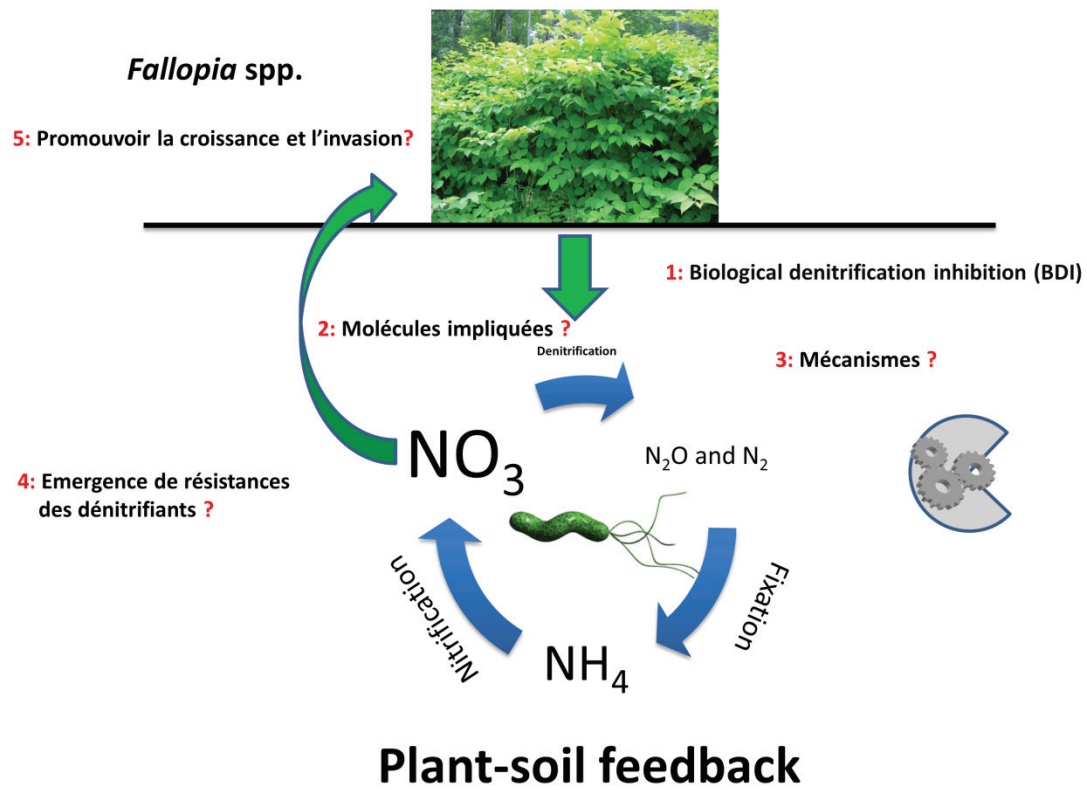


Figure 19: Schéma conceptuel des hypothèses du sujet de thèse.

**Partie 1 Est-ce que l'inhibition biologique de la dénitrification
par les plantes existe ?**

Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites.

(Publié dans New Phytologist novembre 2014, volume 204, issue 3, p 620-630)

Clément Bardon^{1,2}, Florence Piola², Floriant Bellvert ¹, Feth el Zahar Haichar ¹, Gilles Comte¹, Guillaume Meiffren¹, Thomas Pommier ¹, Sara Puijalon², Noelline Tsafack², and Franck Poly^{1*}

Addresses:

¹Université de Lyon, UMR 5557 LEM, Université Lyon 1, CNRS, INRA USC 1364, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

²Université de Lyon, UMR5023 LEHNA, Université Lyon 1, CNRS, ENTPE, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

***Corresponding author:**

Franck Poly

Tel : +33472431379

Email: franck.poly@univ-lyon1.fr

Summary:

- Previous studies on the effect of secondary metabolites on the functioning of rhizosphere microbial communities have often focused on aspects of the nitrogen cycle but have overlooked biological denitrification inhibition (BDI), which can affect plant N-nutrition. Here, we investigated the BDI by the compounds of *Fallopia* spp., an invasive weed shown to be associated with a low potential denitrification of the soil.
- *Fallopia* spp. extracts were characterized by chromatographic analysis and were used to test the BDI effects on the metabolic and respiratory activities of denitrifying bacteria, under aerobic and anaerobic (denitrification) conditions. The BDI of *Fallopia* spp. extracts was tested on a complex soil community by measuring Denitrification Enzyme Activity (DEA), Substrate Induced Respiration (SIR), as well as abundances of denitrifiers and total bacteria.
- In 15 strains of denitrifying bacteria, extracts led to a greater BDI (92%) than respiration inhibition (50%). Anaerobic metabolic activity reduction was correlated with catechin concentrations and the BDI was dose dependent. In soil, extracts reduced the DEA/SIR ratio without affecting the denitrifiers/total bacteria ratio.
- We show that secondary metabolite(s) from *Fallopia* spp. inhibit denitrification. This provides new insight into plant-soil interactions and improves our understanding of a plant's ability to shape microbial soil functioning.

Keywords: biological inhibition, catechin derivatives, denitrification, *Fallopia* spp., nitrogen cycle, rhizosphere, secondary metabolites, weeds.

Introduction

In the middle of the twentieth century, it was considered that abiotic factors prevailed in shaping microbial selection in soils (Smith, 1948). However, over the last 30 years increasing numbers of studies have reported on biotic factors driving microbial selection and functioning (Hobbie, 1992; Chapman *et al.*, 2006). It is now well known that plants can restrict or direct the development or the functioning of soil organisms by excreting selective mixtures of substances in their main zone of influence, *i.e.* the rhizosphere (Hartmann *et al.*, 2009). These substances provide the plant with a large range of belowground properties such as antimicrobial activities, pH and redox modulating activities, and specific stimulatory or inhibitory activities (Hinsinger *et al.*, 2003; Subbarao *et al.*, 2006a). Hence plant effects on microbial soil functioning may be as important or more important than abiotic factors (Hobbie, 1992).

Studies on plant-driven microbial functioning have mostly focused on the nitrogen (N) cycle (Chapman *et al.*, 2006). However, selective substances from plants do not necessarily control all pathways in the N-cycle. Nitrification and mineralization are thought to be the rate-limiting steps in the N-cycle (Bothe *et al.*, 2006), thus studies have mostly focused on these activities to evaluate plant modifications on soil activity (Allison & Vitousek, 2004; Subbarao *et al.*, 2013b; Tharayil *et al.*, 2013; Ushio *et al.*, 2013) and overlooked other processes such as denitrification.

Denitrification is the reductive process of the nitrogen cycle which transforms water soluble NO_3 into the gaseous form N_2O and/or N_2 (Zumft, 1997). A large part of the N_2O and N_2 emitted from soils comes from the activity of denitrifying bacteria (Cheneby *et al.*, 1998), although denitrification can also be fulfilled by archaea and fungi (Philippot, 2002). In this process, bacteria use nitrogen oxides as alternative terminal electron acceptors in the respiratory chain when the oxygen concentration is low or absent (Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997). Denitrification is known to be primarily governed by environmental conditions such as NO_3 , carbon substrate and O_2 availability, pH, temperature, as well as by the presence of denitrifiers (Wallenstein *et al.*, 2006).

Studies on biological inhibitors were initially focused on plant species exhibiting reducing effects on nitrification and mineralization (Ishikawa *et al.*, 2003; Rauber *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009; Dietz *et al.*, 2013). Although some authors reported lower

denitrification associated with certain plants (Evans *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001), in general, abiotic factors were advanced as the main reason for such an effect (Dassonville *et al.*, 2011) and to our knowledge, biological denitrification inhibition (BDI) was never studied.

As denitrification represents a major N loss in soils (25 to 90%) (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011), this microbial process affects N availability to plants. N is a major plant growth-limiting factor (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008) thus BDI might influence plant growth and the colonization of habitats, particularly in ecosystems with a high denitrification rate. The consequences of BDI may be important for plant growth and yield. A few studies reported reductions in denitrification where plant invasions led to otherwise rapid N loss (Evans *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001).

Attention has recently been paid to the invasive species complex *Fallopia* spp. (Asian knotweeds), native in Eastern Asia, because invaded soils have shown decreased potential denitrification without modifications to the principal factors generally known to drive denitrification (Wallenstein *et al.*, 2006). These results suggest that *Fallopia* spp. could exert a putative BDI through chemical substances targeting denitrification. Moreover, in its native country (Japan) the *Fallopia* spp. complex is known to be well-adapted to growing in low-fertility soils such as Mont Fuji lava and is considered as a pioneer species that modifies soil fertility by greatly increasing N pools (Hirose & Tateno, 1984; Adachi *et al.*, 1996).

Fallopia spp. roots are recognized as being rich in bioactive secondary metabolites (Wurms *et al.*, 1999; Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 2006; Vrchotova & Sera, 2008) and have therefore been used for centuries in ancient Chinese and Japanese herbal medicines (Vastano *et al.*, 2000). In particular, *Fallopia* spp. have been shown to produce antimicrobial substances (Kim *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2008; Pavicic *et al.*, 2009) that may affect bacteria (Shan *et al.*, 2008). The invasive genus *Fallopia* (*Polygonaceae*) includes two Asian herbaceous perennial polyploid species (*F. japonica* and *F. sachalinensis*) that have now become widespread and troublesome invasive weeds throughout the temperate latitudes. Hybridization events involving *F. japonica* and *F. sachalinensis* in invasion areas have led to a complex of polyploid *F. x bohemica* hybrids with various levels of ploidy from tetraploid to octoploid, introgression events (Bailey *et al.*, 2009) and the harbouring of phenotypic differences in the composition of secondary metabolites (Piola *et al.*, 2013). It is known that most root products became available as substrates for rhizosphere colonizing microbes (Hartmann *et al.*, 2009), so these compounds might be available for driving rhizospheric microbial functions.

In this study, we sought to test the idea that the BDI of *Fallopia* spp. may be explained by their secondary metabolites (Dassonville *et al.*, 2011). We investigated the effects of extracts from four *Fallopia* spp. genotypes on 15 cultured denitrifier strains and on a complex microbial community in soil. We hypothesized that *Fallopia* spp. extracts would affect the metabolic activity of denitrifying bacteria by altering microbial respiration activities, and that denitrifying bacteria are more sensitive under anaerobic (denitrifying) than under aerobic conditions. In addition, we investigated the nature and availability of molecules found to be involved in *Fallopia* spp. BDI by testing their water-solubility and identifying the active compounds in the extracts. Finally, we confirmed that the compounds in extracts can affect a complex soil denitrifying community through denitrification inhibition.

I. Materials and Methods

1. Plant growth and extract recovery

Compounds were extracted from the roots and rhizomes of four genotypes of *Fallopia* spp. Adans.: *F. japonica* (Houtt.) Ronse Decraene, *F. sachalinensis* (F.Schmidt) Ronse Decraene and two *F. x bohemica* (Chrték *et* Chrtková) J. P. Bailey. Rhizomes collected in the field were planted in pots filled with compost (Klasmann TS3/sand, 80/20). Plants were grown for six months in a greenhouse under fluorescent light at 21°C, in order to limit maternal site effects. Both rhizomes and roots from each genotype (3 per clonal plant) were collected, cleaned with water and lyophilised. About 75g of lyophilised rhizomes and roots were crushed in a TissueLyser II bead mill (Qiagen, Venlo, Netherlands). Extraction was carried out with 750 ml of water:methanol (50/50; v/v) by ultrasonication for 30 min. After vacuum filtration, the eluate was collected and another extraction was carried out from the residue with 2 x 500 mL of pure methanol. All eluates obtained were pooled and dried. They were re-suspended in water:methanol (50/50; v/v) at a concentration of 10 mg ml⁻¹ before HPLC analyses.

Fractions of *Fallopia* spp. extracts were taken in order to separate water-soluble from non-water soluble compounds to determine the accessibility of active compounds and the possible presence of active substances. Solid-phase extraction of 5 g of dry matter was carried out on Lichoprep RP18 silica (25-40 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) in order to perform vacuum liquid chromatography. Gradient elutions were carried out using 300 ml of water (fraction 1, F1), water:methanol (50/50; v/v) (fraction 2, F2) and pure methanol (fraction 3, F3). Subsequently, water fractions were dried using lyophilisation, while the other fractions were

dried using Speedvac-assisted evaporation (Labconco, Kansas City, USA). Fractions were concentrated at 10 mg ml⁻¹ using their extraction solvent, before HPLC analyses and biological tests.

2. Metabolic activity bioassay

Due to the low extract volume and the large set of conditions that we wanted to test, we used a microplate bioassay to determine the effect of extracts (total or fractions) on the metabolic activity of denitrifying bacteria. Metabolic activity (Siewerts *et al.*, 1995) was assessed using Biolog MT2 microplates (AES Chemunex, Bruz, France), containing only tetrazolium chloride, a redox dye indicator (*i.e.* a proxy for respiration) without carbon substrate. Metabolic activity was monitored by measuring the purple colour of reduced tetrazolium (*i.e.* formazan) using the OmniLog Combo system (Bochner *et al.*, 2008) every 15 min for 110 h. This metabolic activity was measured not only under aerobic conditions to estimate respiration levels but also under anaerobic conditions to estimate anaerobic respiration levels (*i.e.* denitrification). Microplate preparation (culture medium dispensing, extract adding and bacterial inoculation) was performed using the MicroLab Star Robot (Hamilton, Switzerland) under constant sterile conditions. NB liquid medium (Nutrient Broth medium, Difco, Detroit, USA) supplemented with KNO₃ to reach 20 mM final, was used as the growth medium. All incubations were done at 28°C without agitation. Aerobic and anaerobic microplates were strictly similar except that Biolog MT2 microplates filled with 50 µl of mineral oil were added to create anaerobic conditions. Four randomly distributed replicates were done for all conditions. Sterility controls were performed on the same microplate with NaCl (0.9%) instead of bacterial inoculum. Strains were precultured overnight in NB medium with KNO₃ (20 mM) under aerobic conditions to reach their exponential growth phase. After centrifugation (10 min, at 7500 r.p.m), the supernatant was removed and bacterial cells were washed in NaCl solution (0.9%) and starved for two hours in 20 ml NaCl to deplete them of possible C storage compounds. The volume of bacterial suspension was adjusted to have an Optical Density (O.D) = 0.1 at the beginning of the experiment in the growth medium.

First, to determine an active concentration of plant compounds on the metabolic activity of denitrifying bacteria, we performed dose response measurements on the metabolic activity of *P. fluorescens* ATCC 17386 and *P. brassicacearum* NFM421 under anaerobic conditions with 5 concentrations (0.01, 0.02, 0.0625, 0.125 and 0.5 mg ml⁻¹) of *F. japonica* extract.

Then, to generalize the bacterial denitrifier response to the four *Fallopia* spp. extracts, metabolic activity was measured for fifteen denitrifying bacterial strains initially isolated from soil: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17386, *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Pseudomonas brassicacearum* NFM421, *Pseudomonas stutzeri* ATCC11607, *Pseudomonas stutzeri* Zobell, *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Azospirillum lipoferum* TVV3, 2 *Ochrobactrum* sp. (A22 and A17) of *Paracoccus denitrificans* ATCC19367, *Burkholderia vietnamensis* TVV75, *Citrobacter* sp. Hg31, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* and *Klebsiela pneumoniae*. All strains were exposed to 0.5 mg ml⁻¹ of each extract and control (methanol; 2.5% final) under either aerobic or anaerobic conditions.

In order to identify which fraction contained the active metabolites, a similar experiment was performed using the 3 fractions (F1, F2 and F3) of each *Fallopia* spp. extract concentrated at 0.003, 0.025, 0.05 and 0.5 mg ml⁻¹ final on *P. fluorescens* ATCC 17386 under anaerobic conditions, with each fraction paired with a control (water, water:methanol, 50/50; v/v; methanol).

3. Aerobic and anaerobic respiration activity of strains of denitrifying bacteria

In order to confirm that the observed effects of *Fallopia* spp. extracts on metabolic activity were correlated with the effects on aerobic respiration and denitrification, we measured the CO₂ (aerobic respiration) and N₂O (denitrification) emissions of four denitrifying strains, *P. fluorescens* ATCC 17386, *P. brassicacearum*, *B. vietnamensis* and *A. xylosoxidans* under aerobic and anaerobic conditions, respectively. Aerobic respiration and denitrification measurements were taken in 5 ml of liquid NB medium supplemented with KNO₃ (20mM final), in plasma flasks sealed by a rubber stopper. To ensure the right anaerobic conditions for denitrification, the air was removed from the plasma flask and replaced with a He/C₂H₂ mixture (90/10; v/v). *Fallopia* spp. extracts concentrated at 0.5 mg ml⁻¹ or 2.5% methanol as a control were added to the media. Strains were inoculated in 1 ml of liquid NB medium. The Optical Density (O.D) of the strains was adjusted to ensure an O.D of 0.1 in the final volume (5 ml). CO₂ and N₂O emissions were measured every two hours for 4 days with a gas chromatograph coupled to a micro-catharometer detector (μ GC-R3000, SRA instruments, Marcy l'Etoile, France).

4. Secondary metabolites analysis

To identify major phenolic compounds, *Fallopia* spp. extracts and their fractions were analysed using an UHPLC 1290 infinity series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to a G4212A DAD and a Q-TOF 6530 series detector with jet stream electrospray ionisation. MassHunter Acquisition software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used to run the system. A Poroshell 120 EC-C18 column (2.7 μm , 3.0 x 100 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) carried out separation at a temperature of 60°C. The mobile phase was a linear gradient of 0.4% of acetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The linear gradient at the flow rate of 0.6 ml/min was 0 to 1.5 min 2% solvent B; 1.5 to 22 min 2% to 17% solvent B; 22 to 41 min 17% to 100% solvent B; 41 to 41.5 min 100% solvent B. The system was equilibrated before each sample. The injection volume was 1 μl .

Spectra were recorded between 190 and 600 nm and the response at 280 nm was used for qualitative interpretations. The ESI source was optimized as follows: positive ionization mode, scan spectra from M/Z 80 to 2000, capillary voltage 3.0 kV, fragmentor 70 V, fixed collision-induced dissociation (CID) energy at 20 eV. Nitrogen was used as the nebulizing gas with a flow rate of 12 l/min and a temperature of 310 °C at 40 psi.

Compounds were identified by analysing their UV, MS and MS/MS spectra using MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and compared with authentic standards (Sigma-Aldrich). Principal compounds were identified by mass spectrometry and UV-profile analysis, and then validated with standard commercial molecules.

5. Soil experiment

The soil studied was harvested in riparian land adjacent to the Ain river where *Fallopia* spp. is currently growing invasively (45°57'53"N; 5°15'25"E). The soil collected was sieved (2mm) and adjusted to 100% water holding capacity (WHC). Soil samples (25g) were placed in pierced pots. Samples were moistened each week for 6 weeks with 5 ml of each *Fallopia* spp. extract concentrated at 1mg ml⁻¹ (*i.e.* 1.2 mg of extract per g of soil), which is consistent with the total polyphenol mass encountered in *Fallopia* spp. soils (Tharayil *et al.*, 2013). Control soils were similarly amended with the same volume of solvent used to solubilize the extract (methanol 2.5 %). Eight replicates were performed for each treatment, a total of 5 treatments (4 plant extracts + 1 methanol control) x 8 replicates = 40 pots.

6. Measurements of microbial activities

Substrate-induced respiration (SIR) was measured as CO₂ production (Anderson & Domsch, 1978). Soil samples (5 g) were placed in an airtight flask in 21% O₂ atmosphere, containing 0.5 ml of a nutritive solution including glucose (1.2 mg of C-glucose g⁻¹ of dried soil) then incubated at 28°C. CO₂ levels were measured each hour for 5 hours and the slope of the linear regression was used to estimate aerobic respiration as the CO₂ produced (g⁻¹.h⁻¹).

We measured denitrification enzyme activity (DEA) in soil using a method adapted from Dassonville *et al.* (2011). Five grams of soil were placed in a 150 ml airtight plasma-flask sealed by a rubber stopper. In each flask, air was removed and replaced with a He/C₂H₂ mixture (90/10 v/v) to create anoxic conditions and inhibit N₂O-reductase. A nutritive solution (0.5 ml) containing glucose (0.5 mg of C-glucose.g⁻¹ of dried soil), glutamic acid (0.5 mg of C-glutamic acid g⁻¹ of dried soil) and potassium nitrate (50 µg of N-KNO₃ g⁻¹ of dried soil) was added to the soil. The amount of N₂O during incubation at 28°C was measured each hour for 5 hours. The slope of the linear regression was used to estimate anaerobic respiration (denitrification) as the N₂O produced (g⁻¹.h⁻¹).

Gases (CO₂ and N₂O) were measured with a gas chromatograph coupled to a micro-catharometer detector (µGC-R3000, SRA instruments, Marcy l'Etoile, France).

7. Abundance of total bacteria and denitrifying bacteria

Microbial DNA was extracted from each soil sample using the Fast DNA kit (Mp Biomedicals, LLS, USA), following the manufacturer's protocol. DNA concentrations were determined with the Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen molecular probes, Eugene, OR, USA) following the manufacturer's instruction.

Quantification of bacterial 16S rRNA, *nirK* and *nirS* genes were performed by quantitative PCR using primers developed in previous studies (Lane, 1991; Henry *et al.*, 2004; Kandeler *et al.*, 2006). The final reaction volume was 20µl for all, with 300nM for 16S rRNA, 1µM for *nirK* and *nirS* of forward and reverse primers; 1x LightCycler DNA Master Mix SYBR® Green I (Roche Applied Science, USA) for 16S rRNA and 10 µl of QuantiTect SYBR® Green I PCR kit (Qiagen, France) for *nirK* and *nirS*; 0.4 µg of T4 protein (Qbiogene, Carlsbad, USA) for *nirK* and *nirS*; 1ng of sample DNA or 10⁸–10² copies of the standard DNA pQuantAlb16S plasmid (Zouache *et al.*, 2012) for 16S rRNA, linear plasmid with *nirK* gene PCR product for *Sinorhizobium meliloti* 1021 for *nirK* and *Pseudomonas stutzeri* Zobell

DNA for *nirS*. Each sample was run twice (threshold of error accepted between replicates = 0.1×10^x) on a lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) and the mean was used. The amplification conditions were: 10 min at 95°C for each; 40 cycles for 16S rRNA, 45 for *nirK* and 60 for *nirS*: 95°C for 15 s for 16S rRNA, *nirK* and *nirS*; 63°C for 60 s for 16S rRNA, or 30 s for *nirK* and *nirS*; 72°C for 30 s for each. Then 95°C for 1 s for each; 65°C for 60 s for 16S rRNA, 68°C for 20s for *nirK* and 60°C for 30s for *nirS* and a continuous increase to 98°C to determine the melting point and finally 10 s at 40°C for cooling. Possible PCR inhibition by co-extracted compounds was controlled by co-amplifying standards and several dilutions of samples for all qPCR. No inhibition was observed.

8. Data and statistical analyses

The maximum slopes of the different kinetics were used for all comparisons and statistical analyses. To test the concentration effect of *F. japonica* extract on the anaerobic metabolic activity of *P. fluorescens* and *P. brassicacearum*, a two-way ANCOVA was performed with the strain, the different extract concentrations and the interaction of these two terms as co-factors. To test the effect of treatment (extracts of the four *Fallopia* spp.) and oxygen status (aerobic *versus* anaerobic conditions) on the metabolic activity of 15 strains of denitrifying bacteria as well as on the respiratory activities of four strains, two REML mixed models were computed on percentages of inhibition (I%) with strain as the random factor, with treatment and the interaction terms as fixed factors. Oxygen status was omitted from the REML mixed models because we normalised metabolic activity and respiration (CO₂ or N₂O emitted) results by bacterial strain for each oxygen status (*i.e.* aerobic and anaerobic). To test the effect of extract fractions and concentration on the metabolic activity of *P. fluorescens*, a three-way ANCOVA was performed. Then, factors were selected by a stepwise method. Significant differences were determined using Tukey's HSD post-hoc test. Linear regressions for the inhibition of metabolic activity of *P. fluorescens* by F1 and F2 of all *Fallopia* spp. extracts were performed with major compound peak areas from the HPLC chromatogram to identify putative compounds involved in inhibition. To test the effect of *Fallopia* spp. extracts on DEA, SIR, the DEA/SIR ratio and the denitrifier/total bacteria gene abundance ratio, one-way ANOVAs were performed, with treatment as factor. Significant differences were determined using Tukey's HSD post-hoc tests.

Data were log- or exponentially transformed to ensure data normality. All analyses were performed using R project software (R Development Core Team, 2008) and the following packages: pgirmess, gplot, nlme.

II. Results

1. Metabolic activity measurements using Biolog bioassay

The anaerobic metabolic activities of *P. fluorescens* and *P. brassicacearum* significantly decreased with increasing concentrations of extracts (p-value <0.001), but the shape of their response curves differed. While the change in metabolic activity was not significant below a concentration of 0.02 mg ml⁻¹, *Fallopia* extract added at a concentration of 0.0625 mg ml⁻¹ stimulated the metabolic activity of *P. brassicacearum*, whereas *P. fluorescens* reached maximum inhibition (53%). However, the inhibition of *P. brassicacearum* was significant with a *Fallopia japonica* extract at a concentration of 0.125 mg ml⁻¹ and maximal (53%) at a concentration of 0.5 mg ml⁻¹ (Fig. 20). Based on these observations, we selected 0.5 mg ml⁻¹ as the concentration for performing further tests on a larger number of denitrifying bacterial strains.

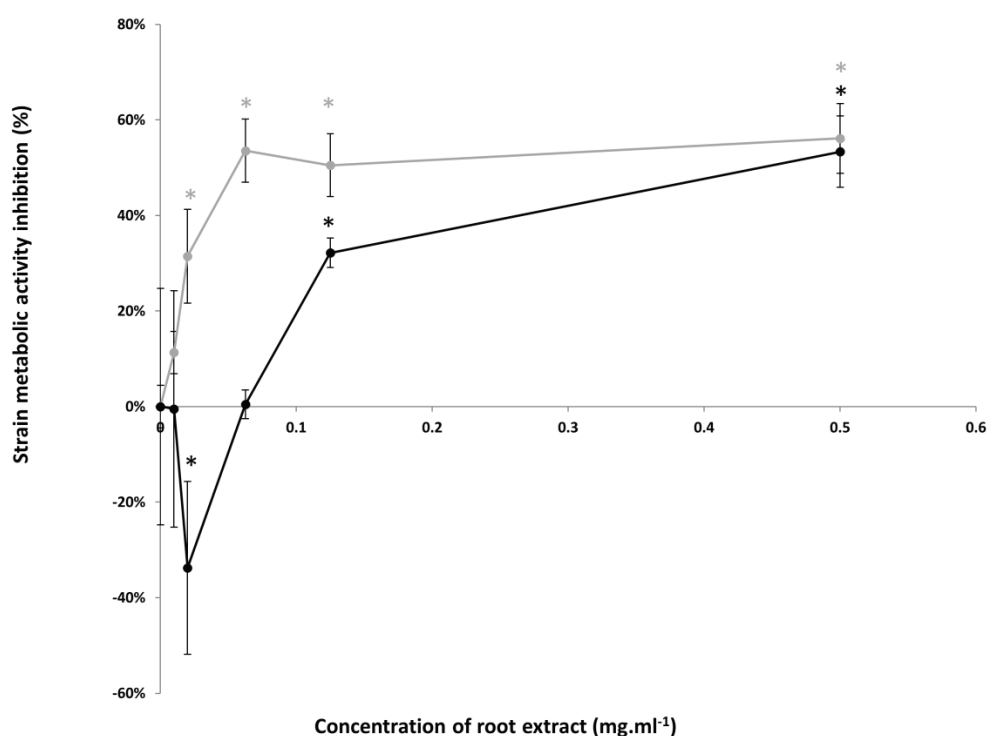


Figure 20 Percentage inhibition of metabolic activity (relative to control) of increasing concentrations of *Fallopia japonica* extracts on *P. fluorescens* (grey) and *P. brassicacearum* (black) under anaerobic (denitrifying) conditions. Values are means and vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means significantly differed from the control treatment (P-value < 0.05).

For all 15 tested strains of denitrifying bacteria, both aerobic and anaerobic metabolic activity decreased significantly (inhibition between 51 and 62%) with the application of *Fallopia*

extracts at a concentration of 0.5 mg ml⁻¹ (Table 1 and Fig. 21a). For all *Fallopia* spp., metabolic activities were significantly more reduced (-55%) under anaerobic than under aerobic (-45%) conditions (Fig. 21a).

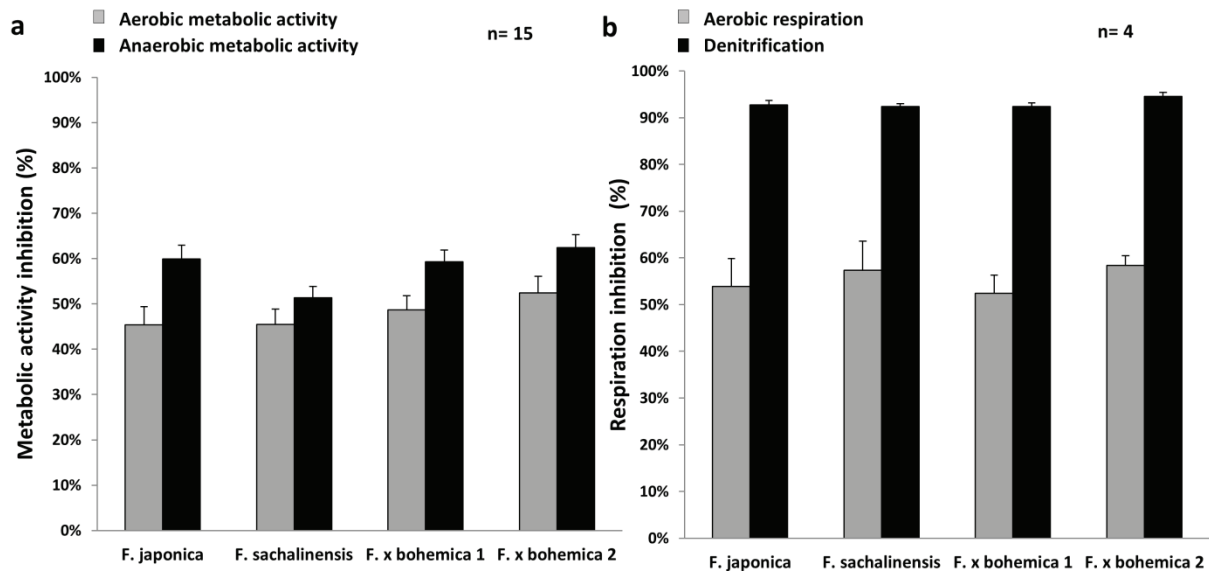


Figure 21: Average inhibition effects (relative to control) of *Fallopia* extracts on a) the metabolic activity of 15 denitrifying bacteria and b) the respiratory activity of 4 denitrifying bacteria, under aerobic respiration (grey) and anaerobic or denitrifying (black) conditions. Vertical bars indicate standard errors.

2. Aerobic respiration and denitrification by four strains of denitrifying bacteria

In comparison with metabolic activity, for the 4 strains, respiratory activity under aerobic and anaerobic conditions was significantly reduced by *Fallopia* extracts, up to 50% for aerobic respiration and up to 95% for anaerobic respiration (denitrification) (Fig. 2b; Table 1). Denitrification was significantly more affected by extracts than aerobic respiration (Table 1). The inhibition of denitrification was positively and significantly correlated with anaerobic metabolic activity inhibition ($R^2= 0.307$ p-value<0.05). Similarly the inhibition of aerobic respiration was positively and significantly correlated with aerobic metabolic activity inhibition ($R^2= 0.278$, p-value<0.05).

Table 1: REML analyses of the metabolic activity ratio and the denitrification activity ratio with treatment (Control + 4 *Fallopia* extracts) and treatment condition (aerobic respiration and denitrification) interaction as factors. Df: Degrees of freedom, F-values and significance level (significance: * P-value < 0.05; ** P-value < 0.01 and *** P-value < 0.001). See Figure 2 for graphical representation.

Metabolic activity inhibition (%)	Df	F-values	Respiration inhibition (%)	Df	F-values
Treatment	4	297.83***	Treatment	4	217.70***
Treatment x Condition	5	3.82**	Treatment x Condition	5	33.72***

3. Effect of *Fallopia* extract fractions on the anaerobic metabolic activity of *P. fluorescens*

Metabolic inhibition by *Fallopia* extract fractions on the anaerobic metabolic activity of *P. fluorescens* was dose-dependent, but no significant differences were found between the *Fallopia* species or hybrids (Fig. 22; Table 2). However, the three extract fractions showed different effects on the metabolic activity of *P. fluorescens*. Fractions 1 and 2 reduced significantly the anaerobic metabolic activity at a concentration of 0.05 mg ml⁻¹ down to 90%, and fraction 3 stimulated two -fold the anaerobic metabolic activity of this bacterial strain.

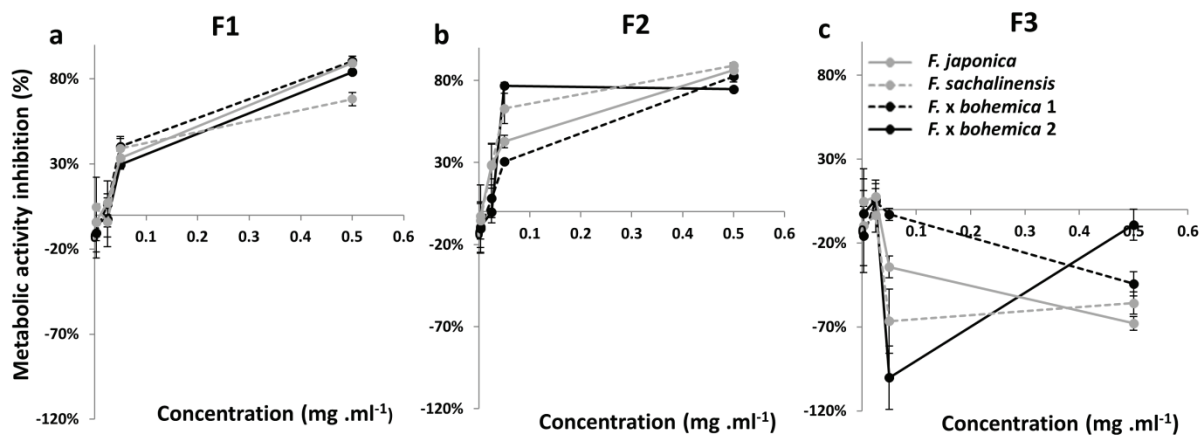


Figure 22: Effects of increasing concentrations of *Fallopia* extract fractions a) F1 (water), b) F2 (water:methanol) and c) F3 (methanol) on the metabolic activity of *P. fluorescens* under anaerobic (denitrifying) conditions. Vertical bars indicate standard errors. See Table 2 for statistical analyses.

Table 2: Three-way ANCOVA on the inhibition and stimulation effects of *F. japonica*, *F. x sachalinensis*, *F. x bohemica 1* and *F. x bohemica 2* fractions (F1) water, (F2) water:methanol, and (F3) methanol on the metabolic activity of *P. fluorescens* under denitrifying conditions. Df: Degrees of freedom, F-values and significance level (significance: * P-value < 0.05; ** P-value < 0.01 and *** P-value < 0.001). See Figure 5 for graphical representation.

	Df	F-values
Fraction	2	64.95***
Genotype	3	0.15
Concentration	1	48.07***
Fraction x Genotype	6	0.87
Fraction x Concentration	2	40.78***
Genotype x Concentration	3	0.98

4. **Fallopia extracts and fraction analyses**

Several compounds belonging to the flavonoid family and more especially to the flavan-3-ol, stilbene and hydroxyanthraquinone classes were identified in root extracts (Fig. 23). Catechin, epicatechin and derivatives, piceatannol glucoside, resveratrol, piceid, resveratrol, emodin and physcion were the major compounds detected (Fig. 23). However, no stilbenes were found in *F. sachalinensis*. Otherwise, major compounds were present in varying proportions in the different genotypes. At the beginning of the chromatograms, the first high peak corresponded to very polar compounds that were not well separated, suggesting that not all compounds present in extracts were identified.

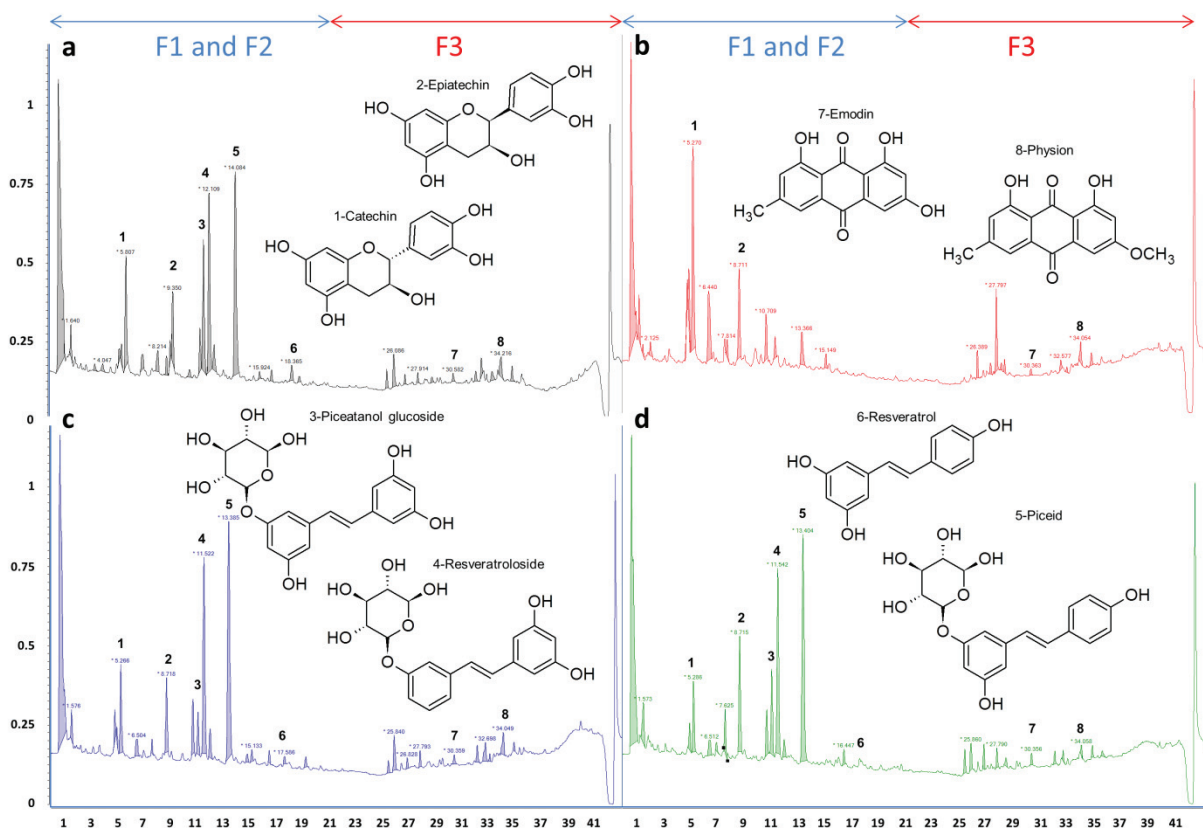


Figure 23: UV chromatograms observed at 280 nm of the four *Fallopia* extracts a) *F. japonica*, b) *F. sachalinensis*, c) *F. x bohemica* 1 and d) *F. x bohemica* 2 presenting the chemical structures of the principal compounds (1 to 8) encountered in *Fallopia* extracts and *Fallopia* extract fractions (F1, F2 and F3).

The Chromatograms of F1 and F2 were similar, corresponding to polar compounds (flavan-3-ol and stilbene) encountered in *Fallopia* extracts up to 21 min in *Fallopia* extract chromatograms. Fraction 3 corresponded to non-polar molecules (hydroxyanthraquinones) different from those encountered in Fractions 1 and 2 (Fig. 23). A correlation between catechin levels in fractions 1 and 2 with the inhibition effect of fractions at a concentration of 0.5 mg ml^{-1} on *P. fluorescens* was observed (Fig. 24), but not for other major compounds.

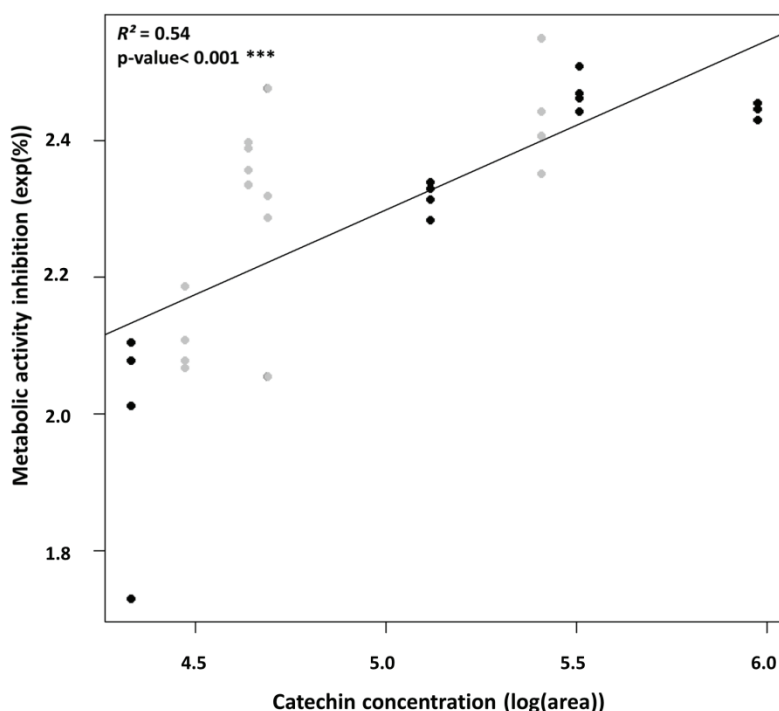


Figure 24: Relationship between the percentage inhibition of metabolic activity of *P. fluorescens* with catechin in fraction 1 (black) and 2 (grey) of *Fallopia* extracts at a concentration of 0.5 mg ml⁻¹. The percentage inhibition of metabolic activities was exponentially transformed and the catechin concentrations logarithmically transformed.

5. Effects of *Fallopia japonica* extracts on denitrification in soil

After 6 weeks, extracts from *F. japonica* significantly decreased by half the DEA in soil (Fig. 6a). However, DEA did not significantly change with the addition of *F. sachalinensis* or either of the *F. x bohemica* hybrid extracts, although the trend was an observable reduction. Extracts from *F. japonica* and *F. x bohemica* significantly increased the SIR in soil compared to the control but not from *F. sachalinensis*, (Fig. 25a). The DEA/SIR ratio was significantly reduced (from 50 to 69%) with extracts from all genotypes (Fig. 25a). However, no significant effect was observed on 16S rRNA, *nirK*, and *nirS* gene abundance or on the [*nirK+nirS*]/ 16S rRNA gene ratio (Fig.25b).

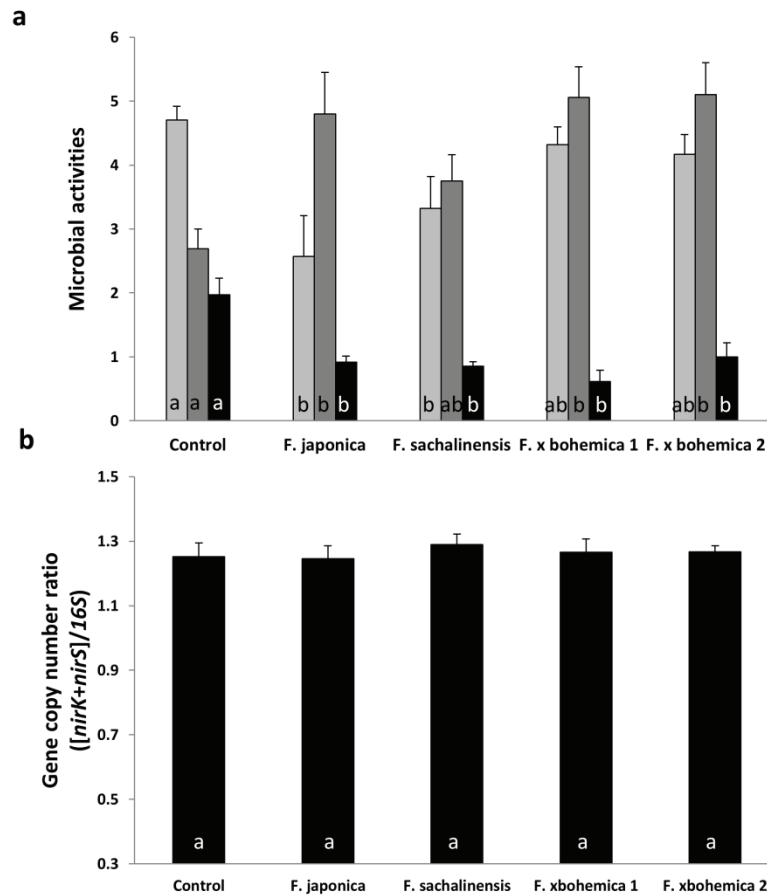


Figure 25: Effect of Fallopia extracts added to soil on a) Denitrification enzyme activity (DEA, light grey bars; $\mu\text{g N-N}_2\text{O h}^{-1} \text{g}^{-1}$ dried soil), Substrate induced respiration (SIR, midgrey bars; $\mu\text{g C-NCO}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ dried soil) and the resulting DEA/SIR ratio (black bars) and b) gene abundance ratios of nirK/16S rRNA and nirS/16S rRNA. Letters show which means differed between treatments (Tukey's test; $\alpha=0.05$). Vertical bars indicate standard errors.

III. Discussion

This study, for the first time, demonstrated that low denitrification level in soils as previously observed by Dassonville *et al.* (2011), can be linked to biotic interactions with plants. *Fallopia* spp. can result in release of certain compounds that specifically inhibit the denitrification activity of denitrifying bacteria and a complex soil denitrifying community.

1. Fallopia spp. compounds reduce the anaerobic metabolism of denitrifying bacteria

Dassonville *et al.* (2011) suggested that *Fallopia* spp. may limit the development of denitrifying bacteria by interfering with their metabolism. Our results show that secondary metabolites from *F. japonica* reduced the metabolic activity of two denitrifying bacteria, *P. fluorescens* and *P. brassicacearum* in a growth medium, and that this effect depended on the

compound concentrations. Both strains were sensitive to *Fallopia* spp. extracts, but their sensitivity was slightly different, with a maximal effect reached at 0.0625 mg ml⁻¹ for *P. brassicacearum* and only at 0.5 mg ml⁻¹ for *P. fluorescens* and minimal inhibition at 0.0625 mg ml⁻¹ and 0.125 mg ml⁻¹ respectively. In a previous study, Shan *et al.* (2008) reported antibacterial properties on bacterial growth of extracts from *F. japonica*, however, no metabolic inhibition was observed on the growth of foodborne bacteria at extract concentrations five-fold higher (= 2.5 mg ml⁻¹) than the ones we used. This suggests that denitrifiers could be more sensitive to *Fallopia* spp. compounds than other bacteria. However, a large range of bacterial genera are able to perform denitrification, and this process is certainly not confined to *Pseudomonads* that usually harbor a wide functional metabolic range and high genetic diversity (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). At *Fallopia* extract concentrations of 0.5 mg ml⁻¹, metabolic activity measurements, extended to 15 denitrifying bacteria in 10 genera, suggested that the effect of *Fallopia* spp. might be quite a widespread phenomenon in denitrifying bacteria.

Moreover, we demonstrated that metabolic activity was more inhibited under anaerobic conditions, when denitrification occurs, compared to under aerobic conditions. Significant correlations between the effects on anaerobic metabolic activity and denitrification on the one hand and aerobic activity and respiration on the other, confirm that metabolic activity is a well-adapted method for screening the effects of *Fallopia* spp. compounds on bacterial strains. Measuring the denitrification and aerobic respiration of 4 denitrifying strains revealed that denitrification was almost totally inhibited (> 92% inhibition) by secondary metabolites concentrated at 0.5 mg ml⁻¹, unlike aerobic respiration, which was inhibited by just 50%. The lower sensitivity of anaerobic metabolic activity compared to the denitrification measurements suggests that other processes such as fermentation may partially compensate for the reduction in denitrification (anaerobic respiration with nitrate) in Biolog bioassays.

These results show that compounds from *Fallopia* spp. interfere with bacterial respiratory processes, particularly denitrification. Using this mechanism, *Fallopia* spp. compounds may reduce metabolism in denitrifying bacteria and hence select against denitrifiers in the soil, over the long term.

2. Types of molecules involved in denitrification inhibition

Shan *et al.* (2008) reported that stilbenes and hydroxyl-anthraquinones in *Fallopia japonica* extracts greatly contributed to the antibacterial properties they observed. The minimal

inhibitory concentrations of pure molecules tested by Shan *et al.* (2008) on common foodborne bacteria were two-fold higher than in our *Fallopia* spp. extracts. This suggests that denitrification may be more sensitive to *Fallopia* extract molecules, or that these could exhibit synergic effects when mixed in the extract, or that this mixture contained different molecules than those tested by Shan *et al.* (2008). In our study, fractions 1 and 2, which were active against denitrifying bacteria, contained only flavan-3-ols and stilbenes, two types of molecules known for their antimicrobial properties (Kajiya *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2008). However, no stilbene was found in the *F. sachalinensis* extract, while fractions 1 and 2 from this genotype were active against denitrifying bacteria. This suggests that the molecules involved in BDI could be flavan-3-ols such as catechin, epicatechin or derivatives. The correlation between the peak corresponding to catechin levels in fractions 1 and 2 and the inhibitory effect on the metabolic activity of *P. fluorescens* (Fig. 5) suggests that BDI by *Fallopia* spp. extracts may be linked to the concentration of this compound. Putative compound(s) involved in this biological inhibition may be related to catechin, a compound that is known for its antibacterial activity (Kajiya *et al.*, 2004). However, showing the clear involvement of catechin or its derivatives in BDI was beyond of the scope of this study and further investigations are needed to identify the molecules involved. Nevertheless, the location of active compounds in fractions F1 and F2 revealed that molecules inhibiting denitrification were highly water-soluble. These compounds could easily be transported through the soil by water (Hartmann *et al.*, 2009) after release by *Fallopia* spp. These compounds could be released either through root exudation, as shown by Michalet *et al.* (2013), or litter degradation as it is known that *F. japonica* can release a large range of polyphenols into the soil (Tharayil *et al.*, 2013).

A surprising result was that fraction 3 stimulated the anaerobic metabolic activity of *P. fluorescens*. This may be due to the presence of anthraquinones among the extracted compounds. In fact, Guo *et al.* (2010) reported that the anthraquinone molecule was capable of raising the denitrification rate two-fold, similar to what we observed. These authors reported that anthraquinones may interfere with the denitrification process because redox mediators acted as an electron donor for the denitrifying respiratory chain reaction, such as quinone in bacteria (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). However, anthraquinones are poorly water-soluble molecules and may, therefore, be less available in soil.

3. Confirmation of BDI on complex soil denitrifying community

Due to the large diversity of denitrifiers, it was important to validate BDI on a natural soil community. Although, extracts from *F. sachalinensis* did not significantly modify SIR and DEA, *F. japonica* extracts induced a significant increase in SIR and reduced DEA, and *F. x bohemica* extracts significantly increased SIR without impacting DEA. These effects were not linked to abiotic factors known to be important in regulating denitrification (Wallenstein *et al.*, 2006), such as humidity or nitrate availability, which were identical in all samples (data not shown). However, microbial (aerobic or anaerobic) respiration is highly dependent on carbon availability, and under limiting conditions, carbon amendments often lead to increases in DEA and SIR (Tenuta *et al.*, 2000; Berryman *et al.*, 2013). To avoid the potentially masking effect of C input on denitrification, Schimann *et al.*, (2012) proposed the use of the DEA/SIR ratio in order to reveal finer changes in the functioning of a soil microbial community. According to these authors, a reduction in the DEA/SIR ratio reflects a decrease in the proportion of denitrifying activity within the heterotrophic community and therefore a modification of the functioning of the community. The DEA/SIR ratio measured in this study illustrated that root compounds from *Fallopia* spp. reduced denitrification relative to the aerobic respiration (Fig. 6a). This effect was only observed on the activity but not on the abundance of total soil bacteria and of denitrifiers (data not shown), nor on the [*nirK*+*nirS*]/16S rRNA ratio, which shows putative deselection of denitrifying bacteria as a function of total soil bacteria (Fig. 6b). In their study, Dassonville *et al.* (2011) showed that on plots invaded by *Fallopia* spp. for several years, the reduction in denitrification was related to a decrease in the abundance of denitrifying bacteria. In the present study, over a short period (6 weeks), such selection did not occur and only metabolic activities were significantly affected. Moreover, since denitrification is an alternative respiration process occurring when oxygen concentrations are low or absent (Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997), we can hypothesize that the numbers of denitrifiers were less affected by the extracts because the anaerobic conditions were not sufficient for their exclusion. This result also suggests that the active compounds specifically affected denitrification, which could later result in a reduction in the abundance of denitrifying bacteria or that adaptation to *Fallopia* spp. compounds may occur in soils influenced by *Fallopia* spp. To test these hypotheses, a longer experiment is needed. Nevertheless, our results suggest that compounds from *Fallopia* spp. may reduce denitrification rates in soils by directly targeting denitrifying bacteria without impacting abiotic factors, in particular major ones known to drive denitrification.

Conclusion

The BDI described in our study is similar to biological nitrification inhibition (BNI) (Subbarao *et al.*, 2013b) because both limit nitrogen losses and might be considered in the context of niche construction theory (Odling-Smee, FJ *et al.*, 2003). Viewed in relation to “plant soil feedback” theory (van der Putten *et al.*, 2013), our results shed light on a process by which *Fallopia* spp. may successfully invade new riparian habitats. The release of denitrification or nitrification inhibitors by plants or invasive species may be an overlooked phenomenon which could promote their growth. Beyond the study case of *Fallopia* spp. or invasive species, the role of plant compounds in regulating the nitrogen cycle processes is of fundamental importance for natural and agricultural ecosystems. This work will pave the way for future strategies to control the nitrogen cycle processes and improve the ecosystem services particularly in agricultural systems.

Acknowledgements

This work was supported by the French national program EC2CO-MicrobiEn, TeraNoTro. Biolog[®] plates, preparation and quantitative PCR were performed at the DTAMB platform (FR41, University Lyon1). We are grateful to Boris Missery for his help in performing qPCR. Microbial activities were measured at the AME platform (UMR 5557), using the Omnilog at the Parmic platform (UMR5557). Compound analyses were carried out at the CESN platform (UMR5557). We also thank the handling editor and referees for their input in improving the manuscript.

Partie 2 Quelles sont les molécules impliquées dans l'inhibition biologique de la dénitrification par *Fallopia* spp.?

Identification of compounds, B-type procyanidins, involved in biological denitrification inhibition (BDI) in *Fallopia* spp..

Clément Bardon^{1,2}, Florence Piola², Feth el Zahar Haichar¹, Guillaume Meiffren, Gilles Comte, Boris Missery¹, Manon Balby² and Franck Poly^{1*}

Adresses:

¹Université de Lyon, UMR 5557 LEM, Université Lyon 1, CNRS, INRA USC 1364, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

²Université de Lyon, UMR5023 LEHNA, Université Lyon 1, CNRS, ENTPE, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

***Corresponding author:**

Franck Poly

Tel : +33472431379

Email: franck.poly@univ-lyon1.fr

Summary:

- Nitrogen (N) is often considered as the first limiting factor of plant growth and N-losses through denitrification can be responsible of severe decreases in plants productivity. Recently, it has been demonstrated that *Fallopia* spp. is responsible for biological denitrification inhibition (BDI) through the release of unknown secondary metabolites. Here, we investigate the secondary metabolites involved in the BDI of *Fallopia* spp..
- Antioxidant, protein precipitation capacities of *Fallopia* spp. extracts were measured as their effect on the aerobic and the anaerobic (denitrification) respiration of two bacteria (Gram-positive and Gram-negative). Concentration of proanthocyanidins in extracts was estimated. Proanthocyanidins of extracts were characterized by chromatographic analysis, purified and tested on the bacterial denitrification and aerobic respiration. The effect of commercial procyanidins on denitrification was tested on two soils.
- In extracts, denitrification and aerobic respiration inhibition were correlated to the protein precipitation capacity and the concentration of proanthocyanidins but not to the antioxidant capacity. Proanthocyanidins were B-type procyanidins that more inhibited the denitrification than the aerobic respiration of bacteria. Commercial procyanidins inhibited the denitrification of soils.
- We demonstrate that procyanidins are involved in BDI of *Fallopia* spp.. Our results path the way through a better understanding of plant microbe coevolution and highlight further agricultural applications for a more sustainable agriculture.

Keywords: biological denitrification inhibition, denitrification, denitrification inhibitor, denitrifying bacteria, *Fallopia* spp., procyanidins.

Introduction

Nitrogen (N) is often considered as the first limiting factor of plant growth in terrestrial ecosystems (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008) and N-losses from terrestrial ecosystems are responsible of severe agricultural decreases in productivity (Dinnes *et al.*, 2002). Hence, modern agriculture concentrated efforts in remedying to N losses through massive N inputs (Dinnes *et al.*, 2002; Galloway *et al.*, 2008) even though massive N inputs could have deleterious consequences on ecosystems, human well-being and human health (Driscoll *et al.*, 2003; Howarth, 2008) by notably producing N₂O greenhouse gas emission contributing to global warming (Bremner & Blackmer, 1978).

Reports highlighting evidences that some plants can drive the nitrogen cycle through the release of secondary metabolites increased the last decade with the discovery of nitrification (Subbarao *et al.*, 2008; Zakir *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009) and N mineralization inhibitors (Dietz *et al.*, 2013). Biological nitrification inhibitors may participate in preserving soil N fertility and limit N₂O greenhouse gas emissions by reducing N losses through NO₃ reduction by denitrification (Subbarao *et al.*, 2012a; Subbarao *et al.*, 2012b; Dietz *et al.*, 2013; Jones, 2013). The reduction of N losses by biological inhibitors could be an alternative to massive N inputs for a sustainable agriculture. They may be used in a way to promote plants productivity (Boudsocq *et al.*, 2009; Subbarao *et al.*, 2012b; Jones, 2013).

Nitrification and N-mineralization are sought to be the rate-limiting steps in the N-cycle (Bothe *et al.*, 2006). Thus, studies on specific inhibitors of the N-cycle mostly focused on these two processes but overlooked others (Bardon *et al.*, 2014). While denitrification is the direct way of gaseous N-losses from soils and thus plants productivity strongly depends on this process (van der Heijden *et al.*, 2008), the existence of the biological denitrification inhibition (BDI) was only recently demonstrated by Bardon *et al.* (2014).

Denitrification is a reductive process of the nitrogen cycle catalyzing the biological reduction of the water soluble anion NO₃⁻ to N₂O and N₂ gases (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). In soils, denitrification is principally fulfilled by Gram-positive and Gram-negative bacteria (Cheneby *et al.*, 1998) although it has been demonstrated that some archaea and fungi can achieve this process (Shoun *et al.*, 1992; Philippot, 2002). Denitrification is an alternative anaerobic respiration realized when oxygen is low or absent. In this process, NO₃ is used as an alternative terminal electron instead of O₂ (Zumft, 1997). Until recently, the principal

factors known to regulate denitrification were, the NO₃ availability, the carbon substrate availability, the pH and the redox potential that condition either enzyme activity and enzyme expression (Wallenstein *et al.*, 2006). Some chemical inhibitors exist. Chlorate have been shown to selectively inhibit the cytoplasmic nitrate-reductase (*i.e.* *Nar*) of denitrification (Rusmana & Nedwell, 2004) but it has also collateral toxic effects on all bacteria (van Wijk *et al.*, 1998). Acetylene gas is now a currently used inhibitor of the N₂O-reductase that inhibit the final N₂O reduction into N₂ in the denitrification chain (Klemedtsson *et al.*, 1977), but nothing was known about the identity of biological denitrification inhibitors (BDI).

In their recent study, Bardon *et al.* (2014) brought evidences for the existence of BDI in *Fallopia* spp. that could target Gram-negative bacteria through secondary metabolites released. *Fallopia* spp. is an invasive plant belonging to a complex species native from Eastern Asia (Bailey *et al.*, 2009). Despite clear evidences for the existence of BDI in *Fallopia* spp. major molecules involved remain unidentified. Nevertheless, Bardon *et al.* (2014) suggested that polyphenolic compounds such as catechin and its derivatives could be involved. These compounds can be good candidates but potential allelopathic role of catechin has been queried (Inderjit & van der Putten, 2010; Wang *et al.*, 2013). Catechin is also known as a precursor of procyanidins, a group of polyhydroxyflavan-3-ol oligomers and polymers from the class of proanthocyanidins, linked by C-C bonds between flavanol subunits (*i.e.* catechin and epicatechin) (Schofield *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2005). Procyanidins have also been reported to show antibacterial properties (Wu *et al.*, 2008; Lacombe *et al.*, 2013).

In this study we sought, to test the idea that *Fallopia* spp. denitrification inhibitors can target both Gram-negative and Gram-positive bacteria as it was not yet demonstrated. Then we sought to identify compounds involved in BDI with the high suspicion on catechin and its derivatives. Finally we aim to validate the BDI effect of the active compounds on complex soil denitrifying communities.

I. Materials and Methods

1. Plant growth and *Fallopia* extracts recovery

Compounds were extracted from the roots and rhizomes of four genotypes of *Fallopia* spp. Adans.: *F. japonica* (Houtt.) Ronse Decraene, *F. sachalinensis* (F.Schmidt) Ronse Decraene and two *F. x bohemica* (Chrtek *et* Chrtková) J. P. Bailey following the protocol described by Bardon *et al.* (2014) to obtain a methanolic extract at 10 mg ml⁻¹.

2. Effect of *Fallopia* extracts on aerobic and anaerobic strains respiration activities

The effect of the four *Fallopia* spp. extracts on aerobic respiration and denitrification of *Pseudomonas brassicacearum* NFM421 and *Bacillus cereus* A19, two denitrifying bacteria, frequently encountered in soils, respectively belonging to Gram-negative and Gram-positive bacteria was tested as described by Bardon *et al.* (2014). Briefly, 5 ml of growth liquid media NB with 20mM KNO₃ and an initial Optical Density (O.D) = 0.1, were supplemented with *Fallopia* spp. extracts to reach a final concentration of 0.5 mg ml⁻¹ or methanol (2.5% final) as a control. Aerobic respiration and denitrification activity were measured by CO₂ and N₂O emission respectively under aerobic or anaerobic (90/10; He/C₂H₂) conditions every two hours for 4 days with a gas chromatograph and all cultures were done in 4 replicates.

3. Estimation of proanthocyanidins amounts in *Fallopia* extracts

Quantification of proanthocyanidins (*i.e.* procyanidins and delphinidins) in the 4 *Fallopia* extracts was performed in 4 replicates using the acid butanol method (Dalzell & Kerven, 1998). Proanthocyanidins contained in *Fallopia* extracts (1 ml at 10mg ml⁻¹) were oxidatively cleaved to anthocyanidins (*i.e.* cyanidins and delphinidins) at 95°C for 50 min by adding 6 ml of acid-butanol reagent (butanol/ 12 N HCl; 95/5; v/v) and 200µl of ferric ammonium sulfate (20mg.ml⁻¹) with 2N HCl. The reaction mixture was cooled and anthocyanidins quantified spectrometrically for an absorbance at 550 nm using as standard different commercial proanthocyanidins solutions (Laffort, Bordeaux, France) at 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 and 10 mg ml⁻¹.

4. *Fallopia* extracts properties

Protein precipitation capacity was measure for the 4 *Fallopia* extracts in 4 replicates. Protein precipitation capacity was quantified according to the radial diffusion method with precipitation of bovine serum albumin (BSA) (GinerChavez *et al.*, 1997). To prepare a buffer, ascorbic acid was concentrated at 10.6 mg l⁻¹ in a glacial acetic acid/water mixture (pH=5; 80/20; v/v) then the pH was adjusted to 5 with 2N NaOH. Agarose (1 g) was dissolved in 100 ml of buffer. The buffer was heat with continuous stirring until the agarose completely dissolved. The buffer was cooled and maintained at 45°C. The cooled buffer was supplemented with 0.10 g of BSA then petri dishes were filled with 9.5 ml of the BSA buffer. After cooling, wells were pierced (diameter 5 mm) in petri dishes and filled with 20 µl of the sample to quantify the protein precipitation capacity. Petri dishes were incubated at 30°C for

96 h. The protein precipitation of the sample corresponded to the diameter of the ring that has formed.

The antioxidant capacity of the 4 *Fallopia* spp. extracts was quantified according to (Triebwasser *et al.*, 2012) by measuring the depletion of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[·]) spectrophotometrically when combined with extracts. A solution of DPPH (38 g.ml⁻¹) was prepared in 100% methanol. The antioxidant capacity of *Fallopia* spp. extracts was performed at a concentration of 10 µg ml⁻¹. The reaction mixture (10µl DPPH + 14µl extracts or control+976µl MeOH) for measure was optimized for 1 A.U. in the absence of extracts. The reaction mixture was shaken at room temperature for 15 min then absorbance at 517 nm was immediately measured. The antioxidant capacity corresponded to:

$$\text{Antioxidant capacity \%} = [\text{Abs}_{517}(\text{Sample})] / \text{Abs}_{517}(\text{Control}) \times 100$$

5. Proanthocyanidins analysis in *Fallopia* extracts

To identify major structures of proanthocyanidins (*i.e.* procyanidins and prodelphinidins) encountered in *Fallopia* extracts, *Fallopia* extracts were analysed by an UHPLC 1290 infinity series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to a G4212A DAD and a Q-TOF 6530 series detector with jet stream electrospray ionisation following the same protocol than Bardon *et al.* (2014). Proanthocyanidins were identified by analysis of their UV, MS and MS/MS spectra using MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

6. Procyanidins purification from *Fallopia* extract

Procyanidins were purified from the *F. x bohémica* 2 extract using a sephadex LH20 column. The sephadex LH 20 was equilibrated swelling 25 g with 100 ml of 80% ethanol then discarding the supernatant. The equilibration was repeated three times. The *F. x bohémica* 2 extract (100 ml) concentrated at 10 mg ml⁻¹ in water/methanol mixture (50/50; v/v) was added to the equilibrate sephadex LH 20. The suspension was stirring 3 min and place in a 100 ml sintered glass funnel. The sephadex LH 20 was washed with 95% ethanol until the absorbance at 280 nm of the eluate approach zero. Then, the sephadex LH 20 was washed with acetone 50% (water/acetone; 50/50; v/v) until the sephadex LH 20 was white and the eluate colorless. The acetone 50% eluate was rotary evaporated and concentrated in pure water at 10 mg ml⁻¹ for following experiments.

7. BDI ability of major compounds encountered in *Fallopia* extracts

Catechin, epicatechin, piceid, resveratrol, emodin and physcion identified by Bardon *et al.* (2014) as major monomers from *Fallopia* extracts were tested synergistically to evaluate their BDI ability. From commercial pure products (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) all these compounds were prepared respecting the concentrations measured in *Fallopia* spp. extracts (*i.e.* 0.0037 mg ml⁻¹ catechin, 0.0057 mg ml⁻¹ epicatechin, 0.022 mg ml⁻¹ piceid, 0.0007 mg ml⁻¹ resveratrol, 0.0015 mg ml⁻¹ emodin and 0.0047 mg ml⁻¹ physcion; final in media) and the effect on the denitrification activity of *P. brassicacearum* was measured as described above for crude extracts. The same thing was done to evaluate the effect of procyanidins on aerobic respiration and denitrification of *P. brassicacearum* and *B. cereus*, using purified procyanidins from *Fallopia* or commercial procyanidins purified from grape seed (Laffort, Bordeaux, France) concentrated at 0.1, 0.05, 0.01 mg ml⁻¹ or pure water as a control.

8. Procyanidins effect on denitrifying soil communities

To test the BDI of procyanidins on complex soil denitrifying communities an extent amount of procyanidins are needed. For this reason commercial grape seed procyanidins with the same chemical structure than *Fallopia* procyanidins (Gabetta *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003) were used. Soils samples at the site Ain 11 (45°57'53"N; 5°15'25"E) and Ain 6 (45°48'15"N; 5°10'29"E) were harvested in November 2013 and sieved at 2 mm. The rate of denitrification was measured by N₂O emission every 2 h between 24 h and 30 h in anaerobic condition with a gas chromatograph coupled to a micro catharometer detector (µGC-R3000, SRA instruments, Marcy l'Etoile, France). One g of soil was placed in plasma flasks sealed by a rubber stopper. To ensure anaerobic conditions air was removed and replaced by a He/C₂H₂ mixture (90/10 v/v). Samples were suspended in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 (NaH₂PO₄ and NaHPO₄) supplemented with glutamic acid (0.5mg of C-glutamic acid.ml⁻¹), glucose (0.5mg of C-glucose.ml⁻¹) and KNO₃ (20 mM). Effect of grape seed procyanidins on denitrification rate was measured at 2.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 and 0.01mg ml⁻¹ by adding procyanidins, or water for the control, to the soil suspension. Slurries were kept at 28° C and shaken at 140 rpm during all the experiment. All measures were done in 4 replicates.

9. Data and statistical analyses

To test the effect of *Fallopia* spp. extracts on the aerobic respiration, and the denitrification of *P. brassicacearum* and *B. cereus*, a three-way ANOVA was performed with strain, extract and the interactions of strain, extract and oxygen status as co-factors. To test the protein

capacity, the antioxidant capacity and measure differences in procyanidins amounts of *Fallopia* spp. extracts three one-way ANOVA were performed with extracts as factors. To test correlations of denitrification and aerobic respiration with 3 characteristics of *Fallopia* extracts (the estimated concentration of proanthocyanidins in *Fallopia* extracts, their protein precipitation capacity and their antioxidant capacity), two three-way ANCOVA were performed with strain, and individual characteristics of fallopian extracts and the interaction of these two terms as co-factors. To test the concentration effect of *F. x bohemica* 2 purified procyanidins on the aerobic respiration and the denitrification a three-way ANCOVA was performed with strain, concentration of purified procyanidins and the interactions of strain, concentration of purified procyanidins and oxygen status as co-factors. To test the effect of grape seed procyanidins on aerobic and denitrification of the two denitrifying bacteria a two-way ANOVA was performed with strain, extract and the interactions of strain, grape seed procyanidins and oxygen status as co-factors. For statistical analyses with strains the oxygen status alone as factor was omitted because we normalised aerobic respiration and denitrification results by bacterial strain for each oxygen status (*i.e.* aerobic and anaerobic). To test the BDI capacity of grape seed procyanidins in the two soils we performed a two-way ANOVA with soil, concentration of grape seed procyanidins and interaction between these two terms as co-factors.

Significant differences were determined using Tukey's HSD post-hoc test.

Data were log-transformed to ensure data normality when it was necessary. All analyses were performed using the r project software (R Development Core Team, 2008).

II. Results

1. Effect of *Fallopia* extracts on respiration of Gram positive and Gram negative denitrifying bacteria

For Gram-negative (*P. brassicacearum*) and Gram-positive (*B. cereus*) bacteria, aerobic respiration and denitrification were significantly inhibited by *Fallopia* extracts, up to 50% for the aerobic respiration and up to 95% for the denitrification (Fig. 26). For the two strains denitrification was significantly more reduced by extracts than aerobic respiration (Table 3). No significant different effects were found between genotype extracts on the denitrification (Fig. 26; Table 3). For *P. brassicacearum*, the aerobic respiration was significantly more affected by *F. x bohemica* 2 than others (Fig. 26; Table 3). For *B. cereus* the aerobic

respiration was significantly less affected by *F. x bohemica* 1 and 2 than others (Fig. 26; Table 3).

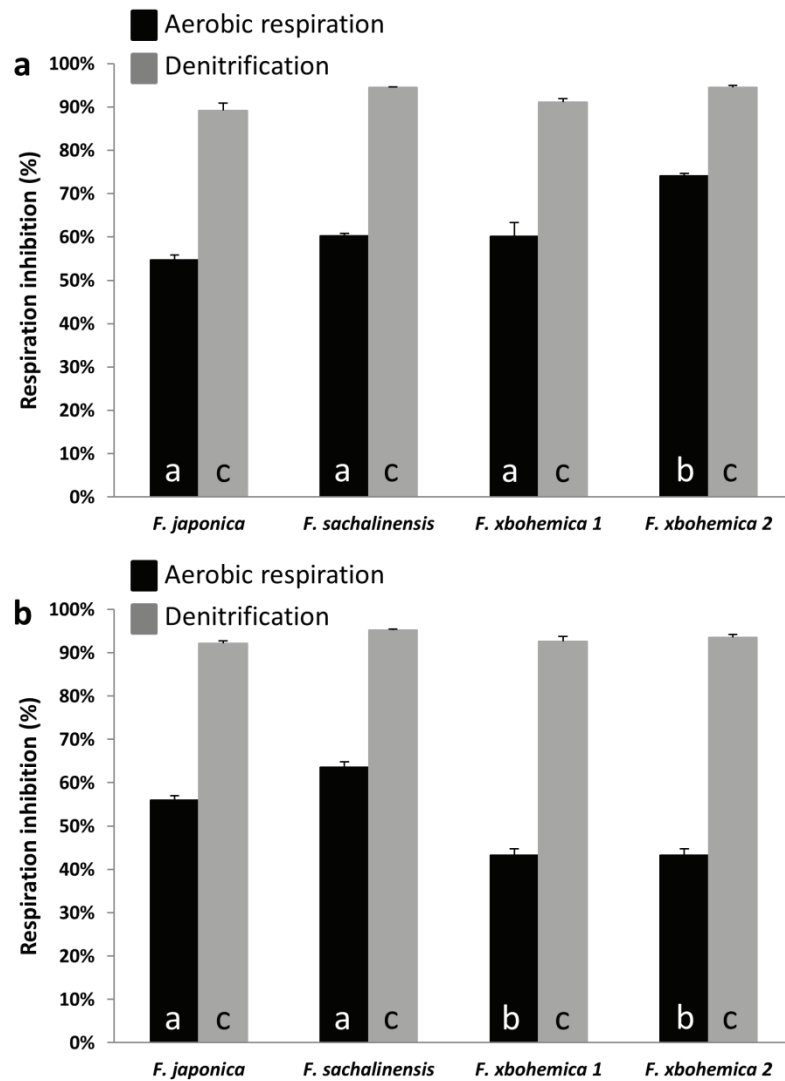


Figure 26: Percent of inhibition effects of *Fallopija* spp. extracts on aerobic respiration (black) and denitrification (grey) of a) *Pseudomonas brassicacearum* and b) *Bacillus cereus*. Letters show which means differed between treatments (Tukey's test; $\alpha < 0.05$). Vertical bars indicate standard errors. See table 3 for statistical analyses.

Figure 3: Three-way ANOVA on the respiration inhibition effect under aerobic and anaerobic conditions of *Fallopia* spp. extracts on *Pseudomonas brassicacearum* and *Bacillus cereus*. See Figure 1 for graphical representation.

	<i>Df</i>	Respiration inhibition	
		<i>F-value</i>	<i>P-value</i>
R²= 0.99			
Strain	1	16.28	<0.001***
Extracts	4	950.95	<0.001***
Strain x extracts	4	12.98	<0.001***
Strain x Condition	1	218.817	<0.001***
Extracts x Condition	4	23.57	<0.001***
Strain x Concentration x Condition	4	10.37	<0.001***

2. Estimated concentration of proanthocyanidins in *Fallopia* extracts and *Fallopia* extract properties

The four *Fallopia* extracts exhibited different amounts of proanthocyanidins (*i.e.* procyanidins and prodelfhinidins) (Fig. 27a). *F. sachalinensis* contained a significantly higher proportion of proanthocyanidins (*i.e.* 86% of extracted dry matter) than three other extracts (between 15 to 21 %).

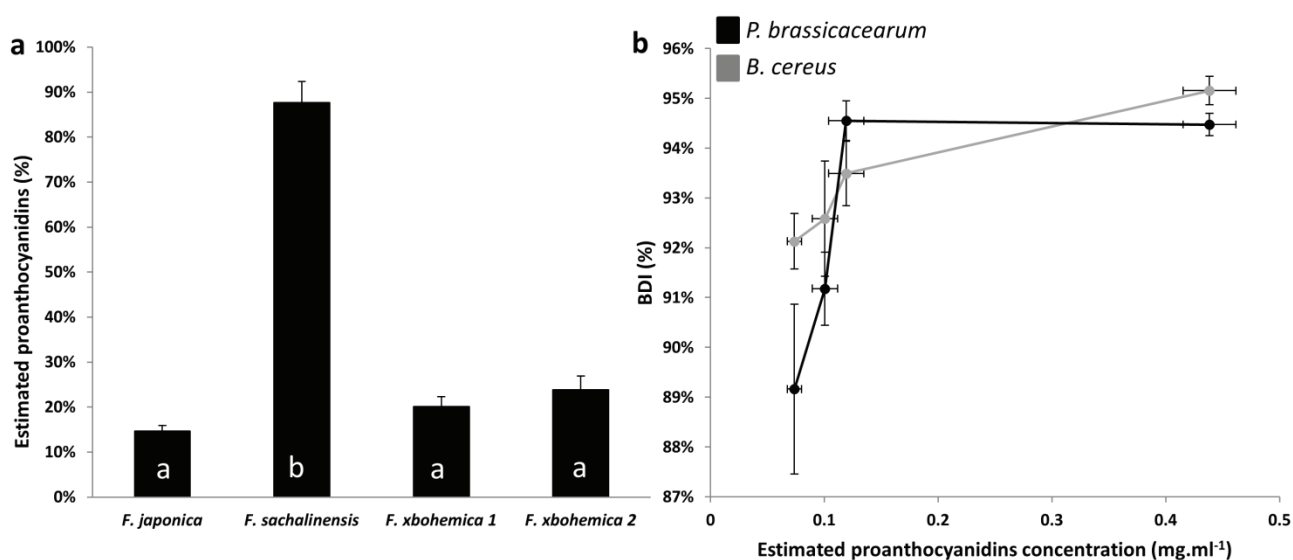


Figure 27: a) Percent of estimated proanthocyanidins in *Fallopia* spp. extracts and b) percent of BDI for *Pseudomonas brassicacearum* (black) and *Bacillus cereus* (grey) in function of the estimated concentration of proanthocyanidins contained in *Fallopia* spp. extracts. Letters show which means differed between treatments (Tukey's test; $\alpha < 0.05$). Bars indicate standard errors. See table 4 for statistical analyses.

Fallopia spp. extracts had different protein precipitation capacity and antioxidant capacity (Fig. 28). *F. sachalinensis* and *F. xbohemica 2* showed the higher precipitation capacities and

F. japonica and *F. xbohemica* 1 the lower. *F. sachalinensis* extract exhibit the lower (43%) antioxidant capacity while others extracts, *F. japonica*, *F. x bohemica* 1 and *F. x bohemica* 2, the higher (68 to 83%).

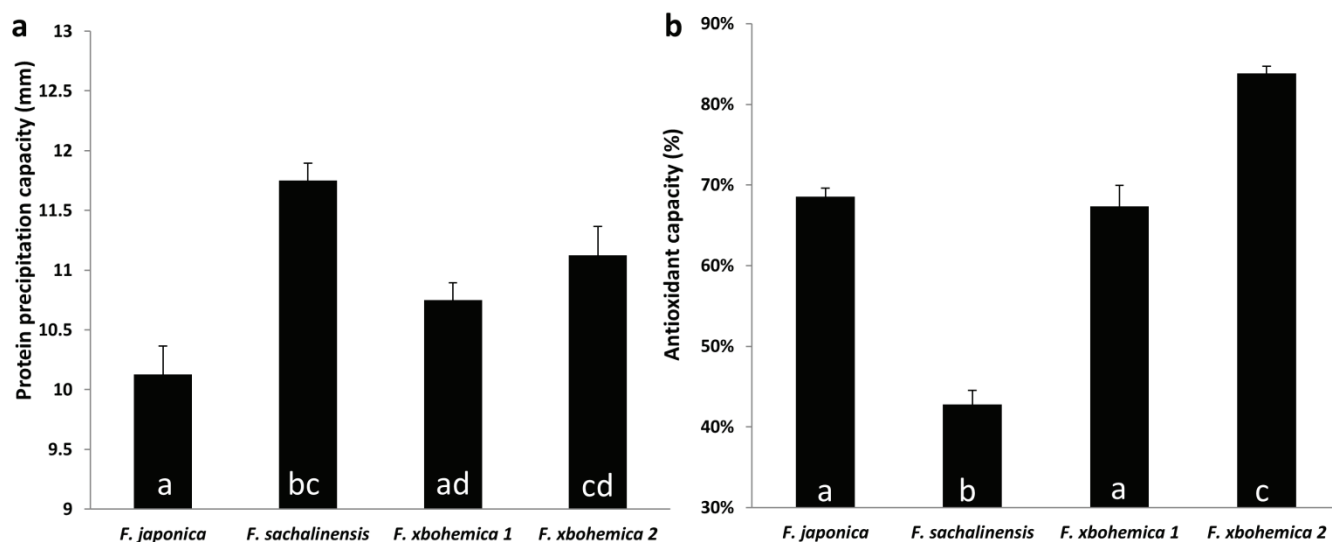


Figure 28: Properties of *Fallopiia* spp. extracts a) protein precipitation capacity and b) free-radical quenching capacity. Letters show which means differed between treatments (Tukey's test; $\alpha < 0.05$). Vertical bars indicate standard errors. See table 4 for statistical analyses.

3. Correlations between aerobic respiration or denitrification inhibitions and the estimated concentration of proanthocyanidins in *Fallopiia* extracts and *Fallopiia* extract properties

Aerobic respiration and particularly denitrification inhibition by *Fallopiia* extracts were correlated to the proanthocyanidin (*i.e.* procyanidins and prodelphinidins) concentration estimated in the four extracts for the two denitrifying bacteria (Fig. 27b; Table 4). The denitrification inhibition by *Fallopiia* extracts was correlated with the protein precipitation capacity but not with the antioxidant capacity (Table 4). Aerobic respiration inhibition by *Fallopiia* extracts was not correlated with the antioxidant capacity but almost correlated with the protein precipitation capacity ($p\text{-value} = 0.08456$) (Table 4).

Table 43: Three-way ANCOVAs on the denitrification inhibition and the aerobic respiration inhibition of *Fallopia* spp. extracts on *Pseudomonas brassicacearum* and *Bacillus cereus* in function of strains, protein precipitation capacity or antioxidant capacity or proanthocyanidins concentration. See Figure 27 and 28 for graphical representation.

		Df	BDI (%)		Aerobic respiration (%)	
			<i>F-value</i>	<i>P-value</i>	<i>F-value</i>	<i>P-value</i>
Protein precipitation capacity			R²=0.31		R²=0.37	
Strain		1	1.772	0.1938	12.9172	<0.01**
Protein precipitation		1	10.0301	<0.01**	3.1980	0.08456
Strain x Protein precipitation		1	0.7938	0.3805	0.0232	0.8801
Antioxidant capacity			R²=0.08		R²=0.61	
Strain		1	1.3419	0.2565	21.4646	<0.001***
Antioxidant		1	1.14175	0.2932	1.7257	0.1996
Strain x Antioxidant		1	1.2526	0.6192	22.1549	<0.001***
Estimated Proanthocyanidins			R²=0.37		R²=0.44	
Strain		1	1.9358	0.17508	14.8739	<0.001***
log(Proanthocyanidins)		1	14.1709	<0.001***	4.7285	<0.05*
Strain	x					
log(Proanthocyanidins)		1	0.2415	0.6269	3.2223	0.08345

4. Identification of proanthocyanidins encountered in *Fallopia* extracts and effects of identified and purified compounds on denitrifying bacteria

Proanthocyanidins (*i.e.* procyanidins and prodelphinidins) detected by UHPLC in *Fallopia* extracts were B-type procyanidins ranging from the dimeric to the tetrameric polymerization of catechin and epicatechin characterized by a maximal absorbance at 278 nm and major masses of 291.08, 579.15, 867.21 and 1155.27 g mol⁻¹ (Fig. 29 and S1). They were encountered between 4 min and 18 min of elution. Characteristics positive ESI mass spectra of the different forms are presented in supplementary (Fig. S1).

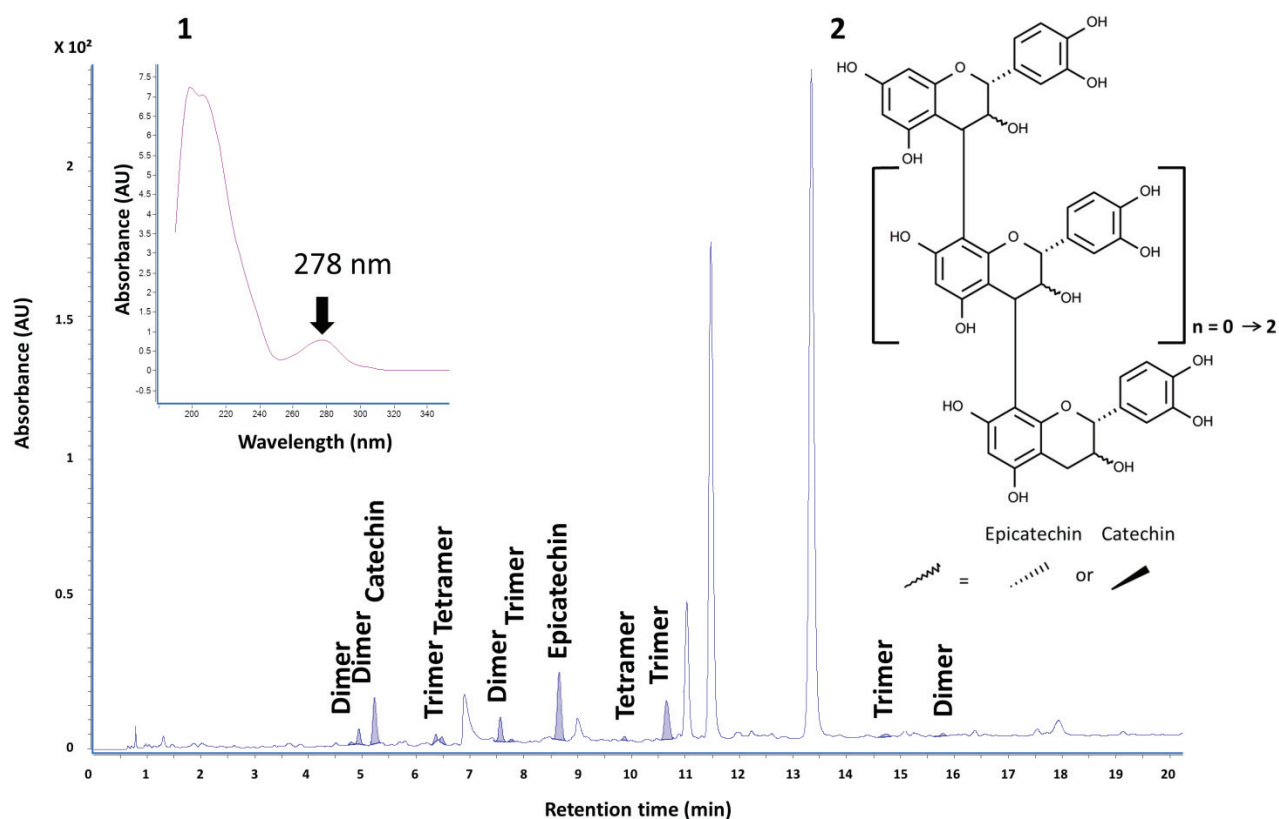


Figure 29: UV chromatograms observed at 280 nm of the *F. x bohémica 2* extract presenting procyanidins and their monomer detected, their UV spectrum (1) and their chemical structure (2). See figure S1 for ESI mass spectra of the different procyanidic polymeres.

Denitrification of *P. brassicacearum* was not inhibited by a mixture of major monomeric compounds (catechin, epicatechin, piceid, resveratrol, emodin and physcion), encountered in *Fallopia* extracts (Fig. S2). Whereas purified procyanidins from *F. x bohémica 2* extract significantly inhibited aerobic respiration and denitrification of *P. brassicacearum* and *B. cereus* (Fig. 30; Table 5). For the two strains, inhibition was dose dependent and denitrification was significantly more affected (up to 80%) than aerobic respiration (50% max) (Fig. 30). Denitrification of the 2 strains was significantly inhibited (25 and 45%) for a concentration of 0.01 mg ml^{-1} (Fig. 30; Table 5). Aerobic respiration was significantly inhibited of 15% for a concentration of 0.01 mg ml^{-1} (for *B. cereus*) and 0.05 mg ml^{-1} (for *P. brassicacearum*) (Fig. 30; Table 5).

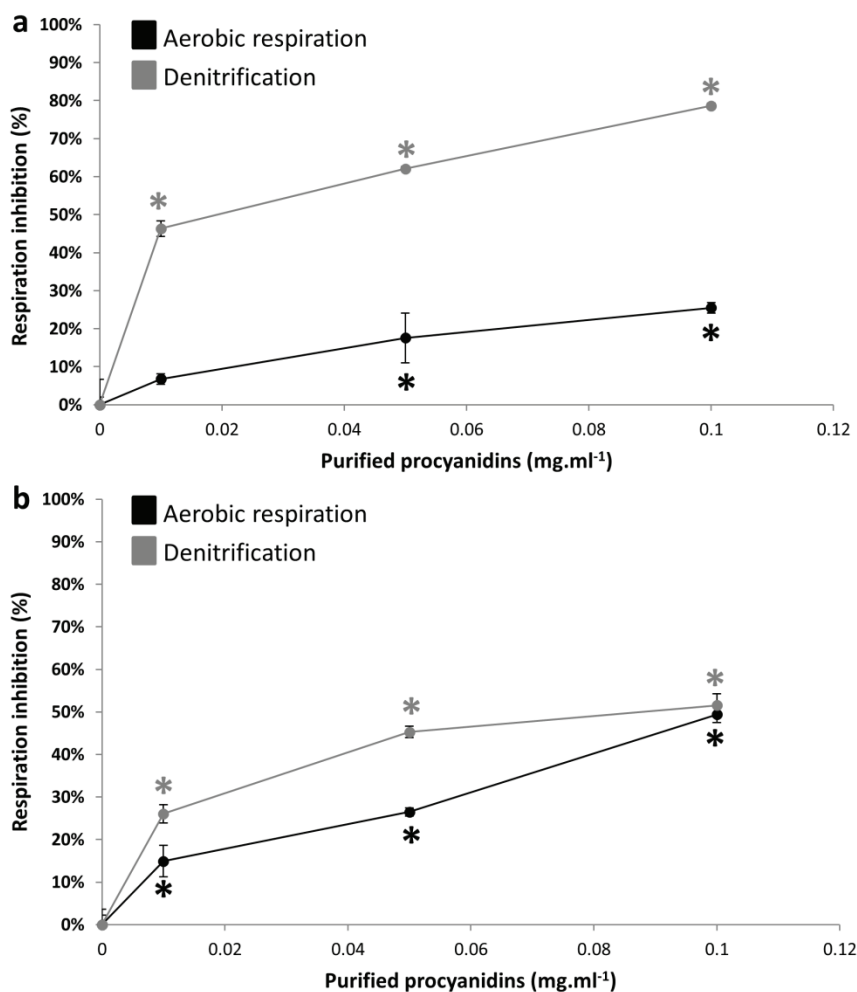


Figure 30: Percent inhibition (relative to control) of aerobic respiration (black) and denitrification (grey) of increasing concentrations of *Fallopia x bohemica* purified proanthocyanidins on a) the Gram negative bacteria *P. brassicacearum* and b) *B. cereus*, gram positive. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

Table 5: Three-way ANCOVA on the respiration inhibition effect under aerobic and anaerobic conditions of increasing concentration of *Fallopia x bohemica* 2 purified proanthocyanidins on *Pseudomonas brassicacearum* and *Bacillus cereus*. See Figure 30 for graphical representation.

	Df	Respiration inhibition	
		F-value	P-value
R²= 0.81			
Strain	1	0.89	0.35
Concentration	1	149.87	<0.001***
Strain x Condition	2	36.88	<0.001***
Strain x Concentration	1	0.069	0.79
Concentration x Condition	1	7.22	<0.01**
Strain x Concentration x Condition	1	7.31	<0.01**

5. Effect of grape seed procyanidins on denitrifying bacteria in pure culture or in soil communities

Aerobic respiration and denitrification of *P. brassicacearum* and *B. cereus* was significantly inhibited by grape seed procyanidins (Fig.S3). Activities of *P. brassicacearum* were more affected by these procyanidins than ones of *B. cereus*. For the two strains, denitrification was more reduced (50 to 78% of inhibition) than aerobic respiration (25 to 42% of inhibition) (Fig. S3).

The rate of denitrification of the two soils was inhibited by grape seed procyanidins (Fig. 31; Table 6). Inhibition was dose dependent and maximal inhibition reached at 0.5 mg ml⁻¹ for Ain11 and 1 mg ml⁻¹ for Ain6 (Fig. 31; Table 6). The maximal inhibition effect is about 85% for Ain11 and 80 % for Ain6 (Fig. 31). The lowest significant inhibition effect was measure for procyanidins concentrated at 0.01 mg ml⁻¹ for the two soils (Fig. 31).

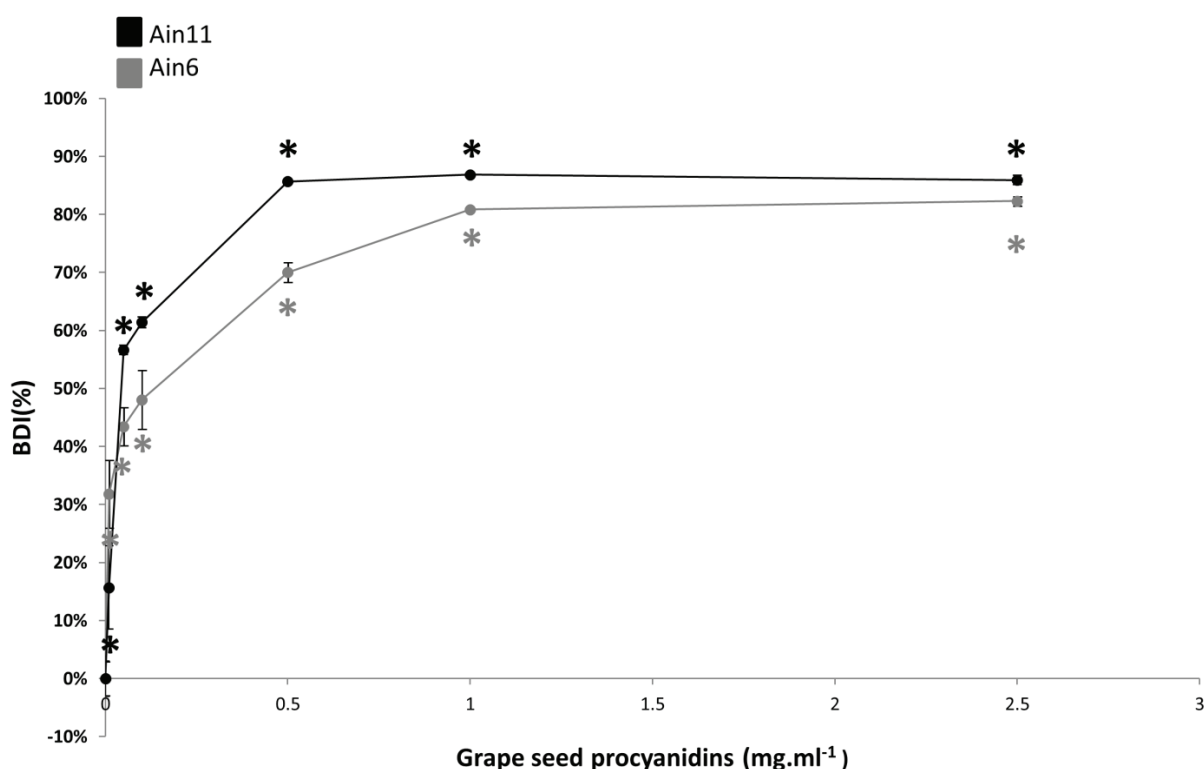


Figure 31: Percent of denitrification inhibition of increasing concentrations of grape seed proanthocyanidins on soils, Ain11 (black) and Ain6 (grey). Vertical bars indicate standard errors. See table 5 for statistical analyses. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

Table 5: Three-way ANCOVA on the respiration inhibition effect under aerobic and anaerobic conditions of increasing concentration of *Fallopia xbohemica* 2 purified proanthocyanidins on *Pseudomonas brassicacearum* and *Bacillus cereus*. See Figure 30 for graphical representation.

	Df	BDI (%)	
		F-value	P-value
R²= 0.43			
Soil	1	0.62	0.43
Concentration	1	36.29	< 0.001 ***
Soil xConcentration	1	0.01	0.92

III. Discussion

Here, we report the identity and the nature of the major denitrification inhibitors in *Fallopia* spp. (*i.e* the B-type procyanidins from the class of proanthocyanidins from the family of flavonoids) and that it can target both Gram-negative and Gram-positive bacteria in growth medium. We showed the effectiveness of these molecules of suppressing soil denitrification at low concentrations.

1. Biological denitrification inhibition of Gram-negative and Gram-positive bacteria by *Fallopia* extracts

In a previous study, Bardon *et al.* (2014) demonstrated that *Fallopia* extracts were able to suppress denitrification of a large panel of Gram-negative denitrifying bacteria. Our results demonstrated that denitrification of Gram-positive (*i.e.* *B. cereus*) bacteria could also be inhibited by *Fallopia* extracts and as demonstrated by Bardon *et al.* (2014) on Gram-negative bacteria, denitrification inhibition on Gram-positive bacteria was higher than aerobic respiration inhibition (Table 1). These results suggest that *Fallopia* spp. may reduce denitrification by directly targeting the respiratory process and particularly the denitrification process both in Gram-negative and Gram-positive denitrifying bacteria (*i.e.* whatever the thickness of the peptidoglycan layer of the bacterial wall).

2. Putative molecules and mechanisms involved in inhibition of denitrification by compounds from *Fallopia* extracts

In our previous work (Bardon *et al.* 2014), we showed a correlation between catechin content and BDI. Antibacterial activity of catechin reported by Kajiya *et al.*, (2004) made it a good

candidate to the BDI. To clearly demonstrate involved compounds, catechin but also other major polyphenolic compounds found in *Fallopia* extracts (*i.e.* catechin, epicatechin, piceid, resveratrol, emodin and physcion) were tested in mixture and surprisingly no effect on the denitrification of the *P. brassicacearum* was observed. On another hand, the effects of *Fallopia* extracts on bacterial respirations were found to be correlated to the protein precipitation capacity of extracts and not to antioxidant properties, suggesting the involvement of compounds harboring a protein precipitation capacity. It is known that catechin doesn't show protein precipitation capacity in contrast to its polymeric form, the procyanidins (which belong to proanthocyanidins) (Hagerman, 1987). This, result exclude that catechin can be involved in the BDI of *Fallopia* spp. extracts and suggest that procyanidins could be involved. Moreover, the estimated concentration of proanthocyanidins in extracts correlated with the inhibition of the aerobic respiration and the denitrification of the two denitrifying bacteria made of these polymers a potential candidate to be involved in the BDI of *Fallopia* extracts.

3. B-type Procyanidins of *Fallopia* inhibit denitrification of bacteria

Our results showed that proanthocyanidins encountered in *Fallopia* extracts were B-type procyanidins. Purified procyanidins from *F. x bohémica* 2 inhibit denitrification and aerobic respiration of the two denitrifying bacteria. As for *Fallopia* extracts, denitrification inhibition was higher than aerobic respiration inhibition. Moreover, inhibition was dose dependent. These similar results between purified procyanidins and *Fallopia* extracts validated that B-type procyanidins were involved in BDI in *Fallopia* spp.. Xu *et al.* (2011) reported antimicrobial effect of B-type procyanidins on bacteria growth. However, effects were found for minimal inhibitory concentrations 20 fold higher than the lowest concentration inhibiting denitrification of the two strains in our study (*i.e.* 2 or 8 mg ml⁻¹ vs 0.1 mg ml⁻¹). That suggests that denitrification and thus denitrifying bacteria could be highly more sensitive than others bacteria to B-type procyanidins. Although it is difficult to compare BDI of *Fallopia* extracts and purified procyanidins on pure strains due to approximate estimation of procyanidins in extracts (using the n-butanol method for proanthocyanidins dosage), any synergic effects with others compounds cannot be excluded since BDI of purified procyanidins was lower than BDI of extracts.

Procyanidins identified have a low degree of polymerization, ranging from the dimeric to the tetrameric forms nevertheless procyanidins with higher polymerization are difficult to detect by UHPLC (Schofield *et al.*, 2001) and may exist in *Fallopia* extracts. In accordance with

(Dorenkott *et al.*, 2014) showing the polymerization degree can modify the activity of procyanidins, our result demonstrated that monomeric form had no effect on denitrification whereas polymeric forms reduced drastically denitrification. Even if we may not elude the presence of polymers higher than tetramers, we can supposed that only lower polymerized procyanidins were involved in the BDI of *Fallopia* spp. because, low polymerized procyanidins (\leq tetramers) are more available and soluble in water (Lazarus *et al.*, 1999) thus they may target more easily the biological membranes where denitrification process occurs than higher polymerized forms.

4. Procyanidins of grape seed induce similar effects on denitrifying strains and denitrification of soils

Grape seed procyanidins are able to inhibit denitrification and aerobic respiration of the two strains in our study. This result is not surprising as procyanidins encountered in grape seed have the same chemical structure than those encountered in *Fallopia* spp. roots (Gabetta *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003). Grape seed procyanidins inhibit potential denitrification of the two different soils studied up to 75-85%. This shows that different soils and complex denitrifying communities are sensitive to the procyanidins. The small difference of sensitivity observed between both soils at least for smaller concentrations suggests that i) bioavailability of procyanidins depends on soil properties and/or ii) this bioavailability depends of the soil microorganisms capacity to degrade procyanidins since it's a function harboring by some soil bacteria (Bhat *et al.*, 1998) iii) the sensitivity of denitrifiers can be modulate by the composition of denitrifying community. Several studies demonstrated a negative effect of mixture of proanthocyanidins (*i.e.* it could be procyanidins or prodelphinidins) in slurry on complex community with a reduction of N-mineralization and nitrification (Nierop *et al.*, 2006; Kraal *et al.*, 2009). However, concentration tested ranged from 20 to 200 fold higher than those with the maximal effect on denitrification in our study (*i.e.* 10 mg ml⁻¹) and effects on bacteria were found at least over 2 weeks (Nierop *et al.*, 2006; Kraal *et al.*, 2009). Moreover, no effect on the N-mineralization was found for concentration 20 fold higher than the lowest tested in our study (*i.e.* 1 mg ml⁻¹) over 22 days (Norris *et al.*, 2011). It suggests again that denitrification and thus denitrifying bacteria may be highly sensitive to procyanidins.

Interestingly, in a previous study Michalet *et al.* (2013) suggested the inhibition of denitrification by polyphenolic compounds exudated by *Eperua falcata*, a tropical tree of

French Guiana which is known to preferentially uptake NO_3^- (Schimann *et al.*, 2008). Monomeric forms of procyanidins (*i.e.* catechin and epicatechin) were identified in *E. falcata* (Royer *et al.*, 2010) which could be as in *Fallopia* an indicator of procyanidins presence. In the same way, lowbush blueberry (*i.e.* *Vaccinium angustifolium*) soils exhibits low potential denitrification (*i.e.* $0.5 \mu\text{g N.g}^{-1}$ of dry soil. h^{-1}) (Eaton & Patriquin, 1989) and roots from lowbush blueberries are known to produce procyanidins (Harris *et al.*, 2007). Thus, we can suppose that BDI by procyanidins may be a widespread but overlooked phenomenon in plants that produce procyanidins in their roots. Nevertheless, complementary studies are needed to validate this hypothesis.

Conclusion

More than the biological nitrification (BNI) and the biological N-mineralization inhibition, the biological denitrification inhibition (BDI) may limit gaseous N losses from soils by directly targeting the N_2O source. As for the biological nitrification (BNI) and the biological N-mineralization inhibition, the biological denitrification inhibition (BDI) may be considered in plant soil feedback theories (van der Putten *et al.*, 2013). Particularly in wetland and intensive agricultural systems, where denitrification is important, (Bremner & Blackmer, 1978; Bothe *et al.*, 2006) BDI may play an important role in limiting N losses and N_2O emission. This ability may participate in the high regenerative capacity and the high growth rate of *Fallopia* spp.. The isolation and the identification of compounds responsible for denitrification inhibition will facilitate the future studies on the understanding of involved mechanisms of the BDI and ecological consequences of such phenomenon. Moreover, such specific inhibitors of the nitrogen processes may open future applications for natural and agricultural ecosystems.

Acknowledgements

We thank CNRS EC2CO research program for providing fundings to the project “Teranotro”. Microbial activities were measured at the AME platform (UMR 5557) and the compounds analyses were done at the CESN platform (UMR5557).

Supplementary

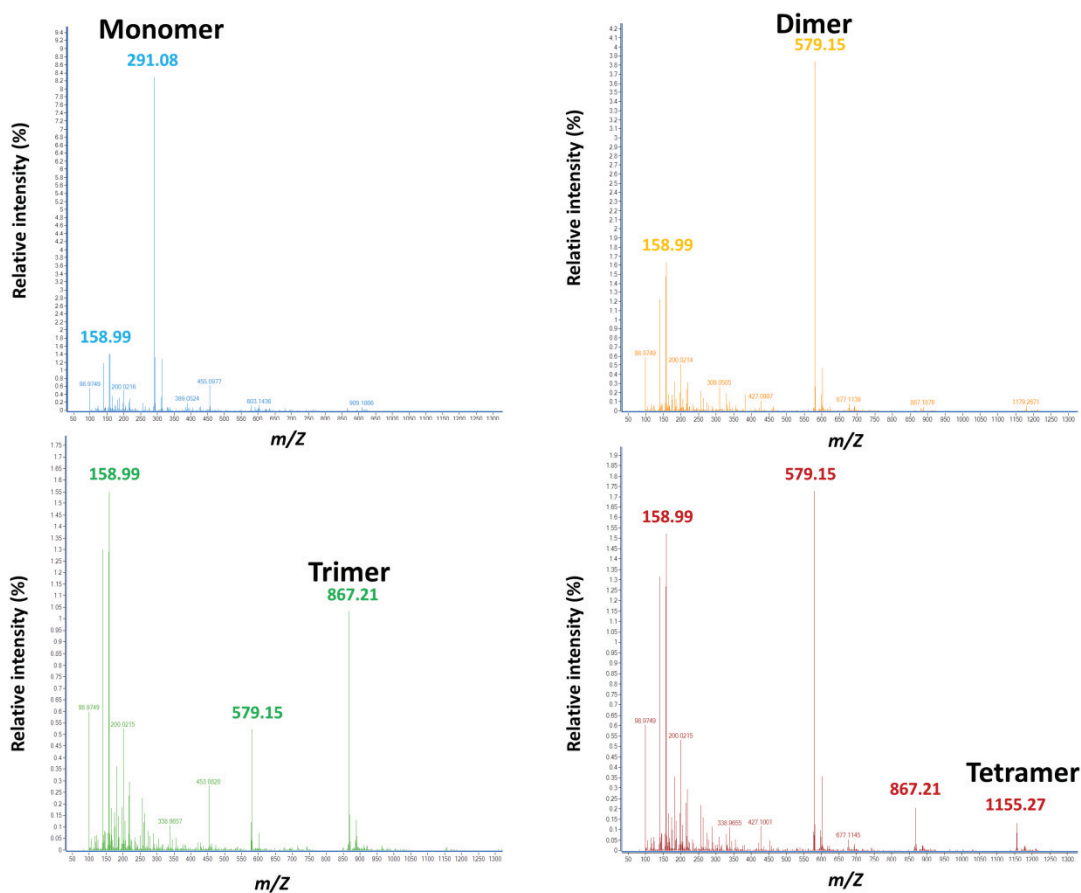


Figure S1: Positive ESI mass spectra of procyanidins encountered in *Fallopia* spp.. See figure 1 for chromatogram and chemical structure representation.

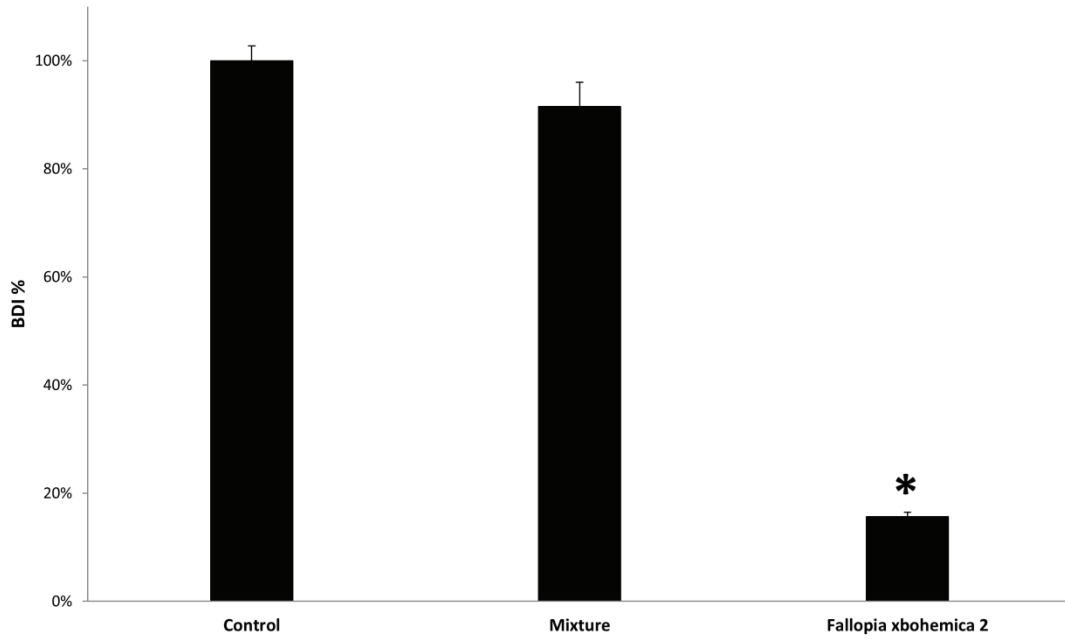


Figure S2: Percent inhibition (relative to control) of denitrification of mixture of major compounds encountered in *Fallopia spp.* and *Fallopia xbohemica 2* extracts on *P. brassicacearum*. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

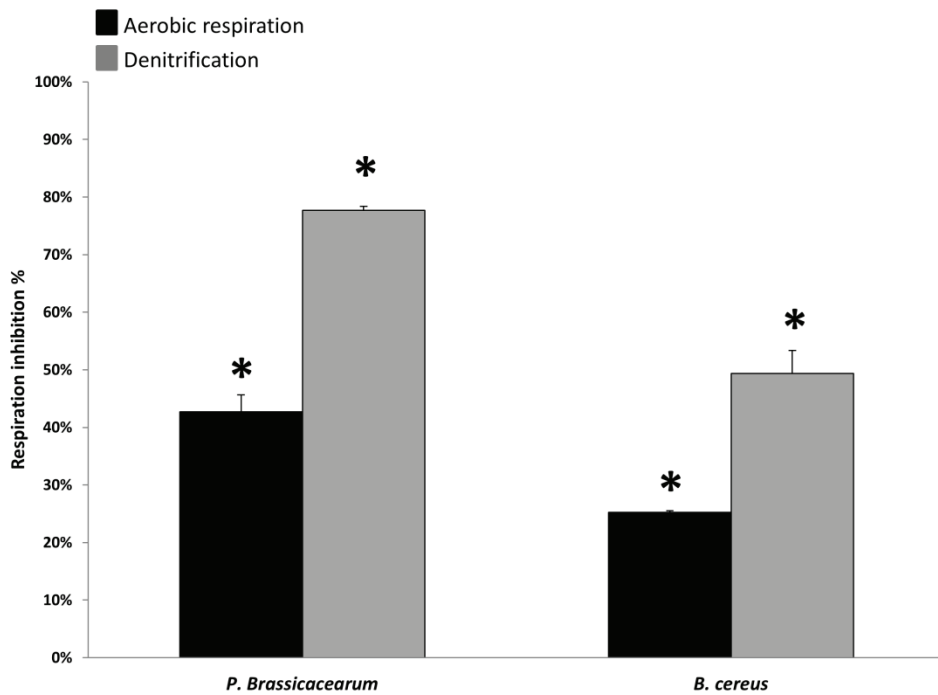


Figure S3: Percent inhibition (relative to control) of aerobic respiration (black) and denitrification (grey) of grape seed procyanidins on *P. brassicacearum* and *B. cereus*. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

**Partie 3 Quels sont les mécanismes impliqués dans la
régulation de la dénitrification par les procyanidines de
Fallopia spp.?**

**Procyanidins, indirect allosteric inhibitor of the membrane-bound
NO₃-reductase in biological denitrification inhibition (BDI).**

***Corresponding author:**

Feth-el-Zahar Haichar (F.Z. Haichar)

Tel : +33472431379

Email: zahar.haichar@univ-lyon1.fr

Summary:

- Recently, it has been demonstrated that procyanidins from *Fallopia* spp. inhibit the bacterial denitrification, a phenomenon called biological denitrification inhibition (BDI). However mechanisms involved in such a process remain unknown. Here, we investigate mechanisms of BDI through procyanidins with the strain model *Pseudomonas brassicacearum* NFM 421.
- The aerobic and the anaerobic (denitrification) respiration, the cell permeability and the cell viability of *P.brassicacearum* were determined in function of the procyanidins concentration. The effect of procyanidins on the bacterial membrane was observed by transmission electronic microscopy (TEM). Bacterial growth, denitrification, NO₃- and NO₂-reductase activity, the translation degree of sub-units of the NO₃- (*narG*) and the NO₂-reductase (*nirS*) under NO₃ or NO₂ were measured. The NO₃-reductase activity before and after cells lysis by sonication under procyanidins or not was measured.
- Procyanidins inhibited the denitrification process without affecting the aerobic respiration at low concentration. Procyanidins act by disturbing cell membranes but without affecting the cell viability and they specifically inhibit the NO₃- but not the NO₂-reductase. *P.brassicacearum* responds to procyanidins by an over-translation of the membrane-bound NO₃-reductase sub-unit (*narG*) but without modifying the translation of NO₂-reductase sub-unit (*nirS*) also involved in denitrification process.
- Our results suggest that procyanidins can specifically inhibit the membrane-bound NO₃-reductase inducing enzymatic conformational changes through the membrane disturbance. Our results, path the way through a better understanding of the BDI.

Keywords: Allosteric inhibition, biological denitrification inhibition, denitrification inhibitor, procyanidins, denitrifying bacteria, *Fallopia* spp..

Introduction

Microorganisms are everywhere (Schleifer, 2004) and probably the oldest and the closest plant neighbors (Trevors, 2002; Partida-Martinez & Heil, 2011). Since, plant with root appeared (*i.e.* 385million years ago), microorganisms and plant strongly coevolved and intimate interactions appeared (Brundrett, 2002). It is now well known that plant mediate interactions with microorganisms through root exudates (Haichar *et al.*, 2014) producing selective mixtures of substances shaping the soil microbial functioning (Hartmann *et al.*, 2009) .

A lot of studies on plant-microbes interactions focused on interactions related to the nitrogen (N) cycle (Chapman *et al.*, 2006). Indeed, N is often considered as the first limiting factor of plant growth in terrestrial ecosystems (Vitousek & Howarth, 1991b; LeBauer & Treseder, 2008) thus plant productivity mostly depends on processes of the N cycle which drive N forms and N availability for plants. Moreover, competition between microbes and plants for N acquisition is believed to be intense (Hodge *et al.*, 2000; Kuzyakov & Xu, 2013). Plant species impact on ecosystems N inputs and losses that can results in a positive feedback to plant (Knops *et al.*, 2002). Denitrification is a major way of N losses in terrestrial ecosystems (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011) thus plant productivity mostly depends on this process (van der Heijden *et al.*, 2008).

Denitrification is a biological reductive process which consist of the transformation of the water soluble NO_3 into the gaseous forms N_2O and/or N_2 (Zumft, 1997). This process is principally fulfilled by bacteria (Cheneby *et al.*, 1998) although it has been demonstrated that certain fungi (Laughlin & Stevens, 2002) and archeae (Philippot, 2002) were able to denitrify NO_3 . In this process bacteria use nitrogen oxides as alternative terminal electron acceptors in the respiratory chain instead of the oxygen when oxygen concentration is low or absent (Zumft, 1997). The bacterial denitrifying chain reaction is composed of five steps catalyzed by six enzymes (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006), the reduction of NO_3 by the cytoplasmic membrane-bound (Nar) or the periplasmic (Nap) nitrate-reductase into NO_2 , the reduction of NO_2 by the nitrite-reductase (Nir) into NO , the reduction of NO by the nitric oxide-reductase (Nor) into N_2O , and the reduction of N_2O into N_2 by the nitrous oxide-reductase (Nos) (Zumft, 1997; Both *et al.*, 2006). The first step principally fulfilled by the membrane-bound nitrate-reductase is considered as the initiate step of the denitrification and also the step that supply the more amount of energy to the cell (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). In

Proteobacteria, transport of NO₃ to the membrane-bound nitrate-reductase is carried out by two transmembrane proteins NarK1 and NarK2 which are present in a single operon with the *narGHJI* genes (Bothe *et al.*, 2006). NarK families of proteins belong to the major facilitators superfamily (MFS) of transmembrane transporters and are categorized as secondary transporters requiring the generation of a proton motive force (PMF) (Marger *et al.*, 1993). Genetic and biochemical experiments suggest that NarK1 acts as NO₃/H⁺ symport through which respiration could be initiated, while NarK2 is a NO₃/NO₂ antiporter which sustains steady-state respiration (Sharma *et al.*, 2006).

In a recent study, Bardon *et al.* (2014) demonstrated that the invasive complex species *Fallopia* spp. was able to inhibit the bacterial denitrification. This phenomenon termed as biological denitrification inhibition (BDI) may participate to the invasiveness of *Fallopia* spp. by limiting nitrogen losses (Bardon *et al.*, 2014) including the BDI in the plant-soil feedback theories (van der Putten *et al.*, 2013). Bardon *et al.* (Partie 2) demonstrated that denitrification inhibition results in the effect of procyanidins molecules on denitrifying bacteria, a class of polyphenol from the family of flavonoids and denitrifying bacteria were more sensitive to procyanidins in anaerobic condition where denitrification occurs than in aerobic condition. However, mechanisms involved in the BDI remain unknown.

It is known that certain polyphenols such as procyanidins have very strong affinity for the membrane and can disrupt cells membrane integrity contributing hence to their antibacterial activity (Kajiya *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). In addition, the weakening membrane integrity related to certain polyphenol may results in the partial disruption of critical transporters and general processes of the cell (Pometto *et al.*, 2005). Thus, in denitrifying bacteria, procyanidins could disrupt the NO₃ transport initiated by the NarK transport proteins on which strongly depends in anaerobic condition the membrane-bound nitrate-reductase activity or exhibit general antimicrobial effects through the disturbance of the PMF required for secondary transporters protein functioning (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006). It is also known that certain molecules from flavonoid family can induce or repress gene expression in bacteria (Cooper, 2007), hence procyanidins could generate specific repression of denitrifying gene expression. In contrast, while procyanidins have been reported, since a long time, to bind non-specifically to proteins and enzyme (Haslam, 1998; Miura *et al.*, 2008) indicating general inhibition properties of procyanidins on enzyme activities, recent reports by Ottaviani *et al.* (2006) and Miura *et al.* (2008) evidenced that procyanidins effect is relies on the specificity of protein-procyanidin chemical or physical

interaction highlighting specific inhibitory effect on enzyme activity and particularly at low concentration (Ottaviani *et al.*, 2006).

The most common mode of enzyme regulation results in conformational changes of the protein by binding an effector molecule in another site than the protein's active site (Purich, 2010). This regulation is called allosteric regulation and the site of the effector binding is termed the allosteric site (Lehninger *et al.*, 2005; Purich, 2010). Effectors that enhance the proteins activity are referred to as allosteric activators, whereas, those that decrease the protein's activity are called allosteric inhibitors (Goodey & Benkovic, 2008). Allosteric enzymatic inhibition through conformational form changes is characterized by a more sigmoid saturation curve rather than the hyperbolic curve shown in a classical Michaelis-Menten behavior without inhibitor (Lehninger *et al.*, 2005). In addition, enzymatic conformational changes can result from others factors than the direct effect of an allosteric modulator. It has been proved that physics factors such as, temperature and pH can affect protein conformational forms (Liu *et al.*, 1998; Fenton & Hutchinson, 2009). Thus, indirect factors may act as indirect allosteric inhibitor on enzyme activities, nevertheless, indirect inhibitory effect are often sought to be non-specific inhibitory factors.

In this study, we explored mechanisms involved in BDI by procyanidins from *Fallopia* spp. by testing four hypotheses on the model denitrifying bacteria *P. brassicacearum*; first, that procyanidins inhibit the denitrification through a general antimicrobial effect, secondly, that procyanidins inhibit denitrification through membrane permeabilization thwarting the NO₃ membrane transport or disturbing one or more enzymes of the denitrification chain, and finally that procyanidins inhibit denitrification through specific denitrification gene repression(s) .

I. Materials and Methods

1. Procyanidins purification

Roots extracts of *F. x bohemica* were prepared as in Bardon *et al.* (2014) and procyanidins were purified as in Bardon *et al.* (Partie 2).

2. Measurements of microbial activities

Aerobic respiration and denitrification measures were performed on *Pseudomonas brassicacearum* NFM421, a denitrifying bacterium frequently encountered in soils. Aerobic respiration and denitrification activity were measured by CO₂ and N₂O emission respectively under aerobic or anaerobic conditions every two hours for 4 days with a gas chromatograph coupled to a micro catharometer detector (μ GC-R3000, SRA instruments, Marcy l'Etoile, France). The strain was grown in NB medium (Nutrient Broth medium, Difco, Detroit, USA) supplemented with KNO₃ to reach 20 mM final. Measures were performed in plasma flasks sealed by a rubber stopper. To ensure anaerobic conditions air was removed and replaced by a He-C₂H₂ mixture (90/10 v/v). The addition of C₂H₂ allows the measurement of N₂O accumulation by inhibiting the transformation of N₂O to N₂ by *nosZ* gene. Incubations were done at 28°C without agitation. The strain was cultured in aerobic condition overnight in NB liquid medium supplemented with KNO₃ then centrifuged and suspended in the same medium. The volume of bacterial suspension was adjusted to have an Optical Density (O.D) = 0.1 at the beginning of the experiment. All measures were done in 4 replicates.

To determine the effect of procyanidins on aerobic respiration and denitrification, growth media were supplemented with purified procyanidins concentrated at 0.1, 0.01 and 0.05 mg ml⁻¹ final or water as a control.

3. Cell permeability and viability measurements

Cell permeability and viability measurements were done at the beginning of the respiration measurement experiment from 1 ml of cell suspensions or sterile media, 10 min after inoculation.

For cells permeability measurement, 1 μ l of propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, USA) concentrated at 1mg ml⁻¹ in water and 2.5 μ l of SYBR Green I (10 000 X) (Invitrogen, Carlsbad, USA) were added to the cell suspensions or sterile media. Cell suspensions were inversely shaken 20 min in the dark prior to analysis (Preliminary method development experiments on different proportions of heated cells corresponding to different proportion of permeabilized cells, showed no differences in the extent of PI staining with cells incubated between 10 and 30 min). Then, 150 μ l of stained cell suspensions were added twice in a micro-plate 96-well repeated to measure the propidium iodide (Excitation/Emission: 538 nm/617 nm) (staining cells with permeabilized membrane) and the SYBR Green I (Excitation/Emission: 497 nm/520 nm) emissions (staining all cells) using a

spectrofluorimeter SAFAS Xenius XC (SAFAS, Monaco). The ratio of the emission intensity 617 nm/520 nm was calculated for each bacterial suspension and sterile control, to give the proportion of permeabilized cells. Emission intensities for sterile control were negligible compared to cell suspensions. Means were calculated between two replicates.

For cells viability, cell suspensions were diluted at 10^{-6} in liquid NB medium and inoculated in two replicates on petri dishes containing solid NB medium supplemented with 10% agar (NA medium). Inoculation was carried out using the exponential dilution technology with easySpiral Dilute (Interscience, St Nom la Bretèche, France). Bacterial colonies were counted with the Scan 1200 (Interscience, St Nom la Bretèche, France). Means were calculated between two replicates.

4. Transmission electronic microscopy (TEM)

P. brassicacearum precultured cells were inoculated in NB liquid medium supplemented with 20 mM KNO_3 at the Optical Density (O.D) = 0.1 with procyanidins concentrated at 0, 0.1 and 0.01 mg ml^{-1} . After 1 h cells were fixed and stained according to Plee *et al.*(2010). Prior to staining, samples were centrifuged at 7500 rpm for 10 min and pellets were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (CB) at pH 7.4 and at room temperature for one hour, washed three times in CB, and post fixed in 1% osmium tetroxide in CB for one hour at room temperature. After three washes in CB, the material was embedded in 2.5% agarose and dehydrated before inclusion in Epon resin. Ultrathin sections (70 nm for electron microscopy) were cut on a Leica ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) using a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland), and then, transferred on to carbon-coated films on copper grids coated with Formvar films. Ultrathin sections were stained for one hour in uranyl acetate and in lead citrate for four minutes. TEM observations were performed with a Phillips CM120 (Philips, Amsterdam, Netherlands), and digital image processing was applied.

5. Cell Nitrate-reductase and Nitrite reductase activities

To determine the effect of procyanidins on the cell nitrate or nitrite reductase activity of *P. brassicacearum*, precultured cells of *P. brassicacearum* were grown in 20 ml of NB medium supplemented with KNO_3 (20 mM) or NaNO_2 (10 mM final) and procyanidins concentrated at 0.01 mg ml^{-1} final or water as a control. The experiments were performed in plasma flasks sealed by a rubber stopper and inoculated with of *P. brassicacearum* at O.D 0.1. To ensure anaerobic conditions air was removed as in denitrification measurement. Incubations were done at 28°C with agitation 140 r.p.m.. Growth, N_2O emission and enzymatic substrates (*i.e.*

NO₃ or NO₂) consumption were simultaneously followed by sampling 1 ml of the media at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 30 h, and by the measurement of the optical density at 600 nm, gas chromatography as for denitrification and ionic chromatography with a Dionex DX 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) respectively.

6. Free nitrate-reductase activity

To determine the effect of procyanidins on the free nitrate-reductase activity of *P. brassicacearum*, precultured cells of *P. brassicacearum* were lysed by ultra-sonication with a bioblock scientific 72442 vibra cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for 10s, three times. Lysed cells were added at the equivalent of 0.4 OD of non lysed cells to 20 ml of NB medium supplemented with 20 mM KNO₃ with procyanidins at 0.01 mg ml⁻¹ final or water as a control. The experiment was performed in plasma flasks sealed by a rubber stopper. To ensure anaerobic conditions air was removed as in denitrification measurement. Incubations were done at 28°C with agitation 140 rpm. The NO₃ consumption was followed by sampling 1 ml medium at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 30 h of culture by ionic chromatography with a Dionex DX 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

7. Measures of NO₃ reductase and NO₂ reductase genes translation

P. brassicacearum wild type strain harboring translational *narG*'- '*lacZ* or *nirS*'- '*lacZ* fusions were grown in 20 ml of NB medium supplemented with procyanidins concentrated at 0.01 mg ml⁻¹ final or water as a control and with KNO₃ (20 mM) or NaNO₂ (5 mM) respectively. Sampling of 2 ml media was performed after 4, 6, 8, 10 and 12h of culture. β -Galactosidase activities were quantified by the Miller method (Miller, 1972), using cells permeabilized with 5% (v/v) chloroform and 0.01% SDS. Values shown were derived from four independent experiments and are means with standard deviation.

8. Data and statistical analyses

The linear slopes of the different kinetics, relative to the mean of the linear slopes of the control (*i.e.* N₂O and CO₂ emitted, NO₃ and NO₂ consumption and O.D. at 600nm) were used for comparisons of procyanidins and control treatments and performed statistical analyses. To test the concentration effect of procyanidins on the percentage of inhibition relative to the control of the aerobic respiration and the denitrification of *P. brassicacearum*, a two-way ANCOVA was performed with the different procyanidins concentrations and the interaction of the procyanidins concentration and the oxygen status as co-factors. Oxygen status was omitted from the ANCOVA because we normalized aerobic respiration and denitrification

(CO₂ or N₂O emitted) results by the control for each oxygen status (*i.e.* aerobic and anaerobic conditions). To test the effect of procyanidins on genes translation three two-way ANCOVA were performed with the treatment (procyanidins and control), the time and the interaction of the treatment and the time as-cofactor. Significant differences were determined using Tukey's HSD post-hoc test.

To test the effect of procyanidins on the permeability and the viability of *P. brassicacearum*, two linear regressions were performed between these two variables and the procyanidins concentration.

The effects of procyanidins on the bacterial growth rate, the denitrification activity (N₂O accumulation), the cell NO₃ and NO₂ reductase inhibition and the free NO₃ reductase were tested by comparing the inhibition relative to the control with one way ANOVAs with procyanidins as factor. To test the effect of ultrasonication on the NO₃-reductase activity we performed a one way ANOVA with ultrasonication as factor.

For the cell enzymatic substrate saturation curves (NO₃ and NO₂ reductase) the rates of substrate consumption between every three following times during each kinetics were calculated and normalized by the O.D. 600 nm measured at the intermediary time (=Enzyme velocity). For NO₃-reductase substrate saturation curves after ultrasonication the rates of NO₃ consumption between every three times sampling were calculated and normalized by the O.D. 600nm = 0.4 corresponding to cell lysed (=Enzyme velocity).

$$\text{Enzyme velocity} = (\text{NO}_3 \text{ consumption rate})_{[t: t+4]} / \text{O.D.}_{t+2}$$

where: t is the considered time

For each saturation curve the enzyme velocity was plotted in function of the substrate concentration measured at the corresponding second times. Parameters of the enzymatic substrate saturation curves with or without procyanidins were estimated by the non-linear least squares method according to the Michaelis-Menten and the Hill equation, using the nls function according to Reeve & Turner (2013). The Michaelis-Menten and the Hill equations correspond to:

$$\text{Velocity} = (V_{\max} \times [S]^n) / (K_d^n + [S]^n)$$

Where $[S]$ = the substrate concentration; V_{\max} = the maximal enzymatic velocity; K_d = the substrate concentration for the $V_{\max} / 2$ and $1/K_d$ correspond to the affinity of the enzyme for its substrate; n = the Hill coefficient

For the Michaelis-Menten model: $n= 1$, and the K_d correspond to the K_m

The relevance of the Michaelis-Menten or the Hill saturation curves fitted were compared using the Akaike criterion between models and the more relevant model was selected according to the lowest Akaike criterion.

All analyses were performed using R project software (R Development Core Team, 2008) and the “nlstools” package.

II. Results

1. Effect of procyanidins on aerobic respiration and denitrification of *Pseudomonas brassicacearum*

The aerobic respiration and denitrification were significantly and dose dependent inhibited by procyanidins (Fig. 32, Table 4). In *P. brassicacearum*, denitrification was more inhibited than aerobic respiration. Indeed, at 0.05 mg.ml^{-1} of procyanidins, aerobic respiration is inhibited at 20%, whereas, denitrification inhibition is about 65%. Denitrification was significantly inhibited for the three concentrations tested (Fig. 32, Table 4). However, aerobic respiration was not significantly inhibited at 0.01 mg. ml^{-1} although denitrification is inhibited at 45 % (Fig. 32, Table 4).

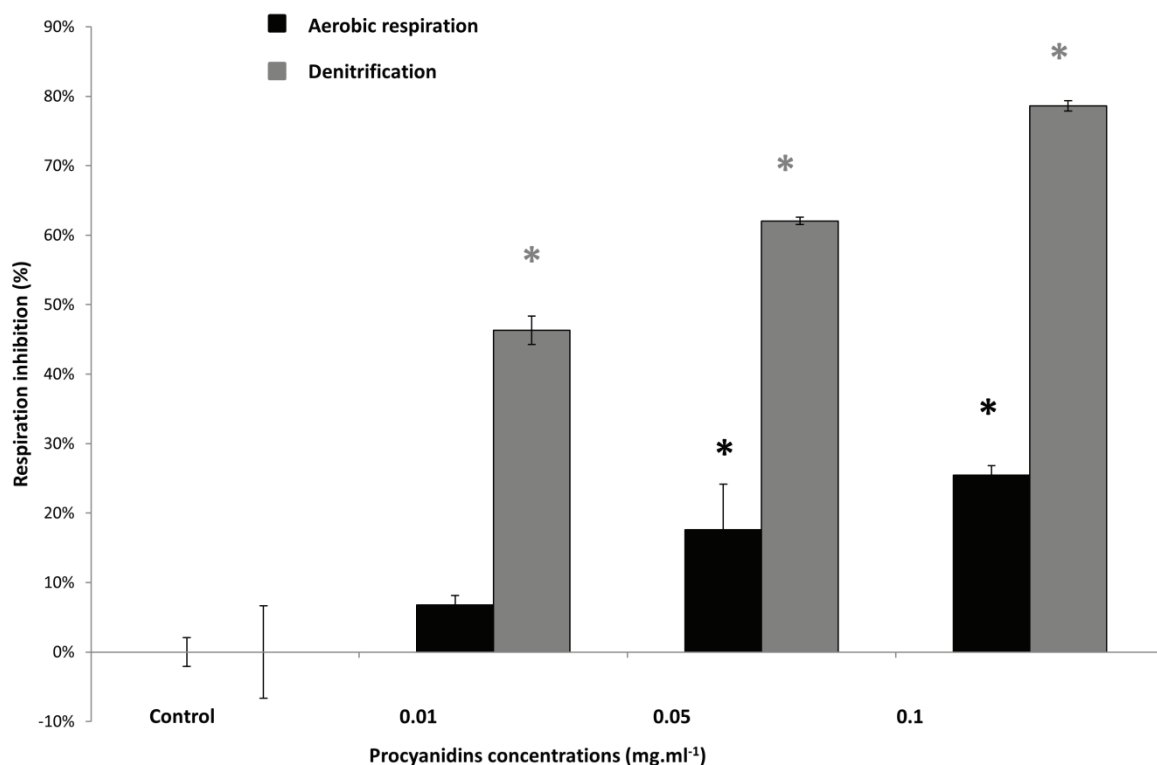


Figure 32: Percent inhibition (relative to control) of aerobic respiration (black) and denitrification (grey) of increasing concentrations of procyanidins on *P. brassicacearum*. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$). See Table 1 for statistical analyses.

Table 4: Two-way ANCOVA on the respiration inhibition (aerobic respiration and denitrification) of procyanidins on *P. brassicacearum* with the procyanidins concentration and interaction between procyanidins concentration and condition as factors. F-values and significance level (significance: * P-value < 0.05; ** P-value < 0.01 and *** P-value < 0.001). See Figure 32 for graphical representation.

Respiration inhibition		
$R^2 = 0.954$		
	F-values	P-values
Concentration	79.605	<0.001***
Concentration x condition	63.557	<0.001***

2. Effect of procyanidins on cell membrane permeability and cell viability

Procyanidins dose-dependently permeabilized *P. brassicacearum* cells but did not affect the cell viability (Fig. 33a and 33b). Above 0.05 mg.ml⁻¹ of procyanidins, membrane permeability was affected, where, cell viability was not by comparison to the control (Fig. 33).

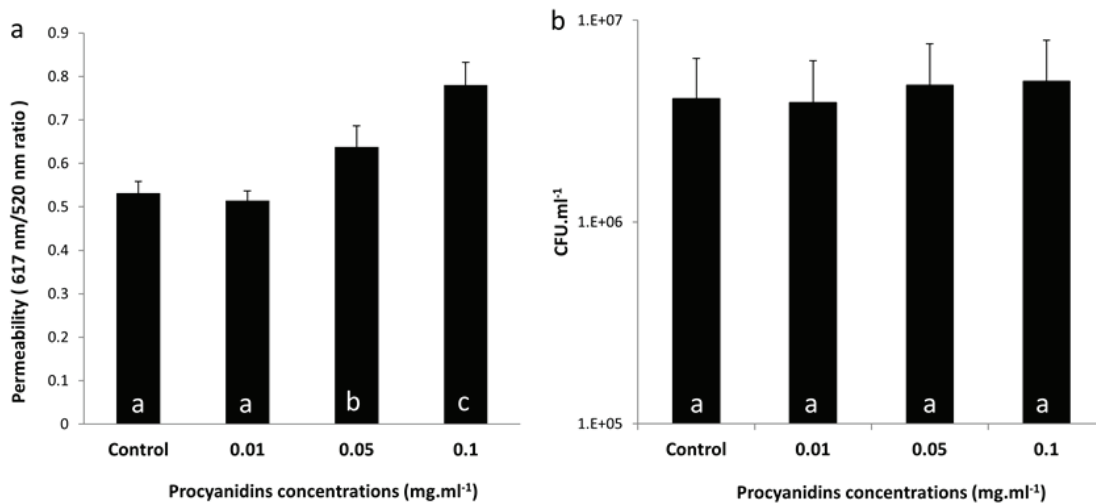


Figure 33: Proportion of cells with permeabilized membrane (a) and colony forming unit (b) of on *P. brassicacearum* at increasing concentrations of proancyanidins. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

Transmission electron microscopy shows that procyanidins at 0.01 and 0.1 mg ml⁻¹ disturb the membranes of *P. brassicacearum* by the formation of membrane vesicles on the cell surface (Fig. 34). Although, we didn't show a significant permeabilization of cell membrane by the lowest procyanidins concentration (0.01 mg.ml⁻¹) (Fig. 33a), the vesicles observed on the cell surface by transmission electron microscopy showed that the cell membrane was disturbed (Fig. 34).

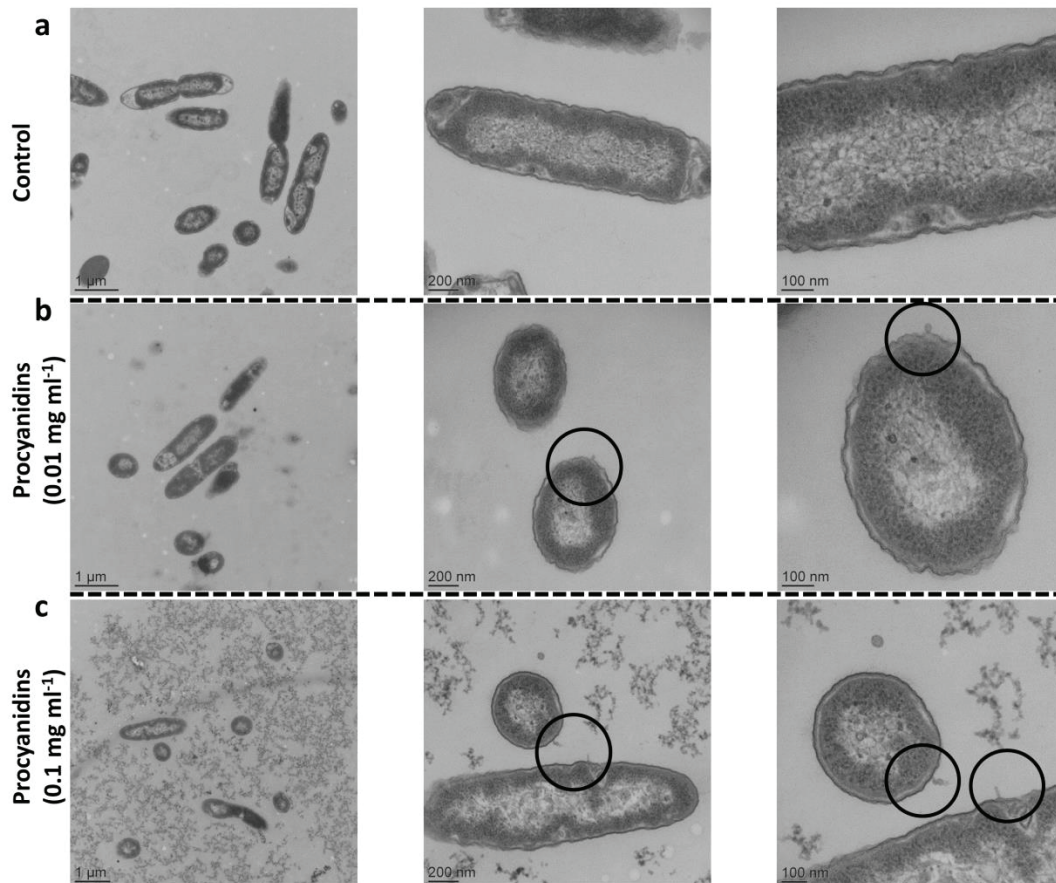


Figure 34: Transmission electron microscopy micrographs of *P. brassicacearum* culture treated with a) 0, b) 0.01 or c) 0.1 mg ml⁻¹ of procyanidins.

3. Effect of procyanidins on cell NO₃-reductase and NO₂-reductase

Procyanidins concentrated at 0.01 mg.ml⁻¹ significantly inhibited the bacterial growth, the denitrification and the NO₃-reductase activity of *P. brassicacearum* grown in anaerobic condition with NO₃ as terminal electron acceptor (Fig. 35). Procyanidins concentrated at 0.01 mg.ml⁻¹ did not significantly inhibit the bacterial growth, the denitrification and the NO₂-reductase activity of *P. brassicacearum* grown in anaerobic condition with NO₂ as terminal electron acceptor (Fig. 35).

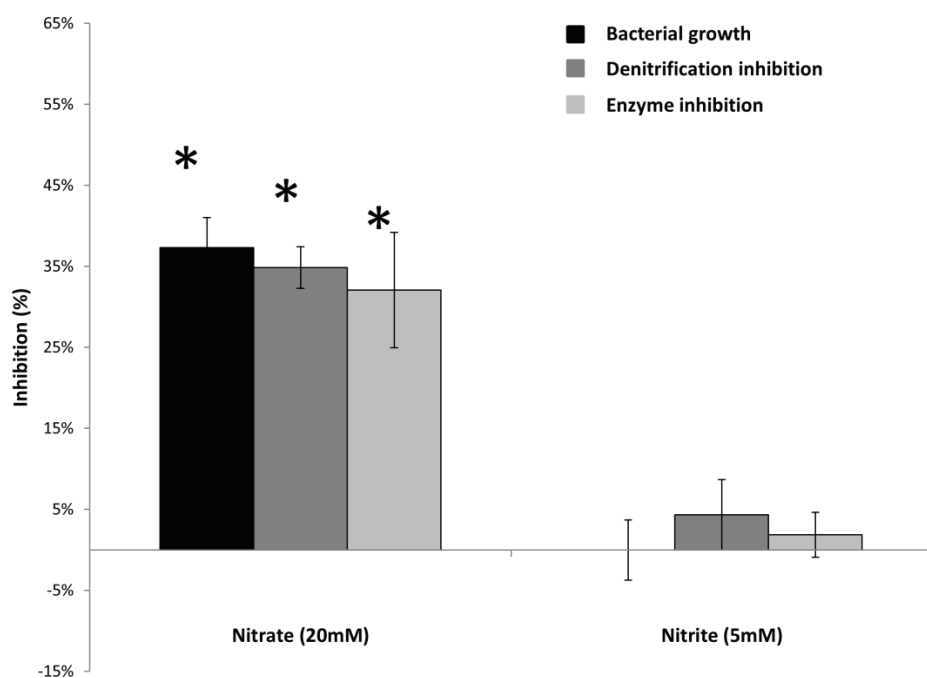


Figure 35: Percent of inhibition (relative to control) by procyanidins (at 0.01 mg. ml⁻¹) of the bacterial growth (black), the denitrification (grey) and the enzyme activity (*i.e.* nitrate-reductase or nitrite-reductase) of *P. brassicacearum* with 20 mM of nitrate or 5 mM of nitrite. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

Table 5: Parameter estimates for Michaelis-Menten or Hill enzymatic kinetic of the nitrate-reductase and the nitrite-reductase with or without procyanidins fitted by the method of the least-squares. Estimates, t-values and significance level (significance: * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01 and *** p-value < 0.001). See Figure 3 for models fitted.

	Control			Procyanidins			
	Estimate	Std Err	t-value	Estimate	Std Err	t-value	
Cell nitrate reductase				Cell nitrate reductase			
Vmax (mM.h ⁻¹)	15.23	2.1	7.23***	Vmax (mM.h ⁻¹)	8.14	2.61	3.12**
Km (mM)	13.24	3.83	3.46**	Kd (mM)	9.31	3.51	2.65*
				n	2.17	0.99	2.19*
Cell nitrite reductase				Cell nitrite reductase			
Vmax (mM.h ⁻¹)	8.46	0.88	9.55***	Vmax (mM.h ⁻¹)	7.26	0.59	12.25***
Km (mM)	0.56	0.25	2.25*	Km (mM)	0.48	0.17	2.87*
Free nitrate reductase				Free nitrate reductase			
Vmax (mM.h ⁻¹)	6.76	0.26	25.79***	Vmax (mM.h ⁻¹)	7.41	0.84	8.79***
Kd (mM)	4.09	0.20	20.61***	Kd (mM)	10.14	0.97	10.48***
n	4.18	0.72	5.84***	n	3.10	0.57	5.47***

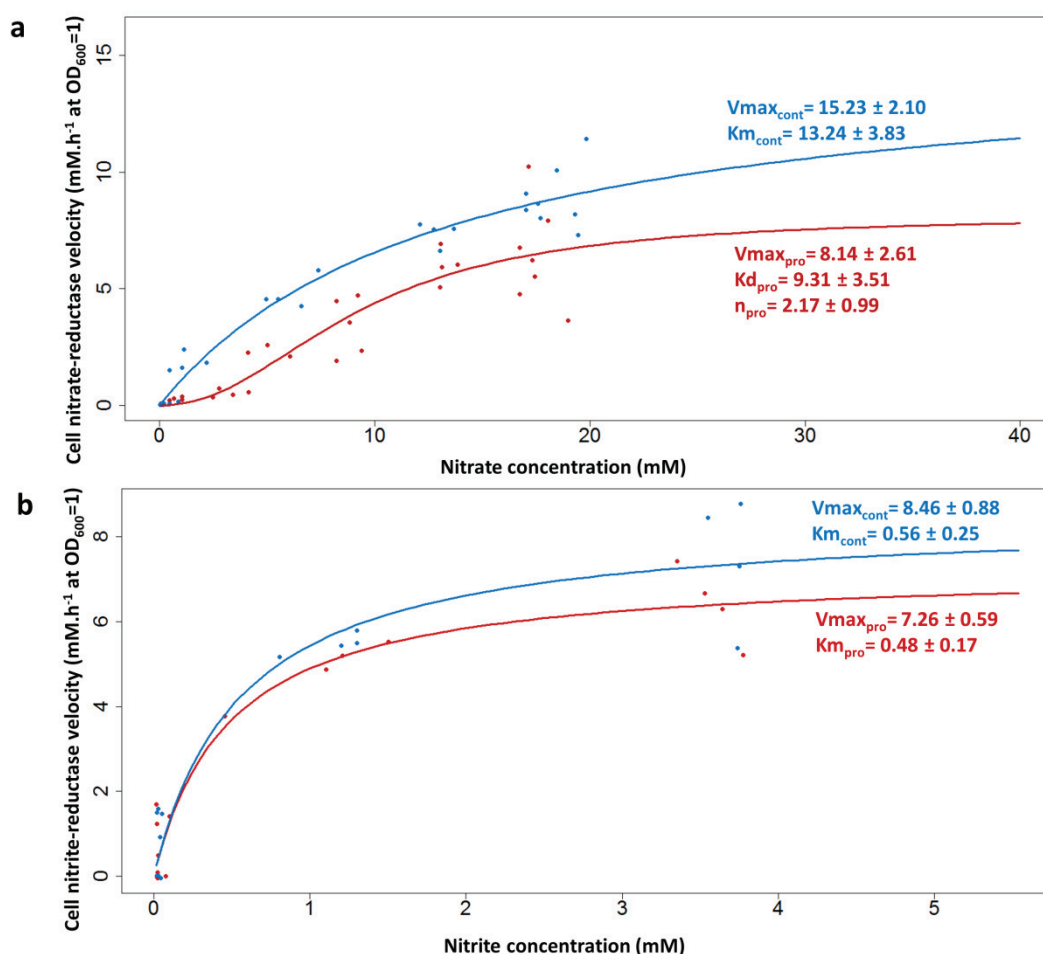


Figure 36: Enzymatic substrate saturation curves of the a) nitrate-reductase and b) the nitrite-reductase in intact cells, with (red curves) or without (blue curves) procyanidins fitted by the method of the least-squares.

In the intact cells of *P. brassicacearum* the NO_3 -reductase shows a classical Michaelis-Menten saturation curve without procyanidins and a sigmoid saturation curve with procyanidins (Fig. 36a, Table 5). The exposure to procyanidins reduced significantly the V_{max} from 15.2 ± 2.1 to $8.1 \pm 2.6 \text{ mM.h}^{-1}$ without affecting significantly the affinity (K_{m} $13.2 \pm 3.8 \text{ mM}$ and K_{d} $9.3 \pm 3.5 \text{ mM}$). In the intact cells of *P. brassicacearum* the NO_2 -reductase show a classical Michaelis-Menten with and without procyanidins without affecting significantly V_{max} and affinity constants (Fig. 36b, Table 5).

4. Effect of procyanidins on the activity of free NO_3 -reductase

Without procyanidins, NO_3 -reductase activity (V_{max}) was significantly (p -value < 0.001) lower with free enzyme (*i.e.* ultrasonicated cells) than with intact cells. On free enzyme, the NO_3 -reductase activity is significantly reduced by procyanidins concentrated at 0.01 mg.ml^{-1} ; and the enzyme showed a sigmoid saturation curve with and without procyanidins (Fig. 37,

Table 5). The V_{max} wasn't significantly modified whereas K_d increased with procyanidins (10.1 ± 1 mM) compared to without procyanidins (4.1 ± 0.2 mM)(Fig. 37, Table 5).

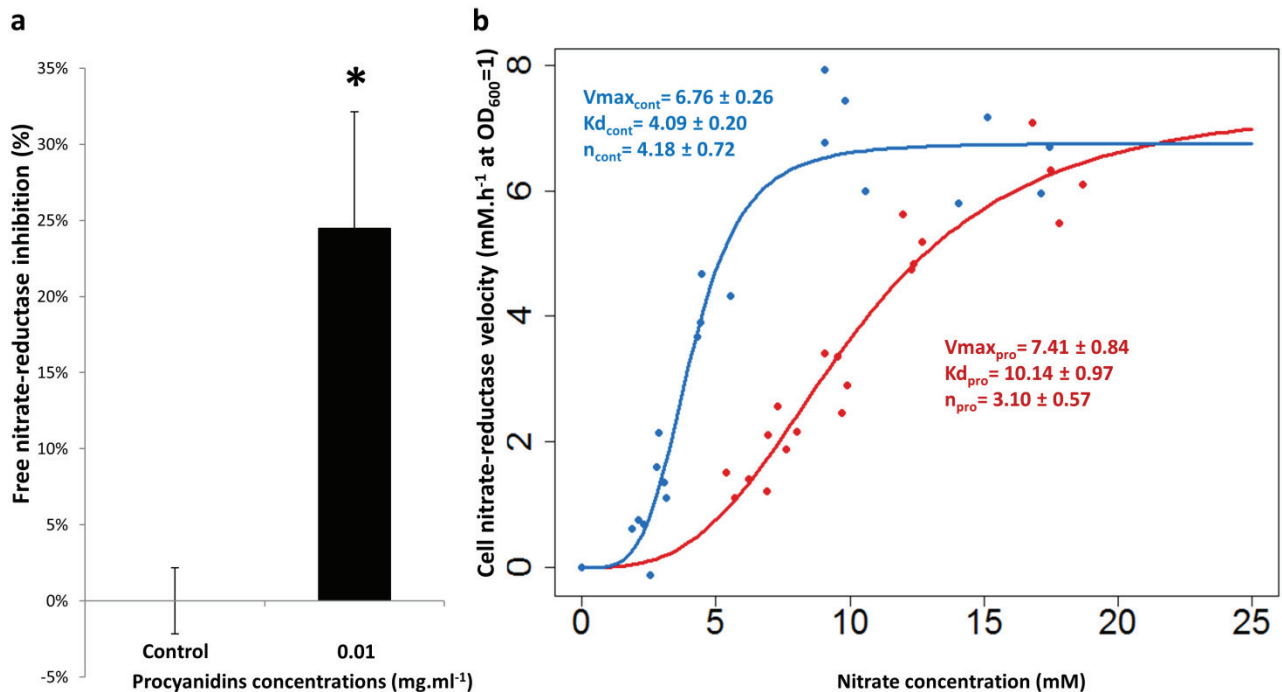


Figure 37: a) Percent inhibition (relative to the control) at 0.01 mg. ml^{-1} of procyanidins on the free nitrate-reductase activity of *P. brassicacearum* with 20 mM of nitrate after sonication and b) enzymatic substrate saturation curves of the free nitrate-reductase of *P. brassicacearum* with (red curve) or without (bleu curve) procyanidins. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

5. Effect of procyanidins on nitrate-reductase (narG) and nitrite-reductase (nirS) gene translations

At 20 mM of nitrate, procyanidins significantly increased the translation of the subunit NarG of the membrane-bound NO_3 -reductase compared to the wild type harboring the same fusion without procyanidins (Fig. 38a). The β -galactosidase activity of *narG'*-*lacZ* fusion with procyanidins is all the time higher than those without procyanidins for example, after 8h of bacterial culture it was multiplied by 4 times. However, at the same concentration of nitrate, the translation of the subunit NirS of the NO_2 -reductase decrease significantly in the presence of procyanidins (Fig. 38b). In addition, procyanidins did not significantly affect the translation of the subunit NirS of the NO_2 -reductase from 4 to 10h of *P. brassicacearum* culture in anaerobic condition in a medium supplemented with 5 mM of NO_2 (Fig. 38c). Indeed, the β -

galactosidase activity of *nirS*'-*lacZ* fusion with and without procyanidins from 4 to 10 h of bacterial culture was not significantly different.

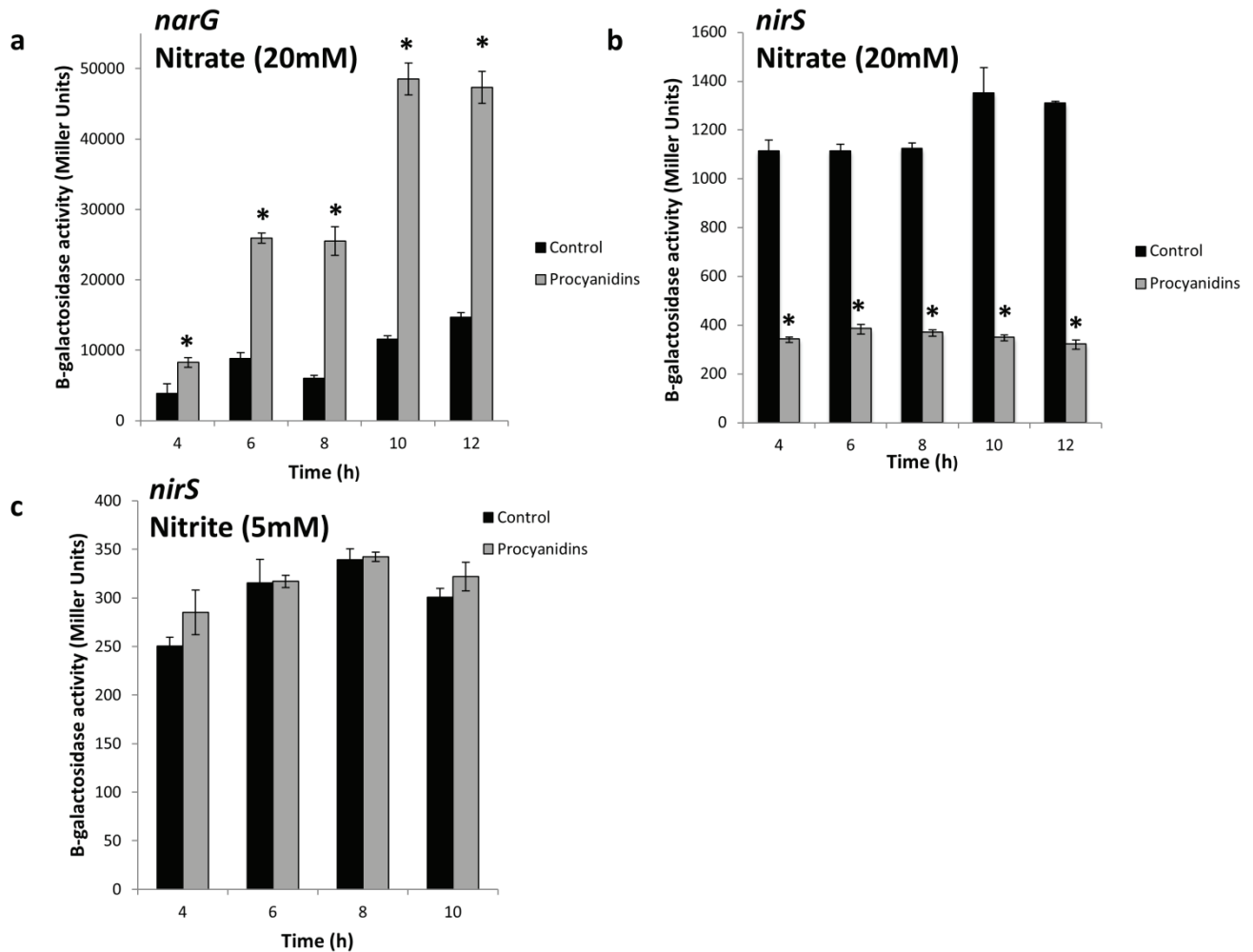


Figure 38: β -galactosidase activity of *P. brassicacearum* translational fusions with or without procyanidins. β galactosidase activities of :a) *narG*'-*lacZ* fusion with strain cultured with 20 mM of nitrate b) *nirS*'-*lacZ* fusion with strain cultured with 20 mM of nitrate c) *nirS*'-*lacZ* fusion with strain cultured with 5 mM of nitrite. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed with the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

III. Discussion

In this study, we report the putative mechanism by which procyanidins inhibit denitrification in denitrifying bacteria. We show that procyanidins principally target the NO_3 -reductase activity and that it probably caused by their effect on the membrane stability. Thus, we show that procyanidins act as a specific allosteric inhibitor of the membrane-bound NO_3 -reductase by changing the conformational form of the enzyme.

1. Procyanidins inhibit denitrification not because of general antimicrobial properties

It has been demonstrated that procyanidins could have antibacterial properties on some bacterial species such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella sp.* (Mayer *et al.*, 2008). Lacombe *et al.* (2012) demonstrated that a mixture of procyanidins inhibited the growth of two bacteria strains (*i.e. Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*) in a total of four bacteria tested at a concentration two-fold higher (0.2 mg.ml⁻¹) than the one tested in our study. Moreover, higher concentrations of procyanidins did not inhibit the insensitive strains (*i.e. Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus rhamnosus*). These results suggested that procyanidins have probably a specific inhibitory effect on some bacteria. In our study, the aerobic respiration of *P. brassicacearum* was inhibited from 0.05 mg.ml⁻¹ and the denitrification of *P. brassicacearum* was more inhibited than the aerobic respiration. These results suggest that denitrifying bacteria such as *P. brassicacearum* in our study may be more sensitive to procyanidins than others bacteria and that procyanidins target particularly the denitrification process as previously suggested by Bardon *et al.* (Partie 2). Moreover, at the lowest concentration tested (*i.e.* 0.01 mg.ml⁻¹) procyanidins have no effect on respiration but a specific effect on the denitrification process which demonstrated that the inhibition of the denitrification process may not be due to a general antimicrobial properties of procyanidins.

2. Procyanidins affect membrane integrity without affecting cell viability

The permeative action on the membrane by the effect of procyanidins was already observed in different studies (Kajiya *et al.*, 2004; Lacombe *et al.*, 2013). Indeed, procyanidins may adsorb to membrane surfaces and insert into the lipid bilayer, causing fatal perturbations to membrane structure (Kajiya *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). In our study, we found that procyanidins were able to permeabilized the membrane and disrupt the membrane cells as we observed vesicles on the cell membrane of *P. brassicacearum* exposed to procyanidins. However, no significant membrane permeabilization was observed at 0.01 mg. ml⁻¹, the lowest concentration of procyanidins although we observed vesicles on the cell membrane by electron transmission microscopy. It suggests that at low concentration of procyanidins the cell membrane is destabilized but not fully permeabilized. Although cells permeability was affected, the viability of the cells was not reduced, confirming results of Lacombe *et al.* (2013) where procyanidins did not induced bactericidal effect. Our result suggests that

procyanidins affect denitrifying bacteria and inhibit denitrification through the inhibition of a cell function. In another study, Yang *et al.* (2011) demonstrated that membrane injuries resulting from cationic polyethylenimine quantum dots (PEI) exposure can reduce denitrification of *Pseudomonas stutzeri*, a denitrifying bacteria closed to *P. brassicacearum*. Yang *et al.* (2011) concluded that the membrane permeabilization by PEI may results in an inhibition of the generation of the proton motive force (PMF) associated to the cell energy production which can result in the inhibition of the cell growth in anaerobic conditions. However, the PMF is an energy production process of either anaerobic and aerobic respiratory chain (Taylor, 1983), thus an effect of the membrane disruption through PEI or procyanidins exposures on the PMF may result in the same effect in aerobic and anaerobic condition which was not observed in the study of Yang et al (2011) as well as in ours where denitrification was more sensitive. The bacterial membrane permeabilization may explain general antimicrobial properties of high procyanidin concentrations but not the higher sensitivity of the denitrification compared to the aerobic respiration. The membrane permeabilization by polyphenolic compounds may be responsible of partial disruption of critical transporters into the membrane such as the NarK proteins transporters of NO₃ (Pometto *et al.*, 2005). The lowest concentration tested in our study disturbed the cell membrane of *P. brassicacearum* but did not permeabilized it. Thus the higher sensitivity of the denitrification in comparison to the aerobic respiration at this concentration may neither result in a disturbance of the NO₃ transport (NarK transporters) because of the membrane permeabilization.

3. Procyanidins inhibit the cell nitrate-reductase activity

At low concentration (*i.e.* 0.01 mg.ml⁻¹), procyanidins specifically inhibited the cell NO₃-reductase activity resulting in a reduction of the cell growth rate and the cell denitrification when *P. brassicacearum* is grown under NO₃ in anaerobic conditions. Procyanidins changed the Michaelis-Menten (hyperbolic curve) substrate saturation curve of the cell NO₃-reductase into a Hill (sigmoid curve) substrate saturation curve and reduce the V_{max} of the cell NO₃-reductase (8.14 compared to 15.23 mM.h⁻¹ at OD₆₀₀ =1) typically as an allosteric inhibitor (Lehninger *et al.*, 2005) which is an inhibitor modifying conformational enzyme form and reducing the accessibility to the active site. In contrast, procyanidins did not affect the cell NO₂-reductase activity and hence it did not change it Michaelis-Menten substrate saturation curve. The NO₃ reduction is principally fulfilled by the membrane-bound NO₃-reductase and the periplasmic NO₂-reductase (Zumft, 1997). Taking into account previous results on the membrane disturbance by procyanidins, we can suppose that the membrane-bound NO₃-

reductase may be more sensitive to membrane destabilization than the periplasmic enzymes. Indeed, the stability of membrane proteins folds strongly depends on the interactions of the peptides with others components of the membrane (White & Wimley, 1999) and the protein conformational folds determine the enzyme activity (Zavodszky & Hajdu, 2013). Thus, the membrane disruption may change the folds of the membrane-bound proteins and change their conformational form such as an allosteric inhibitor changes the conformational form of a target enzyme (Lehninger *et al.*, 2005; Tzeng & Kalodimos, 2013). Therefore, procyanidins may act as an allosteric inhibitor of the membrane-bound NO₃-reductase.

4. Procyanidins acts through the membrane destabilization and change of NO₃ reductase conformational form

It is known that ultrasonication disrupt the bacterial membrane (Joyce *et al.*, 2011) thus ultrasonication should have similar effects than procyanidins on the NO₃-reductase activity. In our study we found that the ultrasonication reduced the NO₃-reductase activity. Moreover, we found that ultrasonication changed the classical Michaelis-Menten curve of the NO₃-reductase activity observed in intact cells to a Hill saturation curve on lysed cells. Therefore the membrane disruption (caused either by ultrasonication or procyanidins) changes the conformational form of the membrane-bound NO₃-reductase acting as an allosteric inhibitor. When added to the disrupted suspension cells, procyanidins increase the sigmoid form of the saturation curve of the NO₃-reductase activity by reducing the affinity for the NO₃ (*i.e.* a higher K_d). It suggests either that the membrane was not completely disrupted by ultrasonication and procyanidins increase the disruption of the membrane and/or the procyanidins interact directly on the NO₃-reductase to reduce its affinity and thus its activity.

5. Influence of procyanidins on NarG and NirS protein synthesis

When grown under NO₃, the synthesis of the NarG protein, encoding for the membrane-bound NO₃, was significantly increased when *P. brassicacearum* was exposed to procyanidins probably to compensate the efficiency of the enzyme. In contrast, the synthesis of the NirS protein, encoding the periplasmic NO₂-reductase significantly decreased. It is known that NO₂ up-regulate the *nirS* expression in *P. stutzeri* (Hartig & Zumft, 1999) and because of the reduction of the NO₂ production through the decrease of NO₃ reductase activity, *nirS* may have been less translated. Moreover, when grown under NO₂ the *nirS* gene translation of *P. brassicacearum* did not change with procyanidins addition, which confirms no effect of procyanidins on the periplasmic NO₂-reductase. These results suggest that procyanidins may

not regulate the denitrification genes translation such as what is observed for flavonoids that regulate certain genes in *Rhizobia* (Cooper, 2007). In contrast, the cell may over-expresses NarG protein production as it was observed by Yang *et al.* (2011) probably in order to resist to the membrane-bound NO₃-reductase disruption, and to maintain enough NO₃ reduction to insure cell respiration.

Conclusion

The mechanism involved in the BDI by procyanidins suggests a high sensitivity of the membrane-bound NO₃-reductase to the membrane stability and that any membrane perturbation may indirectly affect the NO₃-reductase activity even at inactive concentration on aerobic processes. More generally, these findings also suggest that physical factors may act such as chemical allosteric inhibitor of some enzymatic processes showing that physical factors may be less overlooked in the regulation of biological processes. This explains the effect of procyanidins on denitrification function but without excluding a direct and specific effect on the NO₃ reductase. Although the cell viability was not affected, all physiological modifications may lead, over the long term, the denitrifying bacteria community to adapt to procyanidins exposure.

Acknowledgements

We thank CNRS EC2CO research program for providing fundings to the project “Teranotro”.. Denitrification and NO₃/NO₂ analyses were performed at the AME platform (UMR 5557, FR 41, University Lyon1). The procyanidins purification was done at the CESN platform (UMR5557, FR 41, University Lyon1).

**Partie 4 Inhibition biologique de la dénitrification : La course
à l'armement entre les renouées asiatiques et les
communautés dénitrifiantes**

Inhibition biologique de la dénitrification (BNI): La course à l'armement entre les renouées asiatiques et les communautés dénitrifiantes

***Corresponding author:**

Franck Poly

Tel : +33472431379

Email: franck.poly@univ-lyon1.fr

Introduction

Le processus de coévolution antagoniste entre une plante et son compétiteur ou son parasite est traditionnellement vu comme une course à l'armement entraînant l'apparition de résistances et contre-résistances au cours du temps chez l'un et l'autre des partenaires (Dawkins & Krebs, 1979; Kniskern & Rausher, 2001; Anderson *et al.*, 2010). Il est admis que la compétition pour les ressources nutritionnelles est un moteur important dans l'innovation et la diversification des organismes (Schluter, 1996; Hibbing *et al.*, 2010). Ainsi, la compétition pour une ressource peut entraîner la mise en place d'une course à l'armement entre compétiteurs (Hibbing *et al.*, 2010). Chez les microorganismes les phénomènes de compétition peuvent être à l'origine de l'émergence de caractères d'inhibition d'autres microorganismes, compétiteurs pour une même ressource. Ainsi, Loesche (1986) ont pu montrer que *Streptococcus mutans*, une bactérie de la microflore buccale, pouvait dégrader les carbohydrates, pour lesquels les autres bactéries au sein de cet écosystème sont en compétition, en acide lactique présentant des propriétés bactériostatiques. Dans le cadre de la course à l'armement, et toujours chez les microorganismes, il a déjà été observé l'émergence de la capacité à dégrader les métabolites toxiques dont le produit pouvait affecter en retour le compétiteur 1 (Loesche, 1986; Tong *et al.*, 2007). Ainsi, Tong *et al.* (2007) ont pu démontrer que dans la microflore buccale, *S. oligofermentans* pouvait dégrader l'acide lactique produit par *S. mutans* en peroxyde d'hydrogène capable d'inhiber en retour la croissance de *S. mutans*. Néanmoins, ce phénomène de dégradation de composés par le compétiteur 2 en un autre composé toxique pour le compétiteur 1 n'a à notre connaissance été observé qu'entre microorganismes, probablement à cause de leur capacité d'évolution plus rapide que d'autres organismes.

Il est connu que les plantes peuvent produire des métabolites secondaires capables d'influencer les communautés microbiennes du sol (Hartmann *et al.*, 2009; Haichar *et al.*, 2014) et selon la théorie du « plant-soil feedback » en retour influencer sur leur développement (Kulmatiski *et al.*, 2008; van der Putten *et al.*, 2013).

L'azote est souvent considéré comme le principal facteur limitant la croissance des plantes en milieu terrestre (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008) et la compétition pour l'azote entre plantes et microorganisme est connue pour être intense (Hodge *et al.*, 2000; Kuzyakov & Xu, 2013). Il est également admis que les microorganismes sont généralement les plus efficaces dans l'assimilation des formes de l'azote assimilables par les plantes (*i.e.*

NO₃ et NH₄) (Kuzyakov & Xu, 2013). Le processus de dénitrification est la principale voie de perte d'azote dans les sols (de 25 à 90 %) (van der Salm *et al.*, 2007; Radersma & Smit, 2011). Ainsi, la productivité végétale dépend fortement de ce processus (van der Heijden *et al.*, 2008). Certaines plantes peuvent libérer des métabolites secondaires pour prendre le contrôle de certains processus du cycle de l'azote tels que la nitrification (Subbarao *et al.*, 2009), la minéralisation (Subbarao *et al.*, 2009; Dietz *et al.*, 2013; Bardou *et al.*, 2014). Dans les parties précédentes, nous avons pu montrer que le complexe d'espèces invasives *Fallopia* spp. est capable d'inhiber le processus bactérien de dénitrification par l'intermédiaire des procyanidines (Parties 1, 2 et 3). Ainsi, cette faculté à inhiber la dénitrification, pourrait permettre à *Fallopia* spp. de limiter les pertes en azote du sol et en retour participer à ces caractéristiques de croissance exceptionnelles. Bien que les effets d'inhibition de la dénitrification par les procyanidines semblent être spécifiques à faible concentration (partie 3), l'effet des procyanidines sur d'autres processus du cycle de l'azote n'a à notre connaissance jamais été comparé avec leurs effets sur la dénitrification. Si cette spécificité était avérée, par la libération de procyanidines, *Fallopia* spp. pourrait imposer une forte pression de sélection sur la communauté dénitrifiante colonisant sa rhizosphère.

Les procyanidines sont des polymères de catéchine et d'epicatéchine reliées par des liaisons covalentes C-C (Nakamura *et al.*, 2003; Hellstrom & Mattila, 2008). Les catéchines (*i.e.* catéchine, épicatechine et procyanidines) sont considérées comme des molécules récalcitrantes à la dégradation (Bhat *et al.*, 1998) et ne sont dégradées que par quelques champignons ou bactéries (Arunachalam *et al.*, 2003). La dégradation biologique des procyanidines par les microorganismes nécessite notamment la capacité à dégrader la catéchine (Bhat *et al.*, 1998) sous l'action de la catéchine-oxygénase (Arunachalam *et al.*, 2003). Wang *et al.* (2013) ont pu démontrer que des communautés de bactéries capables de dégrader la catéchine pouvaient être sélectionnées dans les sols de *Rhododendron formosanum*, appartenant à un genre connu pour produire des procyanidines (Jaiswal *et al.*, 2012). Nous savons que le complexe d'espèce *Fallopia* spp. réduit la dénitrification des sols envahis en comparaison des sols proches non envahis (Dassonville *et al.*, 2011) et ceci par la libération de procyanidines (Partie 2). Ainsi, l'activité des microorganismes capables de dégrader les procyanidines pourrait être augmentée dans les sols sous influence de *Fallopia* spp. et d'autant plus dans les sols où la compétition entre *Fallopia* spp. et les bactéries dénitrifiantes est importante. Cette capacité à dégrader les catéchines et donc les procyanidines dans les sols pourrait diminuer l'effet des procyanidines sur la dénitrification.

Dans cette étude nous explorons la relation particulière des communautés dénitrifiantes des sols avec les plantes productrices de procyanidines en utilisant *Fallopia* spp. comme modèle. Dans un premier temps, afin de valider la spécificité des effets des procyanidines sur le processus de dénitrification nous les comparons à ceux observés sur une autre fonction du cycle de l'azote, la nitrification des sols. Ensuite, afin de déterminer s'il existe des différences de sensibilité des communautés dénitrifiantes des sols au BDI nous comparons l'influence des procyanidines sur l'activité de dénitrification de sols issus de 2 sites différents ayant subi l'influence de *Fallopia* spp. ou non,. Puis, nous explorons la capacité des communautés microbiennes présentes dans ces sols à dégrader les procyanidines ce qui pourrait illustrer un mécanisme de défense des bactéries dénitrifiantes aux procyanidines.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Les sols de cette étude ont été prélevés sur deux sites : Ain6 (45°48'15''N ; 5°10'29''E) une prairie et Ain11 (45°57'53''N; 5°15'25''E) un bord de rivière sur lesquels *Fallopia* spp. se développe abondamment. Sur ces deux sites, des sols provenant de l'intérieur et de la périphérie extérieure de la zone envahie par *Fallopia* spp. ont été prélevés sur une profondeur de 0 à 15 cm en 4 endroits différents. Les sols ont ensuite été tamisés (2mm) afin de les homogénéiser et de les débarrasser de leurs débris végétaux et organiques puis stockés à 4°C afin de conserver leurs propriétés biologiques.

Les procyanidines utilisées dans cette étude sont des procyanidines commerciales purifiées (Laffort, Bordeaux, France) précédemment utilisées dans la partie 2.

2. Mesures des activités microbiennes : nitrification et dénitrification

La dénitrification et la nitrification potentielles des deux types de sols (Ain 6 et Ain 11 avec et sans *Fallopia* spp.) a été mesurée en suspension (1g de sol équivalent sec pour 10 ml) sans procyanidines (témoin) et en présence de procyanidines commerciales, concentrées à 0,5 ; 0,1 ; 0,05 et 0.01 mg.ml⁻¹, dans une solution tampon phosphate au pH des sols 7.5 (NaH₂PO₄ et NaHPO₄, 12H₂O) (pour limiter les variations de pH au court de l'incubation) contenant de l'acide glutamique (0.5.mg de C.mL⁻¹), du glucose (0.5mg de C.mL⁻¹) supplémenté en KNO₃ (20mM) pour la dénitrification et en (NH₄)₂SO₂ (50µg.mL⁻¹) pour la nitrification. Les sols ont été placés dans des flacons plasma de 150 ml en anaérobiose pour la mesure de l'activité de

dénitrification (mélange : He/C₂H₂ ; v/v ; 90/10) et en aérobiose pour la mesure de l'activité de nitrification, respectivement bouchés par un bouchon en caoutchouc ou du parafilm. Les flacons ont été mis à agiter à 140 rpm à 28°C. Chacune des conditions a été réalisée en 4 répliques.

La mesure de la dénitrification potentielle a été réalisée par des mesures d'accumulation de N₂O suivies aux temps 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, 24 et 30 heures, après la mise en suspension, à l'aide d'un microcatharomètre (µGC-R3000, SRA instruments, Marcy l'Etoile, France). Pour la dénitrification, deux mesures de dénitrification ont été distinguées : la dénitrification initiale (DEA: denitrifying enzymatic activity) qui correspond à la vitesse de dégagement en N₂O entre 2 et 10 heures qui permet d'estimer le pool enzymatique initial avant synthèse *de novo* et la dénitrification maximale qui correspond à la vitesse de dégagement de N₂O entre 20 et 30 heures et donc qui intègre la multiplication des dénitrifiants.

La mesure de nitrification potentielle (NEA : nitrifying enzymatic activity) a été réalisée en dosant la production de NO₃ au cours du temps à l'aide d'un chromatographe ionique Dionex DX 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), en prélevant et en filtrant à 0,2 µm, 1ml de suspension toutes les 2 h entre 2 et 10h. La mesure de nitrification potentielle correspond à la mesure du pool enzymatique présent dans l'échantillon initialement, et est exprimée par la production de µg de N-NO₃.g⁻¹ de sol sec. h⁻¹ entre 2 et 10 heures. Elle a été comparée à la dénitrification initiale (NEA *versus* DEA).

3. Mesure de la vitesse de dégradation des procyanidines dans les sols

La mesure de la vitesse de dégradation des procyanidines a été réalisée sur les quatre types de sols (Ain 6 et Ain 11 avec et sans *Fallopia* spp.) dans les mêmes conditions que la nitrification avec, 1mL de suspension de sol prélevé toutes les 2 heures pendant 12 heures. La quantité de procyanidines a ensuite été dosée dans les échantillons prélevés par colorimétrie en utilisant la méthode d'hydrolyse acide au n-butanol précédemment décrite (Partie 2).Analyses statistiques

Afin, de tester l'effet de *Fallopia* spp. sur la dénitrification et la nitrification sur les deux sites nous avons effectué deux ANOVA 2 avec le site, le type de sol et l'interaction du site et du type de sols comme cofacteurs.

Les tests d'effets des procyanidines sur les activités ont été réalisés sur les pourcentages d'inhibition de dénitrification initiale (DEA), dénitrification maximale et nitrification potentielle (NEA). Afin de tester l'effet des procyanidines sur la dénitrification et la nitrification sur les sols n'ayant pas connu *Fallopia* spp., nous avons effectué deux ANOVA 1 avec le site (*i.e.* Ain6 et Ain11) comme facteur. Afin de tester l'effet des procyanidines sur la dénitrification maximale en fonction du type de sol sur les deux sites, nous avons effectué une ANCOVA avec la concentration en procyanidines et l'interaction du type de sol avec la concentration en procyanidines comme cofacteurs. La dénitrification maximale ayant été normalisée par rapport au traitement contrôle des sols sans *Fallopia* spp. pour chacun des sites, nous avons retiré le facteur site des ANCOVA. Afin de tester la vitesse de dégradation des procyanidines en fonction du site et du type de sol, nous avons effectué une ANOVA 2 avec le site, le type de sol et l'interaction entre le site et le type de sol comme cofacteurs. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2008).

II. Résultats

1. Effets de la présence de *Fallopia* spp. sur la dénitrification et la nitrification des sols

Les deux activités sont plus importantes dans les sols du site Ain11 que les sols du site Ain6 (Fig. 39a et 39b). La DEA est significativement plus faible dans les sols sous *Fallopia* spp. pour les deux sites par rapport aux sols sans *Fallopia* spp. (Fig. 39a). La nitrification est significativement plus faible dans le sol sous *Fallopia* spp. du site Ain 11 par rapport au sol sans *Fallopia* spp. alors que c'est le contraire sur le site Ain 6 (Fig. 39b).

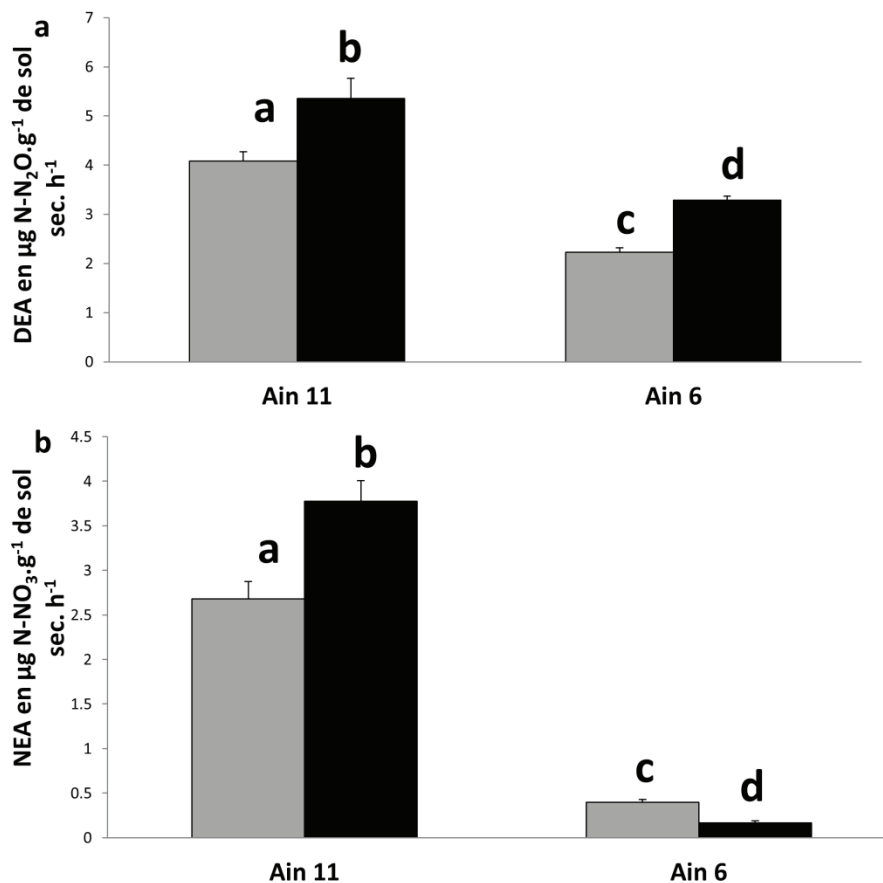


Figure 39: a) DEA et b) NEA des sols Ain11 et Ain6 avec (gris) et sans (noir) *Fallopia* spp. Les barres correspondent aux erreurs-standards. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes (Tukey HSD test $\alpha=0.05$).

La DEA est significativement réduite en fonction de la concentration en procyanidines dans les deux sols sans *Fallopia* spp. des sites Ain 11 et Ain 6 avec un maximum d'inhibition respectivement de 40 et 20% à 0.5 mg. ml^{-1} (Fig. 40a et Table 6). En revanche, la NEA n'est pas significativement réduite sous l'effet des concentrations en procyanidines testées (Fig. 40b et Table 6).

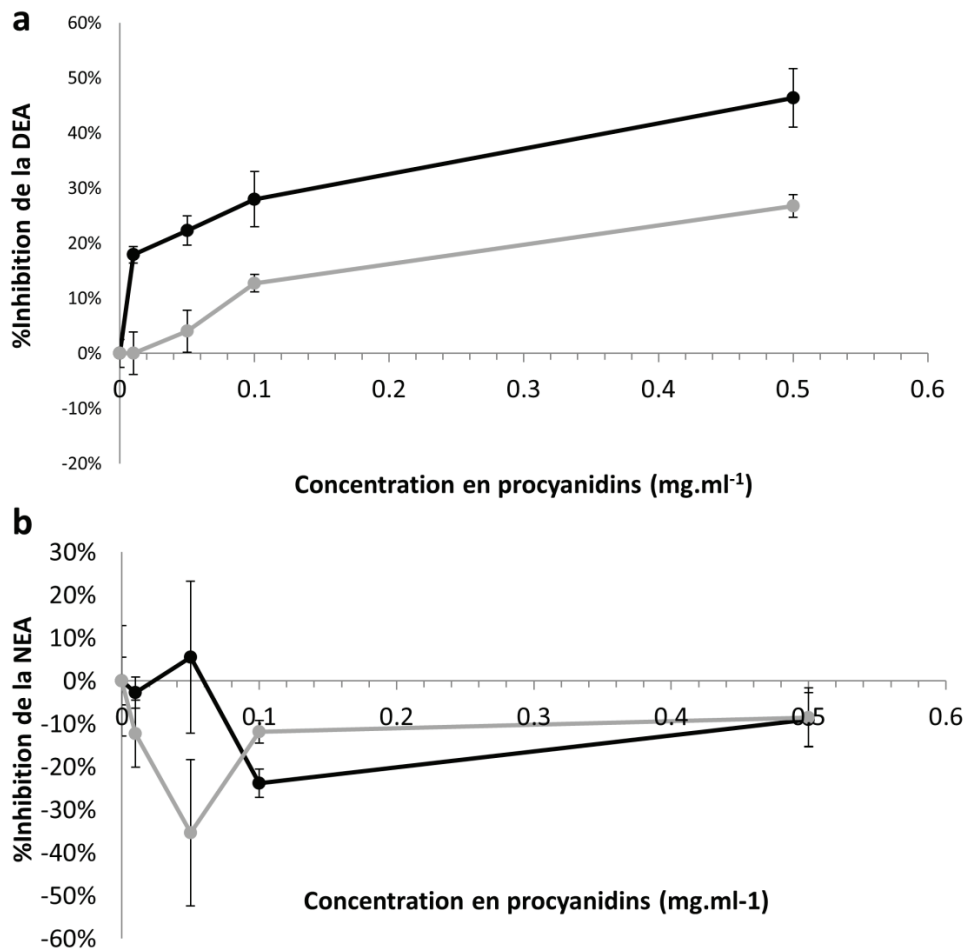


Figure 40: a) Pourcentage d'inhibition de la DEA et b) pourcentage d'inhibition de la NEA dans les sols Ain 11 (courbe noire) et Ain 6 (courbe grise) sans *Fallopia* spp. en fonction de la concentration en procyanidines. Les barres indiquent des erreurs-standards.

Table 6 : One-way ANOVA de la DEA et la NEA en fonction de la concentration en procyanidines.

	DEA		NEA	
	<i>F-values</i>	<i>P-values</i>	<i>F-values</i>	<i>P-values</i>
Concentration	90.02	<0.001***	0.013	0.91
Concentration x Site	1.03	0.32	0.009	0.92

2. Effet de l'histoire des sols sur la capacité des procyanidines à inhiber la dénitrification

La dénitrification maximale est significativement réduite en fonction de la concentration en procyanidines dans les deux sols sans *Fallopia* spp. des sites Ain 11 et Ain 6 avec des maxima d'inhibition respectivement de 60 et 80% à 0.5 mg. ml⁻¹ (Fig. 41 et Table 7). La dénitrification maximale est significativement moins inhibée dans le sol avec *Fallopia* spp. du site Ain 11 par rapport au sol sans (60% sans *Fallopia* spp. contre 40% avec *Fallopia* spp. à 0.5 mg. ml⁻¹) (Fig. 41a et Table 7). En revanche, aucune différence significative d'inhibition n'est observée entre les sols avec et sans *Fallopia* spp. du site Ain 6 (Fig. 41b et Table 7).

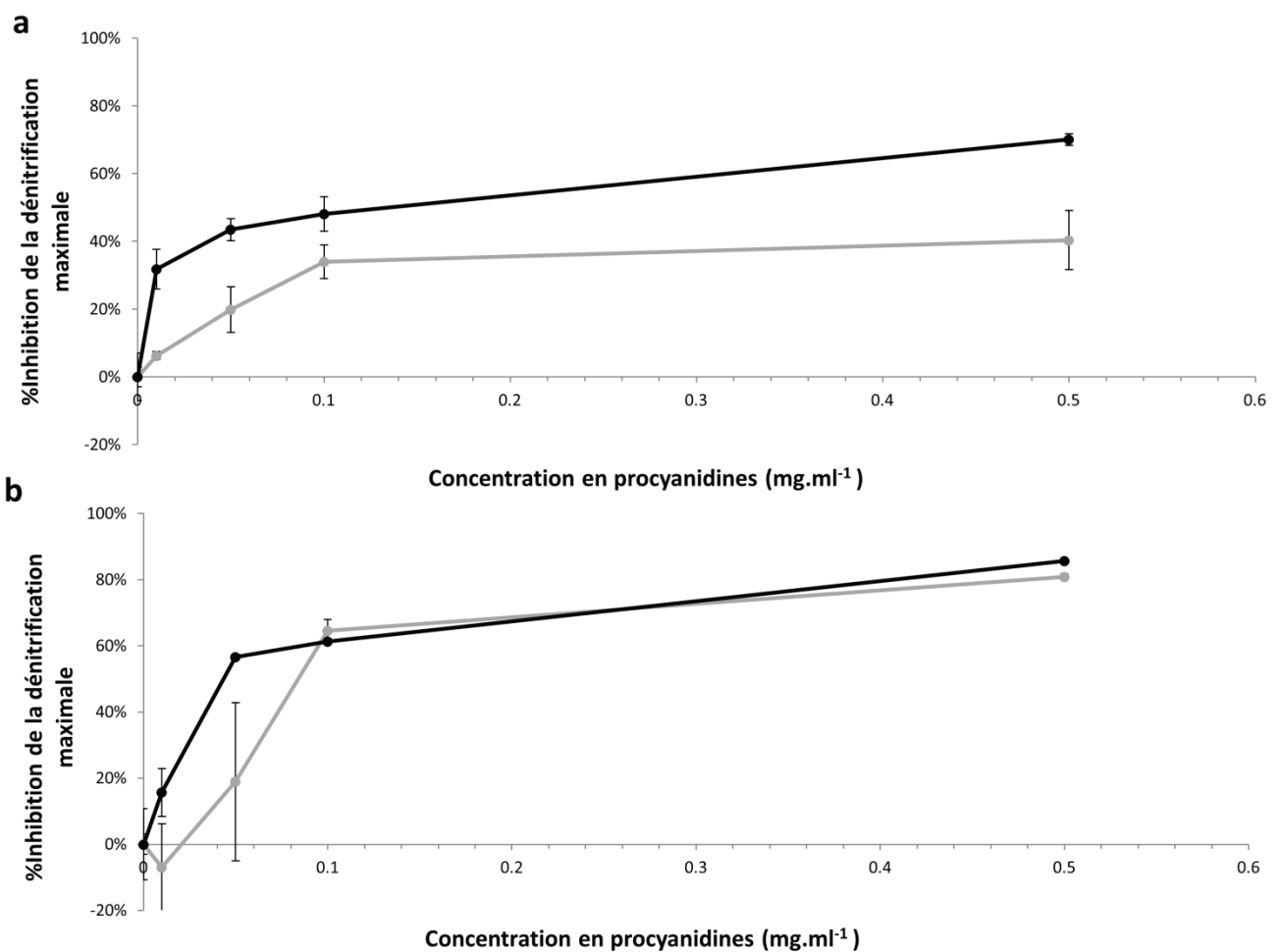


Figure 41: Pourcentage d'inhibition de la dénitrification maximale en fonction de la concentration en procyanidines dans les sols a) Ain11 et b) Ain6, avec (gris) et sans (noir) *Fallopia* spp.. Les barres indiquent des erreurs-standards.

Table 7: Two-ways ANOVAs de la dénitrification maximale des sols Ain11 et Ain6 en fonction de la concentration en procyanidines, du type de sol (*i.e.* avec et sans *Fallopia* spp.) et de l'interaction entre la concentration et du type de sol comme co-facteurs.

	Ain11		Ain6	
	R²= 0.62		R²= 0.35	
	F-values	P-values	F-values	P-values
Concentration	34.98	< 0.001 ***	38.12	< 0.001 ***
Sol	13.38	< 0.01 **	2.05	0.16
Concentration x Sol	1.29	0.26	0.25	0.62

3. Effet de l'histoire des sols sur leur capacité à dégrader les procyanidines

Dans le sol avec *Fallopia* spp. du site Ain 11 la quantité des procyanidines dosée diminue significativement 2 fois plus rapidement que dans le sol sans *Fallopia* spp. (0.33 contre 0.15 mg. ml⁻¹. h⁻¹) (Fig. 42). Malgré une tendance similaire, il n'y a pas de différence significative entre les sols sans et avec *Fallopia* spp. du site Ain 6 (Fig. 42).

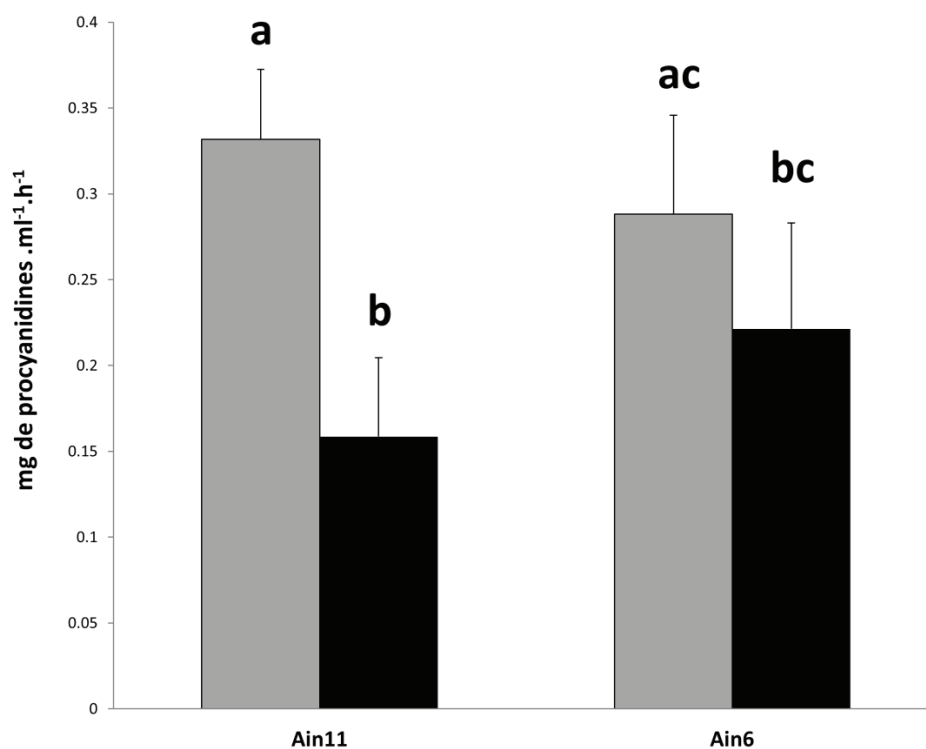


Figure 42: Vitesse de disparition des procyanidines dans les sols Ain11 et Ain6 avec (gris) et sans (noir) *Fallopia* spp. Les barres correspondent aux erreurs-standards. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes (Tukey HSD test $\alpha=0.05$).

III. Discussion

Dans cette étude, nous démontrons que les procyanidines ont un effet spécifique sur la dénitrification des sols et qu'il existe selon les sols/ les communautés et la présence de *Fallopia* des sensibilités différentes. Ces résultats sont discutés dans une perspective de coévolution antagoniste entre plantes inhibitrices de la dénitrification par la production de procyanidines et certaines bactéries dénitrifiantes.

1. Effets de *Fallopia* spp. *in situ* sur la dénitrification et la nitrification potentielles des sols

La dénitrification est réduite sous l'influence de *Fallopia* spp. quel que soit le sol alors qu'à l'inverse la nitrification n'est pas aussi clairement contrôlée par *Fallopia* spp.. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour ces deux sols dans l'étude de Dassonville *et al.*(2011) d'où a émergé l'idée de l'existence du BDI. En effet, les sols Ain 11 en bord de rivière présentent des taux de dénitrification plus élevés que les sols Ain 6 provenant de prairie. Un plus fort taux de dénitrification dans les sols peut donc entraîner une consommation plus importante du NO₃ du sol par les dénitrifiants. Ceci suggère que la

compétition entre dénitrifiants et *Fallopia* spp. serait plus intense dans le sol du site Ain 11 que celui du site Ain 6. Cette pression de sélection pourrait favoriser la sélection de communautés résistantes à l'inhibition de la dénitrification (Schluter, 1996; Hibbing *et al.*, 2010).

2. Spécificité de l'inhibition de la dénitrification par les procyanidines

Dans cette étude, la dénitrification est significativement inhibée par les procyanidines selon une dose-réponse comme précédemment présenté et ceci dans les deux sols sans *Fallopia* spp. étudiés (Partie 2). A l'inverse la nitrification n'est pas significativement inhibée par les procyanidines. Ces résultats démontrent clairement que sur une autre fonction du cycle de l'azote, les procyanidines en faible concentration n'ont pas d'effet. Cela complète les résultats précédemment acquis (Partie 2) sur l'effet des procyanidines sur la respiration aérobie et soutient que ces composés ont une inhibition spécifique du processus de dénitrification aux concentrations étudiées. Ainsi, les dénitrifiants seraient sensibles aux procyanidines mais pas les nitrifiants. Dans une étude précédente, Michalet *et al.* (2013) ont démontré, en analysant l'effet d'extraits racinaires de l'arbre tropical *Eperua falcata* sur l'activité métabolique de bactéries dénitrifiantes et nitrifiantes, que les extraits racinaires pouvaient réduire l'activité de souches dénitrifiantes mais pas celle de nitrifiants. Il est intéressant de faire ce rapprochement avec nos résultats sachant que *E. falcata* est connu par ailleurs pour produire les formes monomériques des procyanidines (*i.e.* catéchine et épicatechine) (Royer *et al.*, 2010) qui comme on l'a vu dans la partie 2 peuvent être le signe de la présence de procyanidines (non recherchées par ces auteurs). Cette étude suggère donc également une certaine spécificité d'inhibition de la dénitrification. Néanmoins, certaines études ont pu démontrer des effets de proanthocyanidines (*i.e.* procyanidines ou prodelphinidines) sur la nitrification dans la litière végétale (Nierop *et al.*, 2006; Kraal *et al.*, 2009) mais les concentrations testées étaient de 20 à 1000 fois (*i.e.* 10 mg ml⁻¹) plus importantes que celles utilisées dans notre étude ce qui pourrait aisément expliquer les effets observés. Cette spécificité à l'échelle de communautés impliquées dans le cycle de l'azote vient compléter celle mise en évidence dans la partie 3 à l'échelle cellulaire chez une bactérie modèle.

3. Sensibilité des sols aux procyanidines variables en fonction des sols

Dans cette étude, nous avons pu observer des communautés dénitrifiantes du sol moins sensibles à l'inhibition par les procyanidines dans un sol ayant subi l'influence de *Fallopia* spp. et ce d'autant plus que le potentiel de dénitrification du sol est important. Si on considère que plus ce niveau de dénitrification est élevé plus la compétition entre dénitrifiants et *Fallopia* spp. est intense, le sol de bord de rivière (Ain 11) pourrait être un lieu de compétition plus forte entre dénitrifiants et plantes que le sol de prairie (Ain 6).

Il est connu que la compétition est un moteur important de sélection de résistance chez les communautés bactériennes (Schluter, 1996; Hibbing *et al.*, 2010). Ainsi, la forte compétition entre bactéries dénitrifiantes et *Fallopia* spp. pourrait avoir sélectionné des communautés bactériennes dénitrifiantes moins sensibles aux procyanidines dans le sol de bord de rivière (Ain11) que dans le sol de prairie (Ain6). Même si le niveau de sensibilité de la communauté dénitrifiante aux procyanidines peut effectivement résulter de la sensibilité intrinsèque des dénitrifiants aux procyanidines on ne peut exclure que cela puisse provenir de la biodisponibilité des procyanidines dans le sol, ou de la capacité de dégradation des procyanidines par la communauté ou les dénitrifiants eux-mêmes.

4. Devenir des procyanidines dans le sol

En étudiant la vitesse de disparition et donc de dégradation potentielle des procyanidines dans les sols, nous avons pu remarquer que leur dégradation était significativement plus rapide dans le sol le plus dénitrifiant Il a déjà été observé que la dégradation de molécules toxiques pour des bactéries pouvait être un mode de protection sélectionné (Tong *et al.*, 2007). Cette capacité à dégrader les procyanidines pourrait expliquer l'émergence de « résistance » dans le sol Ain 11 (*i.e.* sol de rivière) ayant subi l'influence de *Fallopia* spp..

Seul quelques microorganismes (champignons et bactéries) sont répertoriés comme capables de dégrader la catéchine qui est considéré comme une molécule récalcitrante (Bhat *et al.*, 1998). De plus, les bactéries sont considérées comme plus efficaces et dégraderaient la catéchine plus rapidement que les champignons (Arunachalam *et al.*, 2003).

Sur 9 études trouvées qui identifient des bactéries du sol capables de dégrader les catéchines, nous avons retrouvé 8 souches bien identifiées faisant toutes parties du groupe fonctionnel des dénitrifiants (Table 8). Dix souches capables de dégrader les catéchines ont été caractérisées

par leur genre et parmi ces 10 souches 9 étaient affiliées à des genres de bactéries comprenant des dénitrifiants et un genre non répertorié en tant que dénitrifiant. Ainsi, parmi les bactéries identifiées comme capables de dégrader les catéchines on retrouverait entre 45 et 95% de dénitrifiants.

Table 8: Liste de souches bactériennes isolées du sol capables de dégrader la catéchine et leur appartenance ou non au groupe fonctionnel des dénitrifiants.

Publication	Bacteries	Origine	Respiration Anaerobie
Arunachalam <i>et al.</i> (2003)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Sol	Dénitrification (Zhao <i>et al.</i> 2010)
Arunakumari <i>et al.</i> (1984)	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Sol	Dénitrification (Horn <i>et al.</i> 2006)
Hopper <i>et al.</i> (1997)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Sol	Dénitrification (Bedmar 2006) Dénitrification incomplète (Casella <i>et al.</i> 1984)
Muthukumar <i>et al.</i> (1982)	<i>Rhizobium trifolii</i>	Sol	1984)
Muthukumar <i>et al.</i> (1983)	<i>Rhizobium japonicum</i>	Sol	Dénitrification (Daniel <i>et al.</i> 1980)
Muthukumar <i>et al.</i> (1982)	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Sol	Denitrification incomplète (Cabrera <i>et al.</i> 2011)
Muthukumar <i>et al.</i> (1982)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Sol	Dénitrification (Bourguignon 1987)
de Felipe (2010)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sol	Dénitrification (Yarullina <i>et al.</i> 2006)
Jeffrey <i>et al.</i> (1972)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (Zumft <i>et al.</i> 1997)
Lewis <i>et al.</i> (1969)	<i>Pseudomonas</i> sp. A3-8	Sol	Dénitrification possible (Zumft <i>et al.</i> 1997)
Lewis <i>et al.</i> (1969)	<i>Pseudomonas</i> sp. A3-12	Sol	Dénitrification possible (Zumft <i>et al.</i> 1997)
Lewis <i>et al.</i> (1969)	<i>Pseudomonas</i> sp. L	Sol	Dénitrification possible (Zumft <i>et al.</i> 1997)
Wang <i>et al.</i> (2013)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (Zumft <i>et al.</i> 1997)
Gajendiran <i>et al.</i> (1988)	<i>Rhizobium</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (Casella <i>et al.</i> 1984)
Wang <i>et al.</i> (2013)	<i>Burkholderia</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (King 2006)
Wang <i>et al.</i> (2013)	<i>Variovorax</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (Im <i>et al.</i> 2010)
Wang <i>et al.</i> (2013)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Sol	Dénitrification possible (Yu <i>et al.</i> 2009)
Wang <i>et al.</i> (2013)	<i>Pandora</i> sp.	Sol	Pas de dénitrification répertoriée

Les bactéries dénitrifiantes représentent 10 à 15% des bactéries du sol (Casella & Payne, 1996; Bothe *et al.*, 2006), soit une minorité au sein de la communauté totale du sol. Il est donc étonnant que parmi les études répertoriant des bactéries capables de dégrader la catéchine entre 45 et 95% soient des dénitrifiants (Table 8). Pour affiner ce pourcentage, il faudrait disposer des souches pour vérifier leur capacité à dénitrifier. Cette capacité pourrait être le

résultat d'une forte pression de sélection des procyanidines sur les bactéries dénitrifiantes. *Fallopia* spp. n'étant pas la seule espèce végétale à produire des procyanidines (Rausher, 2006) cette pression de sélection aurait pu s'opérer chez d'autres espèces productrices de procyanidines.

D'autre part, il est intéressant de noter que les bactéries qui dégradent la catéchine, la transforment en acide protocatéchique (Bhat *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2013) qui est un composé décrit comme pouvant avoir des effets importants sur les plantes. En effet il a été d'un part répertorié comme une substance phytotoxique notamment capable d'inhiber la production végétale en solution, entraînant une diminution de la production de masse sèche totale (40%) même à faible concentration (50 µg. ml⁻¹) (Stupnicka-Rodzynekiewicz *et al.*, 2006). D'autre part, Alsaadawi *et al.* (1986) montre qu'une exposition à l'acide protocatéchique pouvait réduire la production de la chlorophylle *a* et de la chlorophylle totale chez *Vigna unguiculata*. Wang *et al.* (2013) ont pu également démontrer que la dégradation de la catéchine par des bactéries de la rhizosphère de *Rhododendron formosanum* conduisait à la formation d'acide protocatéchique capable d'inhiber la germination des graines de la plante. La dégradation de la catéchine pourrait donc être un phénomène de contre-offensive sélectionné chez les bactéries dénitrifiantes dans le cadre d'une compétition avec la plante, suggérant la mise en place d'une course à l'armement entre ces deux entités.

Ce mécanisme de sélection pourrait illustrer un phénomène de forte coévolution compétitive qui pourrait s'appliquer aux bactéries dénitrifiantes et les plantes productrices de procyanidines comme le complexe d'espèce *Fallopia* spp..

Conclusion

Dans cette étude nous présentons des résultats suggérant de fortes interactions entre *Fallopia* spp. et le groupe fonctionnel des bactéries dénitrifiantes. Nos résultats suggèrent une forte spécificité d'inhibition de la dénitrification par les procyanidines, et que la sélection de bactéries dénitrifiantes résistantes aux procyanidines pourrait être favorisée dans les environnements où la compétition entre bactéries dénitrifiantes et plantes productrices de procyanidines comme *Fallopia* spp. est intense. Cette résistance pourrait résulter de la capacité des bactéries dénitrifiantes à dégrader les procyanidines entraînant la production d'acide protocatéchique, ayant montré des propriétés phytotoxiques, en contre-offensive.

Cette étude nous amène à formuler l'hypothèse d'une coévolution compétitive entre bactéries dénitrifiantes et plantes productrices de procyanidines comme le complexe d'espèce *Fallopia* spp. ayant conduit au cours de l'évolution à la mise en place d'une course à l'armement.

Dans la continuité de ce travail, nous avons prévu de caractériser la communauté capable de dégrader la catéchine des sols. Afin, de savoir si oui ou non, la communauté capable de dégrader les procyanidines regroupe majoritairement des dénitrifiants. Pour cela nous envisageons de tester la capacité des sols à dégrader les procyanidines en aérobiose et anaérobiose en présence de NO_3 en suivant à la fois la production d'acide protocatéchique et la disparition des procyanidines. Cette expérimentation nous permettra également d'isoler des bactéries capables de dégrader les procyanidines par enrichissement et de déterminer s'il s'agit de dénitrifiants. Enfin, nous envisageons de tester les effets phytotoxiques de l'acide protocatéchique sur *Fallopia* spp., aux concentrations produites par la dégradation des procyanidines dans le sol Ain 11 avec *Fallopia* spp.. Nous pouvons donc nous interroger sur les effets de la production de procyanidines par *Fallopia* spp. sur sa propre croissance.

Partie 5 L'inhibition biologique de la dénitrification profite-t-elle à *Fallopia* spp. en participant à ses caractéristiques de croissance exceptionnelles ?

L'inhibition biologique de la dénitrification profite-t-elle à *Fallopia* spp. en participant à ces caractéristiques de croissance exceptionnelles ?

***Corresponding author:**

Florence Piola

Tel : +33472431379

Email: florence.piola@univ-lyon1.fr

Introduction

Nous l'avons démontré dans les parties précédentes, l'existence du BDI est bien réelle. Il s'agit d'un processus spécifique par lequel *Fallopia* spp. va, en libérant des procyanidines dans les sols, réduire le processus de dénitrification. Néanmoins, les implications de l'inhibition de la dénitrification chez *Fallopia* spp. restent inconnues. Nous savons que *Fallopia* spp. peu libérer des procyanidines dans les sols par l'intermédiaire de sa litière (Tharayil *et al.*, 2013). Nous avons donc décidé de tester à la fois l'effet de la litière et des procyanidines sur la croissance de *Fallopia* spp..

Dans cette partie nous exposons la démarche expérimentale suivie afin de démontrer l'effet du BDI impliquant les procyanidines sur la croissance de *Fallopia* spp. ainsi que sa nutrition azotée. Il s'agit de tester si l'inhibition de la dénitrification par des procyanidines apportées au sol ou libérées par la litière de *Fallopia* spp. peut entraîner une augmentation de la quantité de NO₃ disponible pour la plante et ainsi modifier ces caractéristiques de croissance ?

Cette expérimentation a été commencée à la fin de cette thèse. Les données n'ont donc pas encore été analysées. Dans cette partie nous vous présenterons uniquement le design expérimental et les résultats attendus.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Le sol pour cette expérience a été prélevé sur le site Ain11 (45°57'53"N; 5°15'25"E) en bord de rivière hors de la zone où *Fallopia* spp. pousse, sur une profondeur de 0 à 15 cm en 4 endroits différents. Le sol a ensuite été tamisé (2 mm) afin de l'homogénéiser et de le débarrasser de ses débris végétaux et organiques puis stockés à 4°C afin de conserver ses propriétés biologiques.

Les procyanidines utilisées dans cette étude sont des procyanidines commerciales purifiées (Laffort, Bordeaux, France) précédemment utilisées dans les parties 2 et 4. Le génotype de *Fallopia* utilisé est *Fallopia x bohemica* 2. Des rhizomes de *F. x bohemica* 2 ont été plantés dans des pots de 75 litres avec du terreau (Klasmann TS3/sand, 80/20). Les plantes ont été mises en culture pendant 9 mois sous lampes horticoles dans une serre chauffée à 21°C afin

de disposer de suffisamment de rhizomes ayant tous eux des conditions de développement identiques pour minimiser la variance due à la plante.

2. Dispositif expérimental

Nous avons différencié 3 types de traitement du sol : contrôle = aucun ajout au sol ; procyanidines = ajout de 1 mg de procyanidines .g⁻¹ de sol sec équivalent ; litière = 1 mg de procyanidines équivalent en masse de litière .g⁻¹ de sol sec équivalent. Les procyanidines ont été ajoutées en poudre et la litière broyée avant ajout. Les sols ont ensuite été homogénéisés par quartage. Après traitement, les sols (200 g équivalent sec) ont été ajoutés à des pots en verre « Le parfait » de 750 ml (Le parfait, Villeurbanne, France) préalablement remplis avec 45 g de perlite et comprenant un tuyau de 20 cm de long et 16 mm de diamètre afin d'assurer un arrosage par le fond des pots pour éviter un lessivage du sol. Deux expériences ont été menées. Une première où les sols traités ont été laissés nus et une deuxième où un rhizome de *F. x bohemica* 2 de masse comprise entre 0,6 et 0,7 g et présentant un seul bourgeon a été planté dans chaque pot.

Dans le cas de l'expérience avec les sols laissés nus, chaque traitement a été réalisé en 5 répliques et dans le cas de l'expérience avec les plantes, chaque traitement a été réalisé en 20 répliques. Les pots ont été placés de manière aléatoire et répartis en 10 blocs différents en serre à 21 °C sous des lampes horticoles pendant 38 jours. La taille des plantes a été mesurée tous les 2 jours dès le début de l'expérience. L'humidité des sols a été maintenue constante en réajustant tous les 2 jours par le tuyau le niveau d'eau des pots afin que la lame d'eau soit toujours au niveau de la frontière entre perlite et sol (Fig. 43).

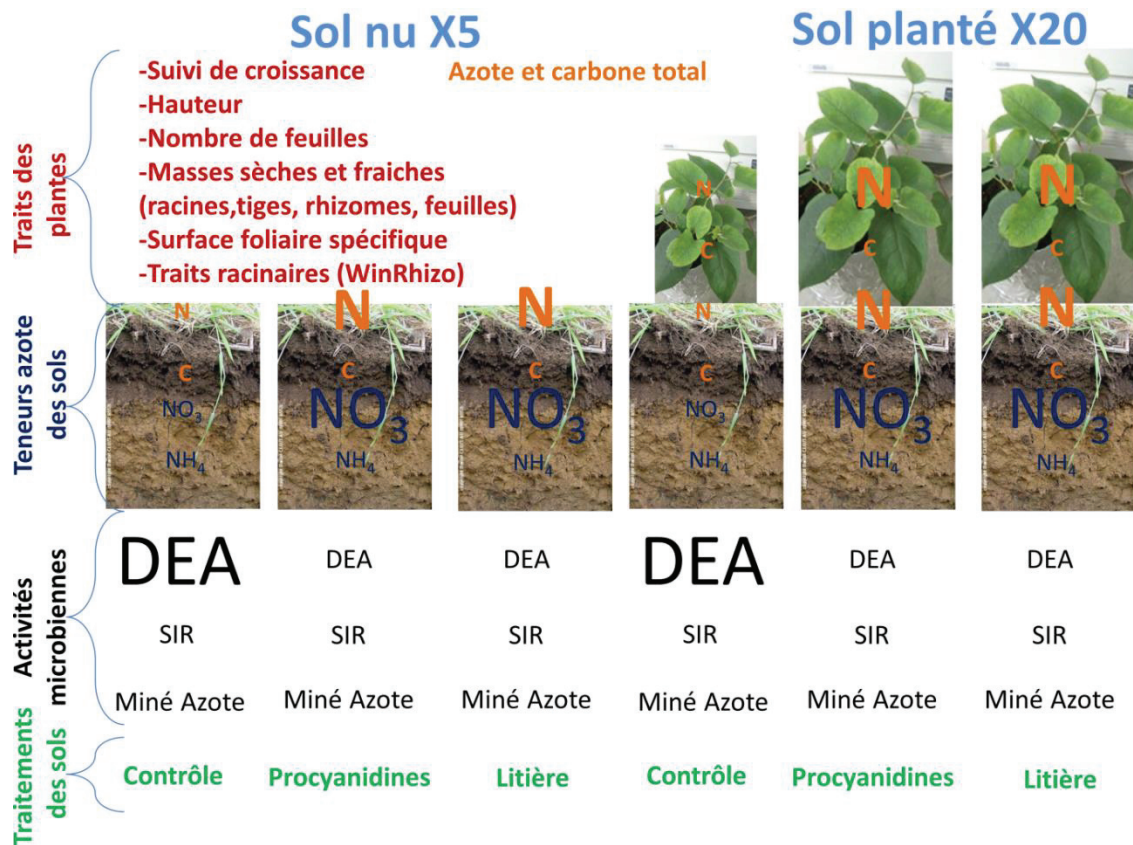


Figure 43 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation ainsi que les hypothèses sur les résultats attendus. La taille de police différencie des quantités ou des niveaux d'activité différents attendus avec une plus grande police qui désigne soit une plus grande quantité soit une plus forte activité.

3. Mesures expérimentales

Afin de réaliser les différentes mesures sur le système, nous avons récupéré les sols nus et les sols dans lesquels se développait *Fallopia* spp.. Les activités biologiques des sols ont été réalisées sur sol frais directement après la récolte. Des aliquotes des sols ont également été congelé à -20°C notamment pour le bilan azoté et d'éventuelles caractérisations des communautés microbiennes.

a. Activités microbiennes

Afin de déterminer l'effet des procyanidines et de la litière sur les communautés microbiennes des sols, nous avons mesuré les activités microbiennes suivantes: la dénitrification potentielle (DEA), la respiration potentielle (SIR) et la minéralisation de l'azote par production de NH_4 et NO_3 au cours du temps sur les deux expérimentations (sol non planté et sol planté). Les techniques et méthodologies employées sont celles présentées précédemment (Partie 1, 2 et 4)

b. Traits morphologiques des plantes

Afin de déterminer les effets de l'inhibition de la dénitrification sur la croissance de *Fallopia* spp. nous avons mesuré la hauteur de la partie aérienne et le nombre de feuille sur chaque plantes tous les 2 jours. Au bout des 38 jours de croissance des plantes, nous avons mesuré les traits racinaires (*i.e.* WinRhizo) ainsi que les traits foliaires (*i.e.* WinFolia) des plantes. La masse fraîche des différentes parties des plantes a été mesurée. Ces différentes parties ont été ensuite lyophilisées afin de déterminer leur masse sèche sans endommager leurs constituants pour le dosage de l'azote et du carbone total par analyseur élémentaire.

c. Bilan azoté

Afin de déterminer l'impact de l'ajout des procyanidines ou de la litière de *Fallopia* spp. sur le bilan azoté nous avons dosé la quantité de NO_3 et de NH_4 des sols en début et fin d'expérience. Nous prévoyons également de doser l'azote total et le carbone total des plantes (*i.e.* racines, rhizome, feuilles) et des sols (début et fin d'expérience). Le nitrate contenu dans les plantes sera également dosé

II. Résultats attendus et avancée de l'expérimentation

L'ajout de procyanidines et de litière de *Fallopia* spp. devrait avoir pour effet de limiter les pertes en NO_3 des sols en réduisant la dénitrification mais sans affecter ni la SIR ni la minéralisation de l'azote. Ceci, aurait pour conséquence de promouvoir la croissance des plantes poussant dans les sols avec procyanidines et litière. La limitation des pertes en azote du système sous l'effet des procyanidines ou de la litière augmenterait la quantité d'azote des sols et des plantes par rapport au contrôle sans procyanidines sans modifier le pool de carbone de ces mêmes compartiments.

L'expérience a été réalisée. Les différents échantillons biologiques ont été prélevés et une partie des dosages ont été réalisés (Fig. 44). Néanmoins, à cause d'une panne d'un appareillage tous les dosages n'ont pu être réalisés et de ce fait l'analyse des données n'a pu être finalisée pour le moment.

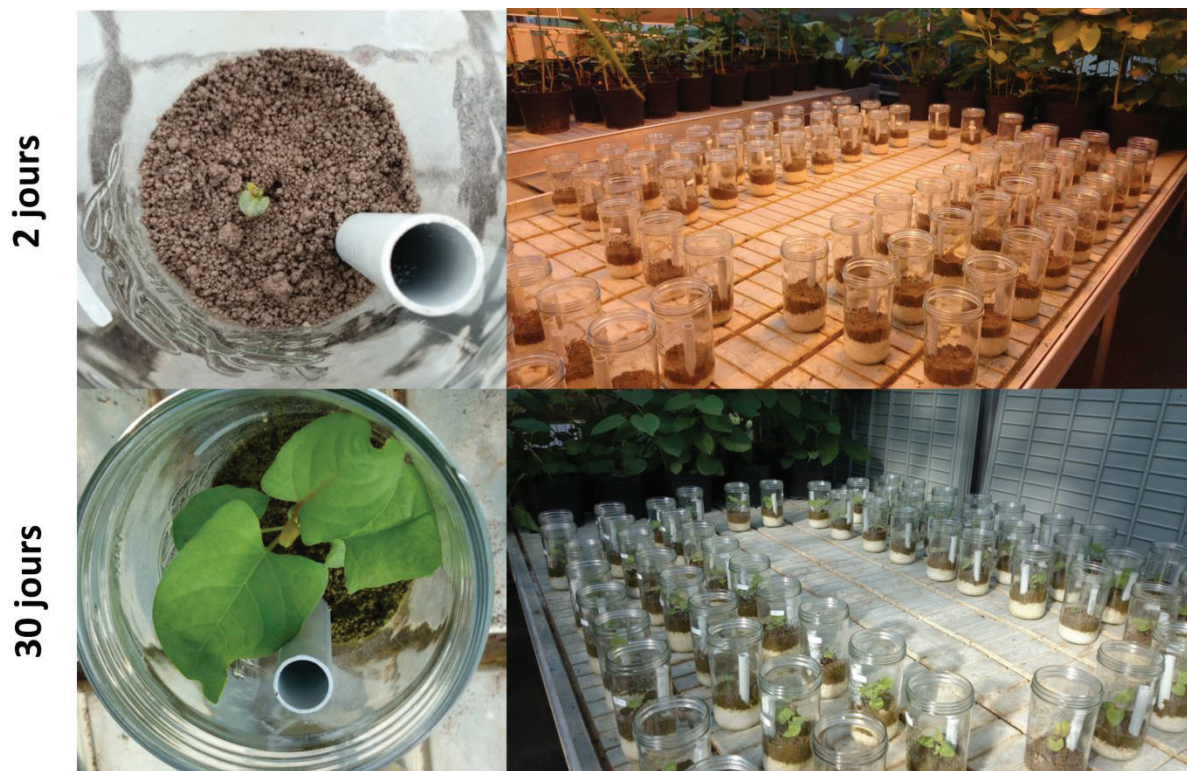


Figure 44 : Photographies montrant l'avancée de l'expérience à 2 et 30 jours.

Conclusion

Démontrer le retour à la plante du BDI dans le cadre des théories du « plant-soil feedback » représente un enjeu important mais difficile à mettre en œuvre. L'analyse des résultats étant toujours en cours, nous ne pouvons pas démontrer pour le moment que l'inhibition de la dénitrification par les procyanidines de *Fallopia* spp. influence positivement la croissance de la plante. Mon année en tant qu'ATER au sein de la même équipe me permettra de terminer ces travaux déjà bien amorcés.

Discussion générale

Cette thèse qui explore le phénomène d'inhibition biologique de la dénitrification bactérienne par le complexe d'espèce *Fallopia* spp. (Fig. 45) a pour objectifs de :

1-déterminer si la réduction de la dénitrification dans les sols envahis par *Fallopia* spp. résulte de la libération de métabolites secondaires ciblant spécifiquement les bactéries dénitrifiantes illustrant le concept que nous avons défini comme l'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) (Bardon *et al.*, 2014). (Chapitre 2, Partie 1)

2- d'identifier les composés impliqués dans le BDI. (Chapitre 2, Partie 2)

3-d'identifier les mécanismes du BDI par ces composés. (Chapitre 2, Partie 3)

4-d'étudier les interactions particulières entre bactéries dénitrifiantes et *Fallopia* spp. afin d'explorer les processus de coévolution entre ces deux entités. (Chapitre 2, Partie 4)

5-de déterminer si le BDI pouvait être profitable pour *Fallopia* spp. et participer à ses caractéristiques de croissance exceptionnelles et à son pouvoir invasif. (Chapitre 2, Partie 5)

Au cours de ces trois années de travail, nous avons pu répondre aux quatre premiers objectifs et amorcer les travaux autour du cinquième dont les résultats sont en cours d'analyse et d'interprétation.

Dans cette discussion générale, les résultats présentés dans les précédentes parties du manuscrit ne sont pas rediscutés afin d'éviter la redondance. Mais les résultats de cette thèse, synthétisés dans la figure 45 sont discutés dans le contexte général des inhibitions biologiques des processus du cycle de l'azote afin de repositionner et comparer nos résultats sur la dénitrification aux connaissances disponibles sur d'autres fonctions clés du cycle de l'azote.

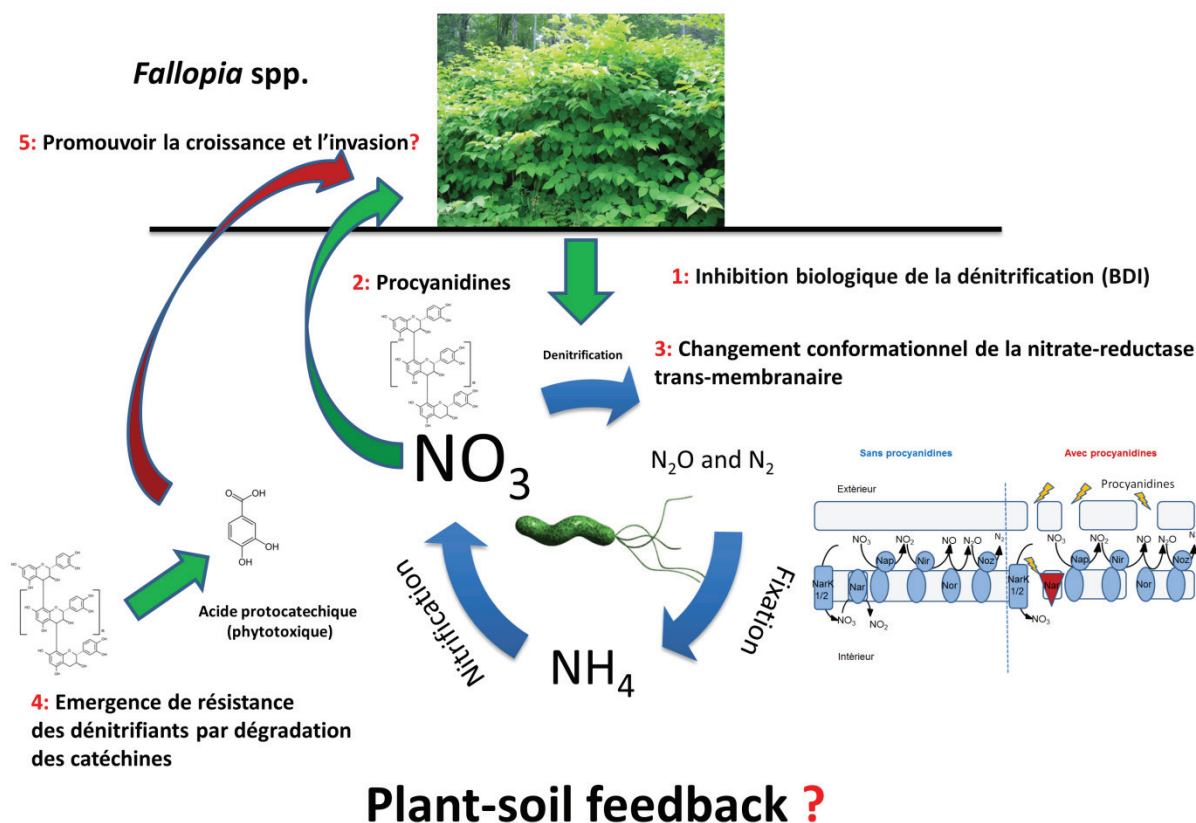


Figure 45: Schéma conceptuel du sujet de thèse après trois ans de recherche. Les numéros correspondent aux 5 parties du Chapitre 2.

I. Les concepts d'inhibition biologique des différents processus du cycle de l'azote : même histoire, même cheminement scientifique ?

Le premier cas d'inhibition biologique formulé en tant que tel, a été défini par Subbarao *et al.* (2006a; 2007a; 2009) comme inhibition biologique de la nitrification (BNI) par opposition à l'inhibition par des composés chimiques de synthèse comme l'allylthiourée (ATU). La découverte des phénomènes d'inhibition de la nitrification a été amorcée par la découverte d'espèces végétales réduisant la nitrification des sols et souvent poussant dans des sols peu fertiles (Ishikawa *et al.*, 2003; Lata *et al.*, 2004). Ainsi, les poacées *Brachiaria humidicola* et *Hyparrhenia diplandra* étaient connues pour pousser dans des sols de savane peu fertiles et capable d'y réduire le processus de nitrification. Subbarao *et al.* (2009), après leurs études qui donnèrent le nom au concept de BNI, ont identifié une molécule, la brachialactone produite

par *Brachiaria humidicola*, qui a la capacité d'inhiber le processus de nitrification chez une souche bactérienne, *Nitrosomonas europaea* à de faibles concentrations (0,002 mg.ml⁻¹). Néanmoins, un grand nombre de molécules de familles chimiques différentes et capables d'inhiber la nitrification avaient été identifiées avant la dénomination du concept de BNI (Bremner & McCarty, 1988; Bending & Lincoln, 2000) et depuis, les découvertes continuent d'affluer autour de ce sujet (Subbarao *et al.*, 2013a; Tesfamariam *et al.*, 2014). Le paradigme du BNI a été synthétisé sept ans après sa première formulation par Subbarao *et al.* (2013b) et, il est aujourd'hui bien accepté au sein de la communauté scientifique. *A contrario*, un concept pas encore défini dans ces termes dans la littérature scientifique est le concept d'inhibition biologique de la minéralisation de l'azote (Biological Nitrogen-Mineralization Inhibition ; BNMI). Au même titre que le BNI, les découvertes d'inhibiteurs de la minéralisation de l'azote ont été amorcées par la découverte d'espèces végétales connues pour réduire ce processus dans les sols (Rauber *et al.*, 2008; Heumann *et al.*, 2011b; Dietz *et al.*, 2013; Heumann *et al.*, 2013). Cependant, bien que l'existence d'inhibiteurs de la minéralisation de l'azote des sols soit connue depuis longtemps (Mishra & Flaig, 1979; White, 1991; Schimel *et al.*, 1998) et que, de nouveaux inhibiteurs sont toujours découverts (Heumann *et al.*, 2011a; Dietz *et al.*, 2013; Heumann *et al.*, 2013), jamais le sujet n'a fait l'objet d'une conceptualisation et d'un engouement aussi important que le concept BNI, probablement parce que la majorité des inhibiteurs de la minéralisation est considérée comme des substances antimicrobiennes générales ne présentant pas d'activité spécifique (Heumann *et al.*, 2013). Ainsi, les mécanismes d'inhibition de la minéralisation de l'azote des sols par la libération de composés ciblant spécifiquement ce processus restent encore méconnus (Dietz *et al.*, 2013). Les études, autour de la réduction de la minéralisation de l'azote par les plantes ont surtout porté sur la séquestration de la matière organique par des tannins. Il est encore difficile d'établir si cette inhibition est spécifique ou non car, bien que la minéralisation du carbone et la nitrification soient affectées (Kraus *et al.*, 2003; Nierop *et al.*, 2006; Kraal *et al.*, 2009), nous ne pouvons pas exclure notamment pour la nitrification que cet effet soit indirect et découle de la réduction de la disponibilité en substrat (*i.e.* NH₄). Il est intéressant de noter que la plupart de ces démonstrations ont été réalisées avec de fortes concentrations en tannins de 5 à 10 mg. g⁻¹ de sol sec ou 10 mg.ml⁻¹ en suspension de sol (Kraus *et al.*, 2003; Nierop *et al.*, 2006). Seuls des travaux plus récents sur certains terpènes comme le β-sitosterol montrent une inhibition spécifique du processus de minéralisation de l'azote à de faibles concentrations (*i.e.* 0,1 mg. g⁻¹ de sol sec) sans affecter la minéralisation du carbone ou la nitrification (Adamczyk *et al.*, 2011; Heumann *et al.*, 2013).

Le concept de BDI proposé dans cette thèse fait le parallèle avec celui de BNI. Comme pour les travaux sur la mise en évidence du BNI, l'existence du BDI a été suspectée par l'observation d'espèces végétales réduisant la dénitrification dans les sols où elles poussaient. Les travaux de Dassonville *et al.* (2011) ont mis en évidence une réduction de la dénitrification des sols envahis par *Fallopia* spp. en comparaison des sols en périphérie non-envahis, et ceci sans lien direct avec des modifications des principaux facteurs proximaux jusqu'à l'heure connus pour influencer la dénitrification des sols comme le niveau d'oxygénation, la disponibilité en nitrate ou en source de carbone (Wallenstein *et al.*, 2006). Comme pour les plantes à l'origine de la découverte du BNI, le complexe d'espèce *Fallopia* spp. est connu pour sa capacité à coloniser des sols pauvres en azote comme les laves du Mont Fuji et, pour grandement augmenter la disponibilité en azote dans ces sols (Hirose & Tateno, 1984; Adachi *et al.*, 1996). Jusqu'à présent, bien que différents travaux montrent des niveaux de dénitrification très variables d'une espèce de plante à l'autre, (Kakuda *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Angeloni *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013), ces différences étaient mises sur le compte de la disponibilité en NO₃, en composés carbonés ou en oxygène. Aucune de ces études ne s'était intéressée à l'existence de métabolites secondaires libérés par les plantes qui pourraient expliquer les modifications du processus de dénitrification observées. Les difficultés rencontrées pour mesurer au voisinage des racines, les trois principaux facteurs proximaux régulant la dénitrification à cause de leur fluctuation temporelle et spatiale ont certainement contribué à éluder la possibilité de l'existence de la BDI. Les résultats de l'étude de Dassonville *et al.* (2011) et la capacité de *Fallopia* spp. à coloniser des environnements peu fertiles ont fortement suggéré l'existence d'inhibiteurs biologiques du processus de dénitrification produits chez ces plantes. Néanmoins, contrairement à la communauté nitrifiante des sols, qui ne concerne que trois genres microbiens caractéristiques (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*) (Bothe *et al.*, 2006), les dénitrifiants au même titre que la communauté responsable de la minéralisation de l'azote sont très diversifiés. En effet, la communauté des microorganismes dénitrifiants regroupe des champignons, des archées et des bactéries (Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997; Philippot, 2002). Néanmoins, malgré cette grande diversité, la majorité de la dénitrification des sols est réalisée par les bactéries dénitrifiantes (Cheneby *et al.*, 1998) connues pour être très diversifiées puisqu'on les retrouve à la fois chez de nombreux genres de Protéobactéries (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*...) mais aussi chez des Firmicutes (*Bacillus*, *Jonesia*...) (Zumft, 1997). Cette diversité laissait certains scientifiques sceptiques sur l'existence de mécanismes spécifiques d'inhibition de la dénitrification efficaces sur

l'ensemble de ces microorganismes présentant des physiologies extrêmement variées (organotrophes, phototrophes, lithotrophes, fermentaires, thermophiles, psychrophiles, fixateurs d'azote...). C'est probablement aussi pour cette raison que le BDI n'avait jusqu'à ce jour jamais été exploré. Cependant, malgré cette grande diversité de microorganismes capables d'accomplir la dénitrification, les enzymes de la dénitrification (nitrate réductases, nitrite réductases, oxyde nitrique réductase et oxyde nitreux réductases) sont relativement bien conservées entre tous ces organismes (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006) ce qui pourrait permettre à certains composés inhibiteurs d'avoir une ou des cibles similaires chez les différents dénitrifiants. Si les enzymes sont bien les cibles des inhibiteurs, cela pourrait expliquer l'existence du BDI identifié chez le complexe d'espèces invasives *Fallopia* spp. (Fig. 44 n°1).

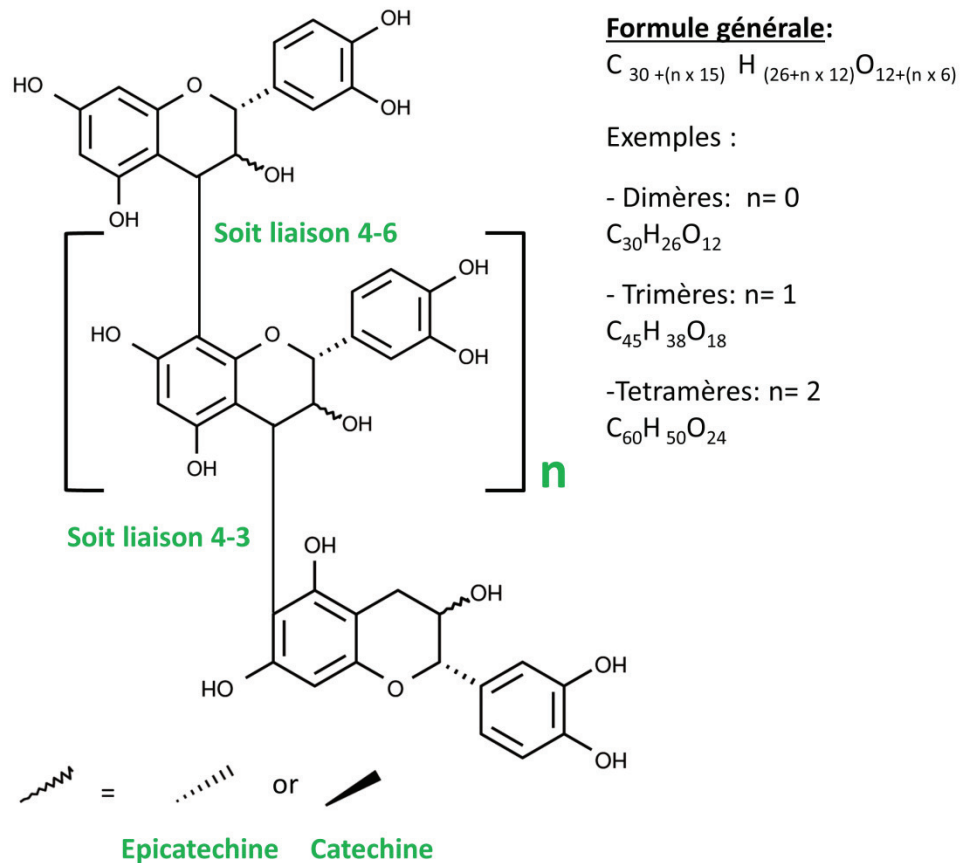


Figure 46: Structure chimique générale des procyanidines de type B. Ce qui est en vert représente les structures variables dans cette structure moléculaire générale des procyanidines. Les Procyanidines sont des polymères de catéchine et d'epicatechine reliées par des liaisons covalentes C-C en position 4-6 ou 4-3 (Lazarus *et al.*, 1999).

Contrairement à ce qui a été démontré pour la nitrification ou la minéralisation de l'azote, où plusieurs composés de plantes (brachialactone, sorgoleone, sakuranetine, β -sitostérol, acide

abiétique...) peuvent exister et agir de manière spécifique et à de faibles concentrations, pour la dénitrification seules les procyanidines de type B (Partie 3, 4 et 5) ont été à ce jour identifiées comme composés actifs (Fig. 46). Mais à la vue des données actuellement disponibles sur la nitrification et la minéralisation, il n'est pas impossible qu'ultérieurement d'autres composés ayant le même effet sur la dénitrification soient découverts. La similarité de ces phénomènes d'inhibition entre différents processus du cycle de l'azote montre donc que ce phénomène d'inhibition n'est pas un cas isolé, nous pouvons donc nous questionner sur l'origine de ces phénomènes.

II. Inhibition des processus du cycle de l'azote par les plantes : phénomènes fortuits ou sélectionnés ?

Pour répondre à cette question, plusieurs éléments peuvent être pris en compte comme par exemple le niveau de spécificité et les mécanismes d'action des inhibiteurs qui sont souvent le résultat d'une coévolution entre organismes (Occhipinti, 2013) mais également les mécanismes de régulation de la production de ces inhibiteurs par les plantes en fonction des conditions environnementales.

1. Spécificité et mécanismes d'action

Dans une étude récente, Adamczyk *et al.* (2011) ont pu montrer que les diterpènes, l'acide abiétique, le colophane et le triterpène, le β -sitostérol pouvaient inhiber la minéralisation de l'azote des sols sans affecter la nitrification de manière directe. Les résultats autour de la spécificité d'action du β -sitostérol sur la minéralisation de l'azote ont également été par la suite confirmés en testant ces effets sur la minéralisation du carbone (Heumann *et al.*, 2013) (Fig. 47). Le β -sitostérol ne semble affecter ni la minéralisation du carbone ni la nitrification des sols de manière directe (Adamczyk *et al.*, 2011; Heumann *et al.*, 2013). Il s'agirait donc bien d'un inhibiteur spécifique de la minéralisation de l'azote. Pour les inhibiteurs de la nitrification aucune étude ne révèle de spécificité d'inhibition de la nitrification en comparaison à d'autres activités. Néanmoins, Gopalakrishnan *et al.* (2009) démontrent que les exsudats de *B. humidicola* ont un pouvoir sélectif particulier sur les bactéries oxydantes de l'ammonium (AOB) et les bactéries oxydantes du nitrite (NOB). En effet, Gopalakrishnan *et al.* (2009) démontrent que l'ajout d'exsudats de *B. humidicola* à un Cambisol entraîne une réduction des AOB et des NOB cultivables au bout de 15 jours ainsi qu'une augmentation des

Pseudomonads et des bactéries totales cultivables au sein de ce sol. Dans la même étude, les auteurs démontrent en culture pure que les exsudats de *B. humidicola* réduisent la croissance de *N. europaea* mais pas de bactéries non-nitrifiantes, *Azospirillum lipoferum*, *Rhizobium leguminosarum* et *Azotobacter chroococcum*. Ces résultats démontrent clairement une spécificité d'inhibition des exsudats de *B. humidicola* sur les bactéries nitrifiantes.

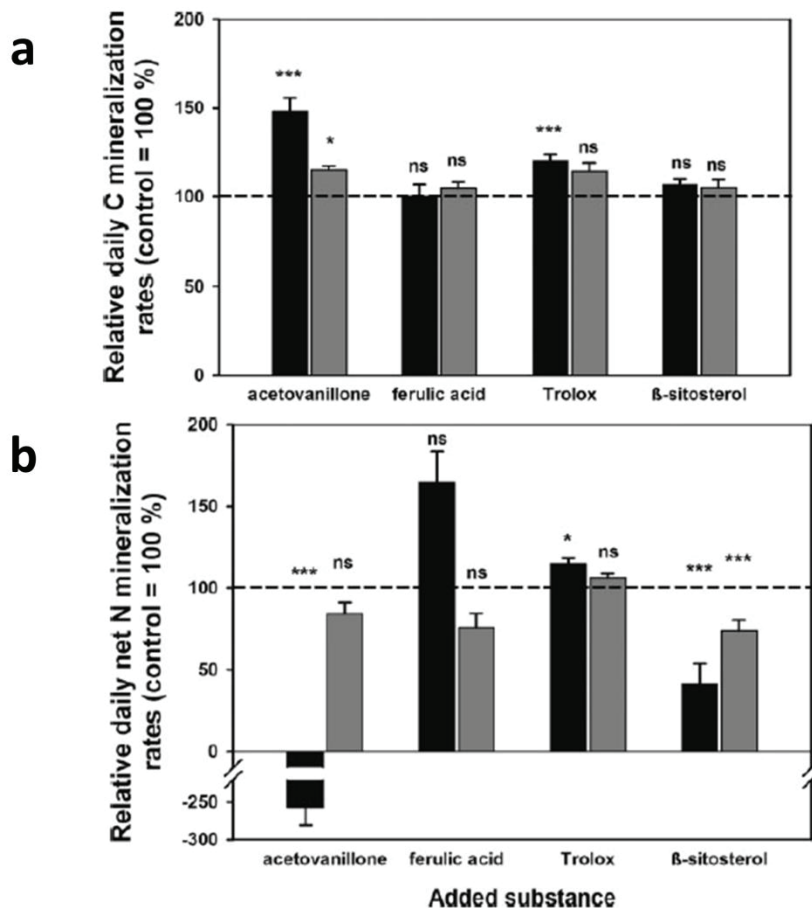


Figure 47: Graphique illustrant l'effet de quatre composés, l'acétovanillone, l'acide ferulique, le trolox et le β-sitostérol sur a) la minéralisation du carbone et b) la minéralisation de l'azote au bout de 7 jours (noir) et 14 jours (gris). Moyennes et erreurs standard. Les différences significatives avec le contrôle sont indiquées par *** (p < 0.001), ** (p < 0.010), * (p < 0.050), and ns (non significatif). D'après Heumann *et al.* (2013).

Dans la partie 4 nous avons démontré une sensibilité supérieure du processus de dénitrification aux procyanidines en comparaison à la nitrification qui n'était pas inhibée. Dans, les parties 2 et 3 nous avons également pu démontrer une plus forte sensibilité aux procyanidines du processus de dénitrification en comparaison du processus de respiration aérobie chez les bactéries dénitrifiantes. Ces résultats démontrent clairement la spécificité d'inhibition des procyanidines du processus de dénitrification bactérienne. Ces effets spécifiques des inhibiteurs sur les activités ou le développement des microorganismes

suggèrent que ces inhibiteurs pourraient agir en ciblant spécifiquement les voies enzymatiques de la minéralisation, la nitrification ou la dénitrification. Les effets de certains inhibiteurs sur les voies enzymatiques ont été étudiés seulement dans le cas du BNI. L'acide linoléique, l'acide linoléique et la brachialactone, retrouvés chez *B. humidicola* semblent cibler les voies enzymatiques de la nitrification en inhibant à la fois l'ammonia monooxygénase (AMO) et l'hydroxylamino oxydoréductase (HAO) (Subbarao *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009). Bien qu'aucune étude ne se soit intéressée à l'effet de ces inhibiteurs sur la transcription ou la traduction des gènes impliqués dans la nitrification, ces inhibiteurs semblent cibler directement les voies enzymatiques de la nitrification. En ce qui concerne le BDI, dans la partie 3 nous avons pu démontrer que les procyanidines ciblent spécifiquement le NO₃-réductase transmembranaire (Nar) de *P. brassicacearum*, en modifiant sa structure conformationnelle par leur action sur les membranes (Fig. 44 n°3 et 48). Ainsi, que ce soit pour la nitrification ou la dénitrification, les inhibiteurs ciblent les voies enzymatiques des bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes de manière spécifique. Un mécanisme d'action ciblant la transcription ou la traduction des gènes de la nitrification ou de la dénitrification pourrait être plus vulnérable aux changements génétiques et aux mécanismes de régulation des gènes ou à la diversité d'opérons des gènes de la nitrification ou la dénitrification (Belser, 1979; Norton *et al.*, 2002; Demaneche *et al.*, 2009). Il est probable qu'une cible enzymatique comme la NO₃-réductase transmembranaire ou l'AMO et la HAO soit plus conservée et donc moins vulnérable aux changements génétiques ou à la diversité des nitrifiants et des dénitrifiants, que les voies transcriptionnelles ou traductionnelles très diversifiées chez ces bactéries (Belser, 1979; Norton *et al.*, 2002; Demaneche *et al.*, 2009).

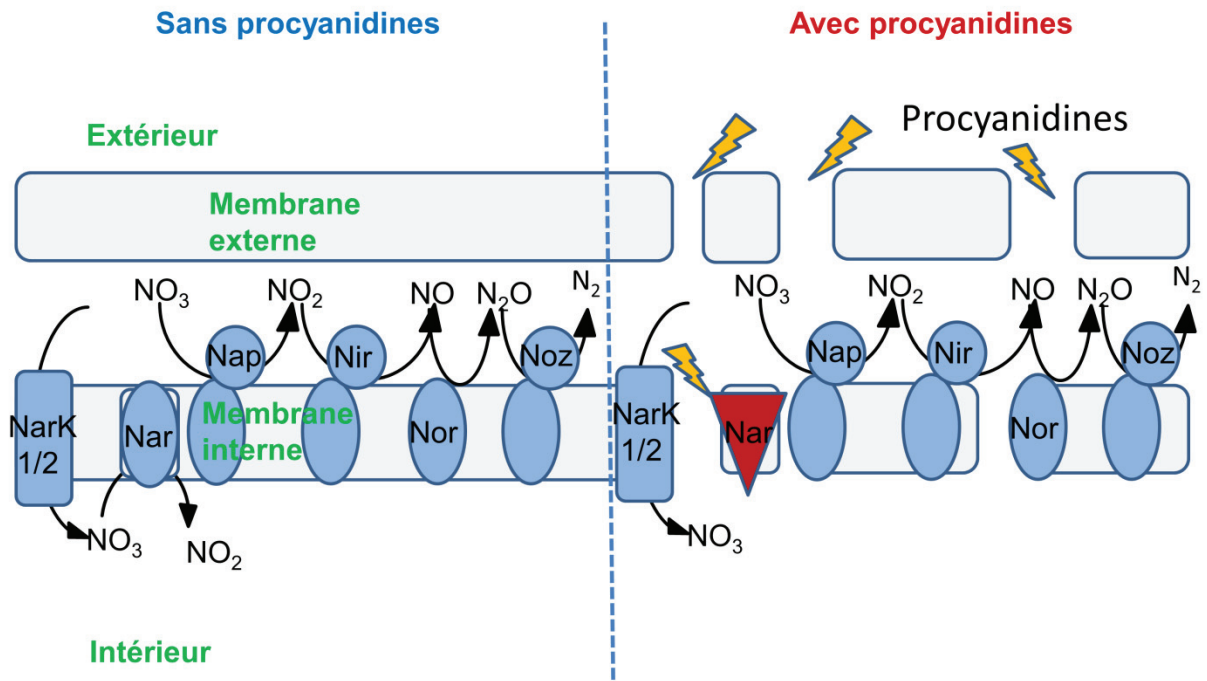


Figure 48: Schéma illustrant le processus d'inhibition de la Nar par les procyanidines de *Fallopiia* spp. chez *P. brassicearum*. Les procyanidines vont perturber la stabilité des membranes bactériennes et entraîner une instabilité dans la structure de la Nar intégrée dans la membrane interne, entraînant des changements conformationnels de l'enzyme et une baisse de son efficacité. (Partie 3)

2. Production d'inhibiteurs chez les plantes

L'existence d'une régulation de la production d'inhibiteurs chez les plantes peut également être un bon indicateur d'un phénomène sélectionné.

Nous n'avons trouvé aucune étude faisant référence à la régulation de la production du β -sitostérol, de l'acide abiatique ou du colophane et encore moins en fonction de la disponibilité en azote. Nous ne pouvons donc discuter autour des mécanismes de régulation de la production de ces composés chez les plantes. Néanmoins, il semble que ces composés soient libérés dans les sols par l'intermédiaire de la litière des conifères (Adamczyk *et al.*, 2011; Heumann *et al.*, 2011a; Heumann *et al.*, 2011b; Heumann *et al.*, 2013). Dans le cas du BNI, il a été clairement démontré que chez *B. humificola*, *Sorghum bicolor* et *Leymus racemosus*, la production de composés inhibiteurs de la nitrification pouvait être régulée par la quantité de NH_4 du milieu (*i.e.* substrat de la nitrification) (Subbarao *et al.*, 2007b; Subbarao *et al.*, 2007c; Zakir *et al.*, 2008). Les plantes poussant avec du NH_4 produisaient d'avantage d'inhibiteurs de la nitrification qu'en présence de NO_3 , probablement afin de limiter les pertes en NH_4 uniquement lorsque celui-ci est présent. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la nitrification par *B. humificola*, *Sorghum bicolor* et *Leymus racemosus* serait un phénomène

très évolué. En effet, en plus de produire un inhibiteur cette plante serait également capable de réguler sa production en fonction des conditions environnementales.

Peu d'études font référence à des effets de la déficience en azote sur la production de métabolites secondaires chez les plantes. Néanmoins, de plus en plus d'études rapportent un effet de la déficience en azote sur l'expression des gènes de plantes impliqués dans la production d'anthocyanines et d'autres flavonol (Hsieh *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2008). La réponse de deux modèles, *Lycopersicon esculentum* (*i.e.* la tomate) et *Arabidopsis thaliana*, a été particulièrement étudiée (Bonguebartelsman & Phillips, 1995; Lea *et al.*, 2007; Feyissa *et al.*, 2009), chez ces deux plantes connues pour produire des procyanidines (Downie *et al.*, 2003; Routaboul *et al.*, 2006). Peng *et al.* (2008), Lea *et al.* (2007), Feyissa *et al.* (2009) et Bonguebartelsman & Phillips (1995) ont pu démontrer que la privation d'azote chez ces deux espèces pouvait entraîner une production 3 à 4 fois plus importante en anthocyanines, précurseurs essentiels dans la synthèse des procyanidines (Marles *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005). Néanmoins, les auteurs stipulent que l'avantage sélectif d'une telle augmentation en condition de déficience azotée reste inconnu. Plus particulièrement, Peng *et al.* (2008), révèlent que la production en anthocyanines répondrait à la teneur élevée en NO_3 (Fig. 49). Ces résultats suggèrent une forte adaptation de ses plantes à la privation d'azote et en NO_3 faisant intervenir des processus de régulation de gènes. L'augmentation de la production en anthocyanines, précurseurs des procyanidines, suggère donc que la production en procyanidines pourrait être surexprimée, chez certaines plantes, en condition de carence azotée ou en NO_3 . Au regard de nos résultats, la dénitrification étant la voie de perte principale en azote sous forme de NO_3 , augmenter la production en procyanidines inhibitrices de la dénitrification pourrait être une réponse hautement adaptée de ces plantes. Donc le BDI, loin d'être une chimère due au hasard, pourrait être un phénomène qui aurait été sélectionné chez certaines plantes comme *Fallopia* spp. du fait de leur capacité à limiter les pertes en azote des sols par la dénitrification.

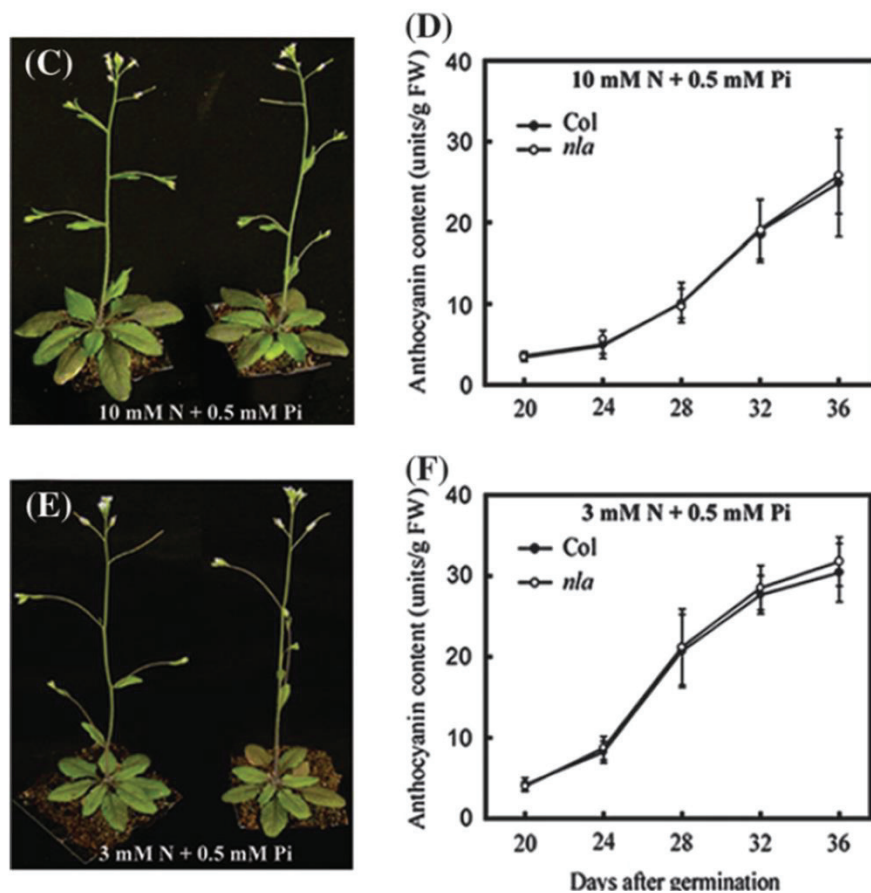


Figure 49: Photographies et graphiques illustrant la surproduction d'anthocyanines dans les feuilles fraîches de la rosette chez *A. thaliana* mises à pousser dans un sol dépourvu de nutriment humidifié par deux types de solutions nutritives qui diffèrent par leur concentration en KNO_3 (C et D = 10 mM KNO_3 ; E et F 3 mM KNO_3); (Col pour Colombia = type sauvage et *nla* = mutant du gène *nla*). D'après (Peng *et al.*, 2008)

Les niveaux de spécificité démontrés notamment pour le BNMI, le BNI et le BDI ainsi que les systèmes de régulations mis en place par les plantes pour la production des inhibiteurs, nous amènent à conclure que ces interactions entre plantes et groupes fonctionnels microbiens du sol ne seraient pas chimériques mais auraient pu être sélectionnées au cours de l'évolution chez certaines plantes au point d'être aujourd'hui hautement perfectionnées. Nous pouvons maintenant nous interroger sur la généralité des phénomènes d'inhibition des processus du cycle de l'azote. En effet, sont-ils des phénomènes répandus, c'est-à-dire strictement réservés à quelques espèces et ne concernant que quelques composés, ou confinés à quelques écosystèmes?

III. Les inhibitions des processus du cycle de l'azote sont-ils des phénomènes répandus ?

Afin de répondre à cette question, plusieurs éléments peuvent être pris en compte comme la diversité des espèces productrices d'inhibiteurs de la nitrification, la diversité de ces composés et leur répartition au sein du règne végétale et enfin les écosystèmes concernés par ces inhibitions.

Subbarao *et al.* (2007a) se sont interrogés sur la diversité des plantes capables d'inhiber la nitrification. Pour répondre à cette question les auteurs ont testé la capacité à inhiber la nitrification chez *N. europaea* en fonction de 18 espèces, 7 poacées de prairies, 6 céréales cultivées et 4 espèces de *Fabaceae* cultivées (Table 9). Ces résultats, montrent que cette capacité à inhiber la nitrification se retrouve essentiellement chez des poacées à l'exception d'*Arachis hypogaea*. D'autres espèces de poacées de prairies ont également été rapportées comme capables de produire des inhibiteurs de la nitrification comme *Leymus racemosus*, *H. dipantra* (Lata *et al.*, 2004; Subbarao *et al.*, 2007b) ou encore des crucifères (Bending & Lincoln, 2000) ou un conifère *Pinus ponderos* (Bremner & McCarty, 1988). Après plusieurs années de travaux sur le sujet, Subbarao *et al.* (2013b) recensent près de 15 inhibiteurs différents de la nitrification, comme le sorgoleone (*Sorgho bicolor*), la brachialactone (*B. humidicola*), l'acide linoléique (*B. humidicola*), l'acide α -linoléique (*B. humidicola*), la sakuranetine (*Sorgho bicolor*), la karanjine (*Pongamia glabra*), le méthyl ferulate (*B. humidicola*), le méthyl p-coumarate (*B. humidicola*), le méthyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate (*Sorgho bicolor*) (Sahrawat, 1981; Gopalakrishnan *et al.*, 2007; Subbarao *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009; Tesfamariam *et al.*, 2014). Ces inhibiteurs n'ont pas les mêmes structures et donc probablement pas de lien évolutif. La sélection de ces inhibiteurs pourrait illustrer un phénomène de convergence évolutive autour du BNI chez une multitude de plantes dont principalement des poacées.

Table 9 : Tableau montrant la capacité des exsudats récoltés chez 18 espèces de plantes différentes à inhiber la nitrification. D'après Subbarao *et al.* (2007a).

Serial no.	Plant species	Total BNI released from four plants (AT units)	Specific BNI (AT units g ⁻¹ root dry wt)
Pasture grasses			
1.	<i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick.	51.1	13.4
2.	<i>B. decumbens</i> Stapf	37.3	18.3
3.	<i>Melinis minutiflora</i> Beauv.	21.4	3.8
4.	<i>Panicum maximum</i> Jacq.	12.5	3.3
5.	<i>Lolium perenne</i> L ssp. <i>Multiflorum</i> (Lam.) Husnot	13.5	2.6
6.	<i>Andropogon gayanus</i> Kunth	11.7	7.7
7.	<i>B. brizantha</i> (A. rich.) Stapf	6.8	2.0
Cereal crops			
8.	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench var. hybrid sorgo	26.1	5.2
9.	<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br. var. CIVT	7.0	1.8
11.	<i>Oryza sativa</i> L. var. Sabana 6	0	0
	<i>Oryza sativa</i> L. var. Toyo	0	0
12.	<i>Zea mays</i> L. var. Peter no. 610	0	0
13.	<i>Hordeum vulgare</i> L. var. Shunrai	0	0
14.	<i>Triticum aestivum</i> L. var. Norin-61	0	0
Legume crops			
15.	<i>Arachis hypogaea</i> L. var. TMV 2	9.4	2.5
16.	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. var. Orinoquia 3	0	0
	<i>Glycine max.</i> (L.) Merr var. Natsuroyosooi	0	0
	<i>Glycine max</i> (L.) Merr non-nodulating type—EN 1282	0	0
17.	<i>Vigna unguiculata</i> (L. Walpers ssp. unguiculata var. Caupi	0	0
18.	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) (Accession G 21212)	0	0
	LSD (0.05)	7.1	2.8

Dans une étude récente, Adamczyk *et al.* (2011) ont pu montrer que les diterpènes, l'acide abiétique et le colophane, et le triterpène, le β -sitostérol pouvaient inhiber la minéralisation de l'azote des sols sans affecter la nitrification de manière directe. Ces composés sont très répandus chez la plupart des conifères et notamment le β -sitostérol qui est le triterpène dominant dans les sols sous conifères (Kanerva *et al.*, 2008). Ils pourraient expliquer l'effet inhibiteur de leur litière sur la minéralisation des sols. Ce processus serait donc répandu chez la plupart des conifères (Adamczyk *et al.*, 2011). Les proanthocyanidines dont font partie les procyanidines sont une classe de molécules très répandue dans le règne végétal depuis les fougères mais à l'exception des *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didiereaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* et *Portulacaceae* et absent des *Bryophyta* (Iwashina, 2000; Dixon *et al.*, 2005). Il s'agit donc d'une famille de molécules très anciennes. Bien que le BDI n'ait été démontré que très récemment, si nous regardons *a posteriori* les informations disponibles dans la littérature sur les niveaux de dénitrification associés aux plantes riches en procyanidines des éléments intéressants peuvent être notés. Par exemple, Eaton & Patriquin (1989) ont montré que les sols sous *Vaccinium angustifolium* présentaient de faibles taux de dénitrification (*i.e.* 0,5 $\mu\text{g N}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec. h^{-1}). Or le genre *Vaccinium* est connu pour produire des procyanidines (Harris *et al.*, 2007). Dans une autre étude, Norris *et al.* (2011) ont montré que l'ajout de procyanidines de *V. myrtillus* (1mg.g⁻¹ de sol sec)

pouvait quadrupler la teneur en nitrate d'un sol nu après 22 jours sans pour autant affecter la teneur en NH_4 . Ces résultats suggèrent que les procyanidines de *Vaccinium* spp. pourraient réduire la consommation/les pertes en NO_3 , sans affecter ni la minéralisation de l'azote ni la nitrification, nous pourrions donc poser l'hypothèse du BDI chez *Vaccinium* comme chez *Fallopia* spp.. Dans une autre étude, Michalet *et al.* (2013) ont suggéré que des composés exsudés par les racines de *Eperua falcata*, un arbre de forêt tropicale pouvait réduire la dénitrification des sols sans affecter le processus de nitrification. En effet, les auteurs ont montré un effet inhibiteur d'extraits racinaires de cette espèce sur l'activité métabolique de bactéries dénitrifiantes mais pas sur les bactéries nitrifiantes testées. Les auteurs ont également révélé une réduction de l'activité de dénitrification normalisée par rapport à la respiration aérobie dans le sol rhizosphérique de cette espèce en comparaison du sol nu. Or, cette espèce a été décrite comme produisant les formes monomériques des procyanidines (*i.e.* catéchine et epicatechine) (Royer *et al.*, 2010) ce qui nous a conduit à soupçonner la production de procyanidines. Des analyses approfondies des profils HPLC-MSMS des extraits racinaires de cette espèce obtenus au laboratoire, nous ont permis de confirmer la présence des procyanidines (résultats non présentés et non publiés) qui pourraient donc être responsables de la réduction de la dénitrification observée au voisinage de cette espèce. Nous pouvons donc fortement supposer que le BDI par les procyanidines est un phénomène répandu chez les végétaux terrestres.

Les phénomènes d'inhibition des processus du cycle de l'azote sont répandus au sein d'une large gamme d'espèces végétales (incluant des conifères, des mono et dicotylédones). Pour le BNI, nous avons apporté précédemment différents arguments permettant de poser l'hypothèse que l'émergence d'inhibiteurs de la nitrification pourrait être un phénomène de convergence évolutive chez un grand nombre de végétaux mais essentiellement des poacées. L'état actuel des recherches autour du BNMI et du BDI étant moins avancé nous ne pouvons conclure sur ce sujet. En revanche, il semble que la nature des inhibiteurs de la dénitrification et de la minéralisation de l'azote soit plus homogène au sein des espèces végétales suggérant un lien de parenté entre ces inhibiteurs. Les premières formes de plantes terrestres comme les fougères étaient très dépendantes à la présence d'eau dans les sols (Pirozynski & Malloch, 1975). Or, les sols saturés en eau sont des sites propices aux fortes pertes d'azote (*i.e.* N_2O et N_2) par dénitrification (Zumft, 1997; Bothe *et al.*, 2006). Il est donc probable qu'aux prémices de la vie terrestre pour les plantes, la compétition entre plantes et microorganismes dénitrifiants ait été très intense. C'est à cette époque que, l'inhibition de la dénitrification

aurait pu apparaître. Ainsi, il est intéressant de noter que les fougères sont le groupe de végétaux terrestres le plus ancien où l'on retrouve des procyanidines (Rausher, 2006) quand on sait leur forte dépendance à l'eau (Pirozynski & Malloch, 1975). La fougère *Pteridium aquilinum* est notamment connue pour produire des procyanidines (Tempel, 1981; Sahayaraj *et al.*, 2009) et est considérée comme l'une des espèces invasives les plus agressives au monde (DeLuca *et al.*, 2013). Dans une étude récente, DeLuca *et al.* (2013) ont pu démontrer que les sols sous *P. aquilinum* pouvaient contenir en moyenne 4 fois plus de NO₃ que sous *Calluna vulgaris* (*i.e.* 4.30 contre 0.97 mg.kg⁻¹ de sol sec) pour 5 sites étudiés et présentaient une dénitrification potentielle 2,5 fois moins élevée (*i.e.* 26 contre 69 µg N-N₂O.g⁻¹ de sol. j⁻¹). Après une période d'incubation de 16 jours, les auteurs ont également observé une accumulation de NO₃ 100 fois plus importante dans le sol de *P. aquilinum* que de *C. vulgaris* mais pas de différence significative de quantités de NH₄. Les auteurs en ont conclu que *P. aquilinum* pourrait augmenter la quantité de NO₃ des sols en stimulant la nitrification des sols or avec les résultats obtenus dans ma thèse, la lecture de leurs résultats laisserait fortement penser à l'existence du BDI chez cette fougère.

A l'inverse de la dénitrification, la nitrification est un processus aérobie. Une compétition intense entre nitrifiants et plantes pour l'ammonium aurait donc pu apparaître plus tardivement chez des plantes émancipées de leur forte exigence en eau. Ceci pourrait expliquer que des inhibiteurs de la nitrification différents aient pu être sélectionnés chez des lignées de plantes différentes. Dans ce cas, ceci illustrerait un phénomène de convergence évolutive dans le cas d'espèces ancestrales soumises aux mêmes contraintes sélectives. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les espèces inhibitrices de la nitrification sont principalement des poacées de prairies poussant en milieu sec comme des savanes et ayant de faibles exigences en eau (*i.e.* *B. humidicola*, *H. diandra*, *L. racemosus* et *S. bicolor*) (Lata *et al.*, 2004; Subbarao *et al.*, 2007b; Subbarao *et al.*, 2009; Tesfamariam *et al.*, 2014) et donc sujettes à un fort lessivage du NO₃ du fait de l'alternance d'épisodes de sécheresse et de ressuyage des sols (Di & Cameron, 2002).

Dans l'état actuel des connaissances, nous constatons donc que les phénomènes d'inhibition sont plus ou moins répandus selon les processus ciblés, probablement parce que leurs études n'en sont qu'à leurs débuts. S'ils sont aussi répandus que nous le suspectons, nous pouvons alors nous demander si les microorganismes peuvent s'adapter à de tels phénomènes.

IV. Réaction des microorganismes aux phénomènes d'inhibition des processus du cycle de l'azote

Nous l'avons vu l'inhibition des processus du cycle de l'azote entraîne une baisse des activités liées au processus du cycle de l'azote chez les microorganismes cibles. Nous pouvons donc nous demander quels sont les effets sur leur développement? Aucune information sur les effets d'inhibiteurs spécifiques de la minéralisation de l'azote sur le développement des microorganismes n'est disponible. En revanche, pour le BNI Subbarao *et al.* (2009) ont pu montrer que la présence de différents génotypes de *B. humidicola* entraîne une réduction des abondances des microorganismes oxydant l'ammonium dans les sols, estimés par la quantification des gènes, *amoA* des bactéries et des archées. En effet, la brachialactone produite par *B. humidicola* est connue pour inhiber les enzymes de la nitrification AMO et HAO de *N. europea*. Cet inhibiteur pourrait, bien que cela n'ait jamais été démontré, également inhiber l'AMO des archées. L'inhibition du processus de nitrification semble donc également affecter le développement des bactéries et archées nitrifiantes. Les nitrifiants sont des organismes chimioolithoautotrophes, le fonctionnement et donc la division cellulaire des bactéries et *Archaeae* nitrifiantes est dépendant du processus de nitrification (Bothe *et al.*, 2006). Il est donc évident que l'inhibition de la nitrification se répercute sur leur développement.

Contrairement aux nitrifiants où l'oxydation de l'ammonium est une fonction vitale, la dénitrification n'est nécessaire que lorsque la disponibilité en oxygène devient limitante (Zumft, 1997). Nous pouvons donc supposer que l'abondance des dénitrifiants dans le sol est moins affectée que celle des nitrifiants. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que, après exposition aux procyanidines en aérobiose, la viabilité cellulaire de *P. brassicacearum* n'était pas directement affectée (partie 3). Dans la partie 1 nous n'avons pas démontré d'effet des composés de *Fallopia* spp. sur les abondances de dénitrifiants (*i.e. nirK* et *nirS*). Dans ce cas, il était difficile de conclure entre l'absence réelle d'effet ou bien à des conditions expérimentales inadéquates pour mettre en évidence la réduction d'abondance. La durée de l'expérience notamment était peut-être trop courte pour pouvoir mettre en évidence des changements des abondances des dénitrifiants à cause de l'inhibition de la dénitrification. Néanmoins, Dassonville *et al.* (2011) ont démontré que *in situ Fallopia* spp. pouvait réduire l'abondance des bactéries dénitrifiantes des sols (*i.e. nirK*) suggérant que les inhibiteurs de la dénitrification en inhibant l'activité de dénitrification pourraient réduire l'abondance des

dénitrifiants dans les sols. Ces résultats a priori contradictoires, peuvent néanmoins s'expliquer par le fait que, les procyanidines ciblent principalement le processus de dénitrification (Partie 2 et 3) qui se déroule en anaérobiose (Zumft, 1997). Ainsi, si les bactéries dénitrifiantes ne sont pas en anaérobiose elles pourraient ne pas être contre sélectionnées.

Nous constatons donc que la présence de ces inhibiteurs n'est pas anodine pour la dynamique des populations qu'ils ciblent, probablement parce que ces inhibiteurs ciblent des processus essentiels chez les microorganismes du cycle de l'azote (cf partie 3). Nous pouvons maintenant nous demander si ces processus d'inhibition et de sélection spécifiques des inhibiteurs ont été sélectionnés parce qu'ils procuraient aux plantes les produisant, un avantage comme le fait de promouvoir leur croissance en limitant les pertes d'azote des sols.

V. Vers la démonstration d'un retour bénéfique pour la plante : l'inhibition biologique des processus du cycle de l'azote dans le cadre des théories du « plant-soil feedback »

La construction de niche est définie comme un processus par lequel les organismes modifient activement leur environnement que ce soit physiquement, chimiquement ou biologiquement. En retour, la constitution et le maintien de telles niches influent sur leur propre évolution et celles des autres organismes présents dans l'écosystème (Day *et al.*, 2003; Odling-Smee, J *et al.*, 2003). Dans le cadre des relations entre les plantes et le sol la construction de niche est définie par le concept de « plant-soil feedback ». Ainsi, dans le cadre du « plant-soil feedback », il est admis que les plantes modifient les conditions du sol et qu'en retour les conditions du sol vont influencer les plantes (Klironomos, 2002; Kulmatiski *et al.*, 2008; van der Putten *et al.*, 2013).

L'azote est souvent considéré comme un des premiers facteurs limitants la croissance des plantes (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008) sa disponibilité est donc d'une importance primordiale pour leur développement. Il semble donc évident de penser qu'une limitation des processus du cycle de l'azote entraînant une conservation de l'azote ou de certaines formes azotées dans les sols puisse être profitable pour les plantes.

-Retour à la plante de l'inhibition de la nitrification

Dans le cadre de l'inhibition de la nitrification les études montrent la réduction d'activité de composés ou d'espèces végétales sur souche pure (Subbarao *et al.*, 2006a; Subbarao *et al.*, 2007a; Subbarao *et al.*, 2008; Subbarao *et al.*, 2009; Tesfamariam *et al.*, 2014), sur communauté nitrifiante de différents sols et sur la teneur en NO₃ (Ishikawa *et al.*, 2003; Lata *et al.*, 2004; Gopalakrishnan *et al.*, 2009) tout en augmentant la disponibilité en NH₄. Mais aucune étude ne montre directement un retour bénéfique pour la plante suite à l'ajout de molécules inhibitrices de la nitrification probablement parce que la purification de molécules inhibitrices en quantité suffisante reste techniquement difficile à mettre en œuvre. Néanmoins, dans une étude intéressante, Boudsocq *et al.* (2009) ont pu modéliser les effets de l'inhibition de la nitrification sur la production primaire d'un écosystème de savane où pousse *H. diplandra*, connue pour inhiber la nitrification des sols (Lata *et al.*, 2004). Les auteurs ont conclu que l'inhibition de la nitrification pourrait augmenter la fertilité des sols, particulièrement dans des situations de fort lessivage du NO₃ et de pertes importantes d'azote par dénitrification. Il serait toutefois intéressant de réaliser une étude expérimentale pour confirmer un feedback positif pour la plante dans le cas du BNI. Une telle expérimentation permettrait de prendre en compte par exemple des effets auto-toxiques possibles de composés inhibiteurs (Wu *et al.*, 2007), des effets toxiques de l'ammonium sur les plantes (Britto & Kronzucker, 2002), ou des effets d'une nutrition carencée en NO₃ sur la production primaire d'*H. diplandra*.

Dans la littérature les scientifiques s'accordent pour dire que la productivité végétale pourrait dépendre fortement du processus de dénitrification (Hattenschwiler *et al.*, 2005). Néanmoins aucune expérimentation ne met en avant les effets bénéfiques d'une réduction de la dénitrification sur la production végétale, peut-être parce qu'il peut paraître évident que s'il y a une réduction des pertes d'azote des sols, cela sera favorable à la plante ou bien parce qu'il y a des contraintes techniques et scientifiques pour démontrer clairement ces effets.

-Méthodes expérimentales et freins techniques pour tester le retour à la plante des inhibitions biologiques du cycle de l'azote

Nous pouvons imaginer deux approches pour tester expérimentalement les effets des inhibitions biologiques des processus du cycle de l'azote sur les plantes. La première serait d'extraire un composé inhibiteur et de tester l'ajout de cet inhibiteur dans le sol sur la croissance des plantes productrices d'inhibiteur. Néanmoins, cette méthode présente un inconvénient majeur. En effet, dans l'hypothèse où les plantes seraient capables de réguler la

production de l'inhibiteur en question en fonction de la quantité en azote disponible dans le sol, l'ajout de l'inhibiteur dans le sol conduirait à une sous production de cet inhibiteur par la plante. Ceci aurait pour effet de ne pas changer les conditions du sol par rapport au contrôle avec plante (donc productrice d'inhibiteur) mais sans ajout expérimental d'inhibiteur. Ainsi, l'ajout expérimental d'inhibiteur dans le sol n'améliorerait pas significativement la croissance des plantes.

La deuxième approche serait d'utiliser un mutant non producteur d'inhibiteur et de comparer ses capacités de croissance avec le type sauvage dans des conditions limitantes ou non en azote (*i.e.* NH_4 ou NO_3). Néanmoins, la construction de tels mutants exige une connaissance parfaite des voies métaboliques de leur production ainsi que de leurs mécanismes de régulation.

Que ce soit dans le cas du BNI ou du BDI peu ou aucune études ont démontré un quelconque feedback positif pour la plante. Tester cette hypothèse reste aujourd'hui difficile car de nombreuses contraintes techniques et des connaissances insuffisantes autour de ces phénomènes nous en empêchent. Elle est néanmoins souvent admise dans toutes les études à ce sujet (Ishikawa *et al.*, 2003; Lata *et al.*, 2004; Subbarao *et al.*, 2006b; Subbarao *et al.*, 2009; Bardon *et al.*, 2014).

Conclusion

En conclusion, nous l'avons démontré dans le cas de la dénitrification, les plantes semblent être capables d'inhiber spécifiquement les processus du cycle de l'azote (*i.e.* minéralisation, nitrification et dénitrification) sans affecter d'autres activités. Ces inhibitions biologiques des processus du cycle de l'azote font intervenir des médiateurs chimiques ayant des mécanismes d'inhibition spécifiques en ciblant les voies enzymatiques. La libération et la production de ces inhibiteurs par les plantes semble être hautement perfectionnées et semble faire intervenir des régulateurs sensibles aux teneurs des formes azotées du sol (*i.e.* NH_4 et NO_3) (Subbarao *et al.*, 2007c; Peng *et al.*, 2008). Ces phénomènes semblent également très répandus chez les végétaux connus pour fortement dépendre de l'azote (Vitousek & Howarth, 1991a; LeBauer & Treseder, 2008). Néanmoins, les effets bénéfiques qu'il en résulte pour les plantes restent à démontrer.

De manière plus large que le BDI, auquel s'est consacrée cette thèse, les plantes pourraient contrôler plusieurs processus du cycle de l'azote (*i.e.* minéralisation, nitrification et dénitrification). Le BNI, le BNMI et le BDI pourraient être vus comme un seul phénomène par lequel des plantes régulent leur propre disponibilité en formes azotés, le concept d'inhibition biologique des processus du cycle de l'azote (Biological Inhibition of the Nitrogen Cycle processes, BINC).

Les plantes et les microorganismes du cycle de l'azote présents dans les sols forment ainsi un système complexe gouverné par les lois de la chimie et dont le principal caractère émergent issu des plantes est cette extraordinaire propriété d'inhibition spécifique des processus du cycle de l'azote par la production de métabolites secondaires. Loin d'être limités au cycle de l'azote, des médiateurs chimiques produits par les plantes pourraient aussi agir sur les autres cycles biogéochimiques comme le phosphore, le potassium et le fer d'autant plus que les plantes semblent sélectionner les communautés fonctionnelles de leur rhizosphère en lien avec ces éléments (Mendes *et al.*, 2014).

Perspectives

En perspective, dans le cadre du BDI, explorer l'inhibition de la dénitrification chez d'autres plantes terrestres permettrait de démontrer s'il s'agit d'un phénomène répandu, particulièrement chez les fougères comme *P. aquilinum*, connues pour être les plus anciens végétaux à produire des procyanidines (Rausher, 2006). Cela pourrait être intéressant compléter par l'étude de la quantité de production des procyanidines chez les plantes en fonction des milieux dans lesquels elles se développent et de leurs caractéristiques de croissance. En effet, la production des procyanidines pourrait être plus importante chez les plantes comme *Fallopia* spp. et *P. aquilinum* dépendantes à l'humidité des sols (Beerling *et al.*, 1995; Rausher, 2006) et considérés comme envahissantes (Tiebre *et al.*, 2008; DeLuca *et al.*, 2013).

Des études autour des mécanismes de régulation de la production de procyanidines chez les plantes en lien avec l'azote disponible dans les sols pourraient être envisagées afin de déterminer si la production de procyanidines répond à la disponibilité en NO₃ ou azote de manière générale. Afin de tester le retour bénéfique du BDI par les procyanidines chez les plantes, l'utilisation d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* ne produisant pas de procyanidine

(Abrahams *et al.*, 2003) pourrait être envisagé afin de comparer les effets de différents régimes nutritifs sur la croissance du type sauvage et du mutant.

Des phénomènes de coévolution entre bactéries dénitrifiantes et plantes inhibitrices pourraient s'être mis en place (partie 4). S'il s'avère que les dénitrifiants représentent bien la majorité des organismes capables de dégrader les procyanidines, il pourrait être intéressant de déterminer si les gènes impliqués dans la dénitrification et ceux dans la dégradation des procyanidines ont suivi les mêmes processus de sélection en construisant des arbres de congruences sur ces deux caractères.

Dans le cas où les procyanidines pourraient promouvoir la croissance des plantes, des applications agronomiques en vue de limiter les pertes en azote des sols pourrait être envisagées. Ces molécules pourraient avoir comme avantage de limiter l'ajout d'intrant azoté aux sols agricoles, notamment en NO_3 connu pour ses conséquences néfastes sur les environnements aquatiques (Chen *et al.*, 2005). Elles pourraient également être utilisées afin de limiter les émissions de NO et N_2O , de puissants gaz à effet de serre, à la fois dans les systèmes agricoles, industriels ou de retraitement des eaux.

Si les procyanidines sont bien impliqués dans le pouvoir invasif de *Fallopia* spp., une comparaison de l'effet des procyanidines de *Fallopia* spp. sur des bactéries dénitrifiantes issues de leurs milieux natifs (*i.e.* Corée et Japon) ou de leur milieu d'introduction semble pertinente. Une résistance des bactéries issues de la zone native (Corée ou Japon) pourrait expliquer pourquoi *Fallopia* spp. n'est pas invasif dans son milieu natif, démontrant ainsi l'hypothèse des nouvelles armes (« the novel weapon hypothesis »).

Références bibliographiques

- Abrahams S, Lee E, Walker AR, Tanner GJ, Larkin PJ, Ashton AR. 2003.** The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant Journal* **35**(5): 624-636.
- Adachi N, Terashima I, Takahashi M. 1996.** Nitrogen translocation via rhizome systems in monoclonal stands of *Reynoutria japonica* in an oligotrophic desert on Mt Fuji: Field experiments. *Ecological Research* **11**(2): 175-186.
- Adamczyk S, Adamczyk B, Kitunen V, Smolander A. 2011.** Influence of diterpenes (colophony and abietic acid) and a triterpene (beta-sitosterol) on net N mineralization, net nitrification, soil respiration, and microbial biomass in birch soil. *Biology and Fertility of Soils* **47**(6): 715-720.
- Agronomy SSSOAASO. 1980.** *Nitrification Inhibitors: Potentials and Limitations*: 1980.
- Aguilera AG, Alpert P, Dukes JS, Harrington R. 2010.** Impacts of the invasive plant *Fallopia japonica* (Houtt.) on plant communities and ecosystem processes. *Biological Invasions* **12**(5): 1243-1252.
- Allison SD, Vitousek PM. 2004.** Rapid nutrient cycling in leaf litter from invasive plants in Hawai'i. *Oecologia* **141**(4): 612-619.
- Alsaadawi IS, Al-Hadithy SM, Arif MB. 1986.** Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and ions uptake in cowpea seedlings. *J Chem Ecol* **12**(1): 221-227.
- Anderson JP, Gleason CA, Foley RC, Thrall PH, Burdon JB, Singh KB. 2010.** Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology* **37**(6): 499-512.
- Anderson JPE, Domsch KH. 1978.** A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **10**(3): 215-221.
- Angeloni NL, Jankowski KJ, Tuchman NC, Kelly JJ. 2006.** Effects of an invasive cattail species (*Typha x glauca*) on sediment nitrogen and microbial community composition in a freshwater wetland. *Fems Microbiology Letters* **263**(1): 86-92.
- Arunachalam M, Mohan N, Sugadev R, Chellappan P, Mahadevan A. 2003.** Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. *Biochim Biophys Acta* **11**(3): 261-265.
- Baetz U, Martinoia E. 2014.** Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* **19**(2): 90-98.
- Bailey JP, Bimova K, Mandak B. 2009.** Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed s.l. sets the stage for the "Battle of the Clones". *Biological Invasions* **11**(5): 1189-1203.
- Ban SH, Kwon YR, Pandit S, Lee YS, Yi HK, Jeon JG. 2010.** Effects of a bio-assay guided fraction from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, acid production and glucosyltransferase of mutans streptococci. *Fitoterapia* **81**(1): 30-34.
- Barber SA. 1995.** *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*: Wiley.
- Bardon C, Piola F, Bellvert F, Haichar FeZ, Comte G, Meiffren G, Pommier T, Puijalon S, Tsafack N, Poly F. 2014.** Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. *New Phytologist*: n/a-n/a.
- Barrett LG, Kniskern JM, Bodenhausen N, Zhang W, Bergelson J. 2009.** Continuum of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytologist* **183**(3): 513-529.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Lucas JA, Lobo AP, García-Villaraco A, Gutiérrez Mañero FJ 2008.** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Plant-Bacteria Interactions*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-17.
- Bary Ad. 1879.** *Die Erscheinung der Symbiose : Vortrag*. Strassburg: Verlag von Karl J. Trübner.

- Berling DJ, Huntley B, Bailey JP. 1995.** CLIMATE AND THE DISTRIBUTION OF FALLOPIA-JAPONICA - USE OF AN INTRODUCED SPECIES TO TEST THE PREDICTIVE CAPACITY OF RESPONSE SURFACES. *Journal of Vegetation Science* **6**(2): 269-282.
- Belser LW. 1979.** POPULATION ECOLOGY OF NITRIFYING BACTERIA. *Annual Review of Microbiology* **33**: 309-333.
- Bending GD, Lincoln SD. 2000.** Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry* **32**(8-9): 1261-1269.
- Bending GD, Read DJ. 1996.** Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **28**(12): 1595-1602.
- Bennett J, Schimel JP. 2004.** Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* **85**(3): 591-602.
- 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): 1-13.
- Berla BM, Saha R, Immethun CM, Maranas CD, Moon TS, Pakrasi HB. 2013.** Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Berryman E, Marshall JD, Rahn T, Litvak M, Butnor J. 2013.** Decreased carbon limitation of litter respiration in a mortality-affected pinon-juniper woodland. *Biogeosciences* **10**(3): 1625-1634.
- Berthelin J 1988.** Microbial Weathering Processes in Natural Environments. In: Lerman A, Meybeck M eds. *Physical and Chemical Weathering in Geochemical Cycles*: Springer Netherlands, 33-59.
- Bertin C, Yang XH, Weston LA. 2003.** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* **256**(1): 67-83.
- Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L. 2000.** Efficacy of Burkholderia cepacia MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils* **31**(3-4): 225-231.
- Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Carusi MV, Delgallo M, Visca P. 1994.** PHENOTYPIC COMPARISON BETWEEN RHIZOSPHERE AND CLINICAL ISOLATES OF BURKHOLDERIA-CEPACIA. *Microbiology-Uk* **140**: 1069-1077.
- Bhat TK, Singh B, Sharma OP. 1998.** Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation* **9**(5): 343-357.
- Bimova K, Mandak B, Pysek P. 2003.** Experimental study of vegetative regeneration in four invasive Reynoutria taxa (Polygonaceae). *Plant Ecology* **166**(1): 1-11.
- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Taylor AR, Rost TL. 2002.** Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**(4): 416-431.
- Blossfeld S, Gansert D, Thiele B, Kuhn AJ, Losch R. 2011.** The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of Juncus spp. *Soil Biology & Biochemistry* **43**(6): 1186-1197.
- Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, Kuhn AJ, Hinsinger P. 2013.** Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO₂ dynamics with planar optodes. *Annals of Botany* **112**(2): 267-276.
- Bochner BR, Giovannetti L, Viti C. 2008.** Important discoveries from analysing bacterial phenotypes. *Molecular Microbiology* **70**(2): 274-280.
- Bonguebartelsman M, Phillips DA. 1995.** NITROGEN STRESS REGULATES GENE-EXPRESSION OF ENZYMES IN THE FLAVONOID BIOSYNTHETIC-PATHWAY OF TOMATO. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**(5): 539-546.
- Bose B. 2013.** Systems biology: A biologist's viewpoint. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **113**(3): 358-368.
- Both H, Ferguson SJ, Newton WE, eds. 2006.** *Biology of the Nitrogen Cycle*.
- Bothe H, Ferguson S, Newton WE. 2006.** *Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science.
- Boudsocq S, Lata JC, Mathieu J, Abbadie L, Barot S. 2009.** Modelling approach to analyse the effects of nitrification inhibition on primary production. *Functional Ecology* **23**(1): 220-230.
- Bowen GD, Rovira AD. 1961.** The effects of micro-organisms on plant growth. *Plant and Soil* **15**(2): 166-188.

- Bradley RL, Titus BD, Preston CP. 2000.** Changes to mineral N cycling and microbial communities in black spruce humus after additions of (NH₄)₂SO₄ and condensed tannins extracted from *Kalmia angustifolia* and balsam fir. *Soil Biology & Biochemistry* **32**(8-9): 1227-1240.
- Bremner JM, Blackmer AM. 1978.** Nitrous Oxide: Emission from Soils During Nitrification of Fertilizer Nitrogen. *Science* **199**(4326): 295-296.
- Bremner JM, McCarty GW. 1988.** Effects of Terpenoids on Nitrification in Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**(6): 1630-1633.
- Britto DT, Kronzucker HJ. 2002.** NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* **159**(6): 567-584.
- Bruggeman FJ, Westerhoff HV. 2007.** The nature of systems biology. *Trends in Microbiology* **15**(1): 45-50.
- Brundrett MC. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**(2): 275-304.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013.** Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology, Vol 64* **64**: 807-838.
- Casella S, Payne WJ. 1996.** Potential of denitrifiers for soil environment protection. *Fems Microbiology Letters* **140**(1): 1-8.
- Chapman SK, Langley JA, Hart SC, Koch GW. 2006.** Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. *New Phytologist* **169**(1): 27-34.
- Chen J, Tang C, Sakura Y, Yu J, Fukushima Y. 2005.** Nitrate pollution from agriculture in different hydrogeological zones of the regional groundwater flow system in the North China Plain. *Hydrogeology Journal* **13**(3): 481-492.
- Cheneby D, Hartmann A, Henault C, Topp E, Germon JC. 1998.** Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils. *Biology and Fertility of Soils* **28**(1): 19-26.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006.** Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**(4): 803-814.
- Chodasewicz K. 2014.** Evolution, reproduction and definition of life. *Theory in Biosciences* **133**(1): 39-45.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A, et al. 1999.** Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N-2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* **13**(2): 623-645.
- Cooper JE 2004.** Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. In: Callow JA ed. *Advances in Botanical Research*: Academic Press, 1-62.
- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* **103**(5): 1355-1365.
- Dalzell SA, Kerven GL. 1998.** A rapid method for the measurement of Leucaena spp proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**(3): 405-416.
- Dassonville N, Guillaumaud N, Piola F, Meerts P, Poly F. 2011.** Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**(5): 1115-1133.
- Dassonville N, Vanderhoeven S, Vanparys V, Hayez M, Gruber W, Meerts P. 2008.** Impacts of alien invasive plants on soil nutrients are correlated with initial site conditions in NW Europe. *Oecologia* **157**(1): 131-140.
- Davet P. 1996.** *Vie microbienne du sol et production végétale*: Institut national de la recherche agronomique.
- Dawkins R, Krebs JR. 1979.** ARMS RACES BETWEEN AND WITHIN SPECIES. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences* **205**(1161): 489-511.
- Day RL, Laland KN, Odling-Smee J. 2003.** Rethinking adaptation - the niche-construction perspective. *Perspectives in Biology and Medicine* **46**(1): 80-95.
- de Rosnay J. 1988.** *L' Aventure du vivant*: Ed. du Seuil.

- DeAngelis KM, Brodie EL, DeSantis TZ, Andersen GL, Lindow SE, Firestone MK. 2009.** Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *Isme Journal* **3**(2): 168-178.
- DeLuca TH, Zewdie SA, Zackrisson O, Healey JR, Jones DL. 2013.** Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. *Plant and Soil* **367**(1-2): 521-534.
- Demaneche S, Philippot L, David MM, Navarro E, Vogel TM, Simonet P. 2009.** Characterization of Denitrification Gene Clusters of Soil Bacteria via a Metagenomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(2): 534-537.
- Derry AM, Staddon WJ, Trevors JT. 1998.** Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**(4): 571-578.
- Di HJ, Cameron KC. 2002.** Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **64**(3): 237-256.
- Dietz M, Machill S, Hoffmann HC, Schmidtke K. 2013.** Inhibitory effects of *Plantago lanceolata* L. on soil N mineralization. *Plant and Soil* **368**(1-2): 445-458.
- Dinnes DL, Karlen DL, Jaynes DB, Kaspar TC, Hatfield JL, Colvin TS, Cambardella CA. 2002.** Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile-drained midwestern soils. *Agronomy Journal* **94**(1): 153-171.
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. 2005.** Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **165**(1): 9-28.
- Dorenkott MR, Griffin LE, Goodrich KM, Thompson-Witrick KA, Fundaro G, Ye LY, Stevens JR, Ali M, O'Keefe SF, Hulver MW, et al. 2014.** Oligomeric Cocoa Procyanidins Possess Enhanced Bioactivity Compared to Monomeric and Polymeric Cocoa Procyanidins for Preventing the Development of Obesity, Insulin Resistance, and Impaired Glucose Tolerance during High-Fat Feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(10): 2216-2227.
- Downie AB, Zhang DQ, Dirk LMA, Thacker RR, Pfeiffer JA, Drake JL, Levy AA, Butterfield A, Buxton JW, Synder JC. 2003.** Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. *Plant Physiology* **133**(1): 145-160.
- Driscoll CT, Whitall D, Aber J, Boyer E, Castro M, Cronan C, Goodale CL, Groffman P, Hopkinson C, Lambert K, et al. 2003.** Nitrogen pollution in the northeastern United States: Sources, effects, and management options. *Bioscience* **53**(4): 357-374.
- Duncan HE, Edberg SC. 1995.** HOST-MICROBE INTERACTION IN THE GASTROINTESTINAL-TRACT. *Critical Reviews in Microbiology* **21**(2): 85-100.
- Dutta S, Podile AR. 2010.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology* **36**(3): 232-244.
- Eaton LJ, Patriquin DG. 1989.** Denitrification in lowbush blueberry soils. *Canadian Journal of Soil Science* **69**(2): 303-312.
- Ehrenfeld JG. 2003.** Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems* **6**(6): 503-523.
- Ehrenfeld JG, Ravit B, Elgersma K 2005.** Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environment and Resources*, 75-115.
- Evans RD, Rimer R, Sperry L, Belnap J. 2001.** Exotic plant invasion alters nitrogen dynamics in an arid grassland. *Ecological Applications* **11**(5): 1301-1310.
- Farr D, Rossman A 2009.** Fungal databases. *Systemic Mycology and Microbiology Laboratory*. Belleville, MD, ARS,USDA.
- Fenton AW, Hutchinson M. 2009.** The pH dependence of the allosteric response of human liver pyruvate kinase to fructose-1,6-bisphosphate, ATP, and alanine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484**(1): 16-23.
- Ferner H. 1951.** The insular alpha and beta cells as the source of the antagonistic principles glucagon and insulin. *Mikroskopie* **6**(1-2): 1-8.

- Feyissa DN, Lovdal T, Olsen KM, Slimestad R, Lillo C. 2009.** The endogenous GL3, but not EGL3, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in Arabidopsis rosette stage leaves. *Planta* **230**(4): 747-754.
- Firestein S. 2014.** *Continents de l'ignorance (Les)*: Editions Odile Jacob.
- Gabetta B, Fuzzati N, Griffini A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T, Peterlongo F. 2000.** Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* **71**(2): 162-175.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, et al. 2004.** Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**(2): 153-226.
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai ZC, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA. 2008.** Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**(5878): 889-892.
- Gammon MA, Kesseli R. 2010.** Haplotypes of Fallopia introduced into the US. *Biological Invasions* **12**(3): 421-427.
- Garner WW, Allard HA. 1919.** Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* **18**: 0553-0606.
- Geisseler D, Horwath WR, Joergensen RG, Ludwig B. 2010.** Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(12): 2058-2067.
- Germida JJ, Siciliano SD. 2001.** Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils* **33**(5): 410-415.
- GinerChavez BI, VanSoest PJ, Robertson JB, Lascano C, Pell AN. 1997.** Comparison of the precipitation of alfalfa leaf protein and bovine serum albumin by tannins in the radial diffusion method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**(4): 513-523.
- Glick BR. 1995.** THE ENHANCEMENT OF PLANT-GROWTH BY FREE-LIVING BACTERIA. *Canadian Journal of Microbiology* **41**(2): 109-117.
- Goodey NM, Benkovic SJ. 2008.** Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* **4**(8): 474-482.
- Gopalakrishnan S, Subbarao GV, Nakahara K, Yoshihashi T, Ito O, Maeda I, Ono H, Yoshida M. 2007.** Nitrification Inhibitors from the Root Tissues of Brachiaria humidicola, a Tropical Grass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(4): 1385-1388.
- Gopalakrishnan S, Watanabe T, Pearse SJ, Ito O, Hossain ZAKM, Subbarao GV. 2009.** Biological nitrification inhibition by Brachiaria humidicola roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. *Soil Science & Plant Nutrition* **55**(5): 725-733.
- Gottel NR, Castro HF, Kerley M, Yang ZM, Pelletier DA, Podar M, Karpinets T, Uberbacher E, Tuskan GA, Vilgalys R, et al. 2011.** Distinct Microbial Communities within the Endosphere and Rhizosphere of Populus deltoides Roots across Contrasting Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(17): 5934-5944.
- Guerinot ML. 1994.** MICROBIAL IRON TRANSPORT. *Annual Review of Microbiology* **48**: 743-772.
- Guo JB, Kang L, Yang JL, Wang XL, Lian J, Li HB, Guo YK, Wang YY. 2010.** Study on a novel non-dissolved redox mediator catalyzing biological denitrification (RMBDN) technology. *Bioresource Technology* **101**(11): 4238-4241.
- Hagerman AE. 1987.** RADIAL DIFFUSION METHOD FOR DETERMINING TANNIN IN PLANT-EXTRACTS. *Journal of Chemical Ecology* **13**(3): 437-449.
- Haichar FeZ, Santaella C, Heulin T, Achouak W. 2014.** Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* **77**(0): 69-80.
- Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Le PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SAL, Arnason JT. 2007.** A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of Vaccinium angustifolium. *Phytochemical Analysis* **18**(2): 161-169.

- Hartig E, Zumft WG. 1999.** Kinetics of nirS expression (cytochrome cd(1) nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: Evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. *Journal of Bacteriology* **181**(1): 161-166.
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G. 2009.** Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**(1-2): 235-257.
- Haslam E. 1998.** *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*: Cambridge University Press.
- Hassan S, Mathesius U. 2012.** The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* **63**(9): 3429-3444.
- Hattenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S 2005.** Biodiversity and litter decomposition interrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 191-218.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao XW. 2000.** The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* **5**(3): 128-133.
- Hellstrom JK, Mattila PH. 2008.** HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(17): 7617-7624.
- Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L. 2004.** Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **59**(3): 327-335.
- Heumann S, Rimmer DL, Schlichting A, Abbott GD, Leinweber P, Bottcher J. 2013.** Effects of potentially inhibiting substances on C and net N mineralization of a sandy soil-a case study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **176**(1): 35-39.
- Heumann S, Ringe H, Bottcher J. 2011a.** Field-specific simulations of net N mineralization based on digitally available soil and weather data: II. Pedotransfer functions for the pool sizes. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **91**(3): 339-350.
- Heumann S, Schlichting A, Bottcher J, Leinweber P. 2011b.** Sterols in soil organic matter in relation to nitrogen mineralization in sandy arable soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **174**(4): 576-586.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010.** Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* **8**(1): 15-25.
- Hiltner L. 1904.** About new experiences and problems in the field of Bodenbakteriologie. **98**(Works Ger Agric Soc): 59-78.
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009.** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**(1-2): 117-152.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang CX, Jaillard B. 2003.** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**(1-2): 43-59.
- Hirose T, Tateno M. 1984.** Soil-nitrogen patterns induced by colonization of *Polygonum cuspidatum* on mont fuji. *Oecologia* **61**(2): 218-223.
- Hobbie SE. 1992.** Effects of plant-species on nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution* **7**(10): 336-339.
- Hodge A, Robinson D, Fitter A. 2000.** Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science* **5**(7): 304-308.
- Howarth RW. 2008.** Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae* **8**(1): 14-20.
- Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G. 1998.** A PII-like protein in Arabidopsis: Putative role in nitrogen sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(23): 13965-13970.
- Inderjit, van der Putten WH. 2010.** Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **25**(9): 512-519.

- Ishikawa T, Subbarao GV, Ito O, Okada K. 2003.** Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. *Plant and Soil* **255**(1): 413-419.
- Iwashina T. 2000.** The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* **113**(1111): 287-299.
- Jackson LE, Schimel JP, Firestone MK. 1989.** SHORT-TERM PARTITIONING OF AMMONIUM AND NITRATE BETWEEN PLANTS AND MICROBES IN AN ANNUAL GRASSLAND. *Soil Biology & Biochemistry* **21**(3): 409-415.
- Jain V, Nainawatee HS. 2002.** Plant flavonoids: Signals to legume nodulation and soil microorganisms. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **11**(1): 1-10.
- Jaiswal R, Jayasinghe L, Kuhnert N. 2012.** Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. *Journal of Mass Spectrometry* **47**(4): 502-515.
- Jetten MSM. 2008.** The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* **10**(11): 2903-2909.
- Joanisse GD, Bradley RL, Preston CM, Bending GD. 2009.** Sequestration of soil nitrogen as tannin-protein complexes may improve the competitive ability of sheep laurel (*Kalmia angustifolia*) relative to black spruce (*Picea mariana*). *New Phytologist* **181**(1): 187-198.
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. 2009.** Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil* **321**(1-2): 5-33.
- Jones N. 2013.** Grass gets greener. *Nature* **501**(7467): 291-291.
- Joyce E, Al-Hashimi A, Mason TJ. 2011.** Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology* **110**(4): 862-870.
- Kajiya K, Hojo H, Suzuki M, Nanjo F, Kumazawa S, Nakayama T. 2004.** Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(6): 1514-1519.
- Kakuda K, Ando H, Konno T. 2000.** Contribution of nitrogen absorption by rice plants and nitrogen immobilization enhanced by plant growth to the reduction of nitrogen loss through denitrification in rhizosphere soil. *Soil Science and Plant Nutrition* **46**(3): 601-610.
- Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, Bru D, Philippot L. 2006.** Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 5957-5962.
- Kanerva S, Kitunen V, Loponen J, Smolander A. 2008.** Phenolic compounds and terpenes in soil organic horizon layers under silver birch, Norway spruce and Scots pine. *Biology and Fertility of Soils* **44**(4): 547-556.
- Khalil K. 2003.** *Emissions de N₂O par nitrification et dénitrification à l'échelle de la motte de sol: effet de la structure du sol, de l'aération et des activités microbiennes.*
- Kim YS, Kim HH, Yoo MJ, Shin DH. 2004.** Bactericidal effect of the extracts of *Polygonum cuspidatum* on *Bacillus cereus*. *Food Science and Biotechnology* **13**(4): 430-433.
- Klemedtsson L, Svensson BH, Lindberg T, Rosswall T. 1977.** Use of acetylene inhibition of nitrous-oxide reductase in quantifying denitrification in soils. *Swedish Journal of Agricultural Research* **7**(4): 179-185.
- Klironomos JN. 2002.** Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* **417**(6884): 67-70.
- Kniskern J, Rausher MD. 2001.** Two modes of host-enemy coevolution. *Population Ecology* **43**(1): 3-14.
- Knops JMH, Bradley KL, Wedin DA. 2002.** Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. *Ecology Letters* **5**(3): 454-466.
- Konstantinidou-Doltsinis S, Markellou E, Kasselaki AM, Fanouraki MN, Koumaki CM, Schmitt A, Liopa-Tsakalidis A, Malathrakis NE. 2006.** Efficacy of Milsana (R), a formulated plant extract from *Reynoutria sachalinensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). *Biocontrol* **51**(3): 375-392.

- Kraal P, Nierop KGJ, Kaal J, Tietema A. 2009.** Carbon respiration and nitrogen dynamics in Corsican pine litter amended with aluminium and tannins. *Soil Biology & Biochemistry* **41**(11): 2318-2327.
- Kraus TEC, Dahlgren RA, Zasoski RJ. 2003.** Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil* **256**(1): 41-66.
- Kucho K, Hay AE, Normand P. 2010.** The Determinants of the Actinorhizal Symbiosis. *Microbes and Environments* **25**(4): 241-252.
- Kulmatiski A, Beard KH, Stevens JR, Cobbold SM. 2008.** Plant-soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology Letters* **11**(9): 980-992.
- Kumar GP, Kishore N, Amalraj ELD, Ahmed S, Rasul A, Desai S. 2012.** Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regulation* **67**(2): 133-140.
- Kuzyakov Y, Xu XL. 2013.** Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198**(3): 656-669.
- Kwapien J, Drozd S. 2012.** Physical approach to complex systems. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters* **515**(3-4): 115-226.
- Lacombe A, McGivney C, Tadepalli S, Sun XH, Wu VCH. 2013.** The effect of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) constituents on the growth inhibition, membrane integrity, and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in comparison to *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology* **34**(2): 352-359.
- Lacombe A, Wu VCH, White J, Tadepalli S, Andre EE. 2012.** The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology* **30**(1): 124-131.
- Lambdon PW, Pysek P, Basnou C, Hejda M, Arianoutsou M, Essl F, Jarosik V, Pergl J, Winter M, Anastasiu P, et al. 2008.** Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. *Preslia* **80**(2): 101-149.
- Lane DJ. 1991.** *16S/23S rRNA sequencing*. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New-York: John Wiley and Sons.
- Lata JC, Degrange V, Raynaud X, Maron PA, Lensi R, Abbadie L. 2004.** Grass populations control nitrification in savanna soils. *Functional Ecology* **18**(4): 605-611.
- Laughlin RJ, Stevens RJ. 2002.** Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Science Society of America Journal* **66**(5): 1540-1548.
- Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz HH. 1999.** High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(9): 3693-3701.
- Lea US, Sliemstad R, Smedvig P, Lillo C. 2007.** Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* **225**(5): 1245-1253.
- LeBauer DS, Treseder KK. 2008.** Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* **89**(2): 371-379.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2005.** *Lehninger Principles of Biochemistry*: W. H. Freeman.
- Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat JF. 2009.** Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* **321**(1-2): 513-535.
- Lenton T. 2014.** Earth systems: No place like home. *Nature* **508**(7494): 41-42.
- Lerman A, Division NATOSA. 1988.** *Physical and Chemical Weathering in Geochemical Cycles*: Springer.
- Li XC, Hu F, Shi W. 2013.** Plant material addition affects soil nitrous oxide production differently between aerobic and oxygen-limited conditions. *Applied Soil Ecology* **64**: 91-98.
- Liu LY, Wales ME, Wild JR. 1998.** Temperature effects on the allosteric responses of native and chimeric aspartate transcarbamoylases. *Journal of Molecular Biology* **282**(4): 891-901.

- Loesche WJ. 1986.** ROLE OF STREPTOCOCCUS-MUTANS IN HUMAN DENTAL DECAY. *Microbiological Reviews* **50**(4): 353-380.
- Loreto F, Dicke M, Schnitzler J-P, Turlings TCJ. 2014.** Plant volatiles and the environment. *Plant Cell and Environment* **37**(8): 1905-1908.
- Lovelock J. 1995.** *The Ages of Gaia: A Biography of Our Living Earth*: Oxford University Press.
- Lugtenberg B, Kamilova F 2009.** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 541-556.
- Lynch JM. 1990.** *The Rhizosphere*: J. Wiley.
- Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. 2005.** The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. *Nature Reviews Microbiology* **3**(2): 144-156.
- Mandak B, Pysek P, Bimova K. 2004.** History of the invasion and distribution of Reynoutria taxa in the Czech Republic: a hybrid spreading faster than its parents. *Preslia* **76**(1): 15-64.
- Marigo G, Pautou G. 1998.** Phenology, growth and ecophysiological characteristics of Fallopia sachalinensis. *Journal of Vegetation Science* **9**(3): 379-386.
- Marilley L, Vogt G, Blanc M, Aragno M. 1998.** Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of Lolium perenne and Trifolium repens as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and Soil* **198**(2): 219-224.
- Marles MAS, Ray H, Gruber MY. 2003.** New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**(2): 367-383.
- Mayer R, Stecher G, Wuerzner R, Silva RC, Sultana T, Trojer L, Feuerstein I, Krieg C, Abel G, Popp M, et al. 2008.** Proanthocyanidins: Target compounds as antibacterial agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(16): 6959-6966.
- McDevitt C, Burrell P, Blackall LL, McEwan AG. 2000.** Aerobic nitrate respiration in a nitrite-oxidising bioreactor. *Fems Microbiology Letters* **184**(1): 113-118.
- Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA, Tsai SM. 2014.** Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *Isme Journal* **8**(8): 1577-1587.
- Merrick MJ, Edwards RA. 1995.** NITROGEN CONTROL IN BACTERIA. *Microbiological Reviews* **59**(4): 604-&.
- Mishra MM, Flaig W. 1979.** INHIBITION OF MINERALIZATION OF UREA NITROGEN IN SOIL. *Plant and Soil* **51**(3): 301-309.
- Miura T, Chiba M, Kasai K, Nozaka H, Nakamura T, Shoji T, Kanda T, Ohtake Y, Sato T. 2008.** Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis* **29**(3): 585-593.
- Morandi D, Bailey JA, Gianinazzi-Pearson V. 1984.** Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiological Plant Pathology* **24**(3): 357-364.
- Morgan JAW, Bending GD, White PJ. 2005.** Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**(417): 1729-1739.
- Muller S, Aboucaya A. 2004.** *Plantes invasives en France: état des connaissances et propositions d'actions*: Muséum national d'histoire naturelle.
- Murrell C, Gerber E, Krebs C, Parepa M, Schaffner U, Bossdorf O. 2011.** INVASIVE KNOTWEED AFFECTS NATIVE PLANTS THROUGH ALLELOPATHY. *American Journal of Botany* **98**(1): 38-43.
- Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y. 2003.** Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science* **49**(1): 45-54.
- Neilands JB. 1981.** IRON-ABSORPTION AND TRANSPORT IN MICROORGANISMS. *Annual Review of Nutrition* **1**: 27-46.
- Nierop KGJ, Preston CM, Verstraten JM. 2006.** Linking the B ring hydroxylation pattern of condensed tannins to C, N and P mineralization. A case study using four tannins. *Soil Biology & Biochemistry* **38**(9): 2794-2802.
- Normand P, Fernandez M 2009.** Evolution and Diversity of Frankia. In: Pawlowski K ed. *Prokaryotic Symbionts in Plants*: Springer Berlin Heidelberg, 103-125.

- Norris CE, Preston CM, Hogg KE, Titus BD. 2011.** The Influence of Condensed Tannin Structure on Rate of Microbial Mineralization and Reactivity to Chemical Assays. *Journal of Chemical Ecology* **37**(3): 311-319.
- Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG. 2002.** Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* **177**(2): 139-149.
- O'Sullivan LA, Weightman AJ, Jones TH, Marchbank AM, Tiedje JM, Mahenthalingam E. 2007.** Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environmental Microbiology* **9**(4): 1017-1034.
- Occhipinti A. 2013.** Plant coevolution: evidences and new challenges. *Journal of Plant Interactions* **8**(3): 188-196.
- Odling-Smee FJ, Laland KN, Feldman MW. 2003.** *Niche Construction: The Neglected Process in Evolution*. Princeton: Princeton University Press.
- Odling-Smee J, Laland KN, Feldman MW, eds. 2003.** *Niche construction: the neglected process in evolution*. Princeton: Princeton University Press.
- Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, Edwards KJ. 2011.** Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**(2): 361-+.
- Ottaviani JI, Actis-Goretta L, Villordo JJ, Fraga CG. 2006.** Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* **88**(3-4): 359-365.
- Paccard E. 1995.** *Dénitrification biologique d'effluents industriels à fortes concentrations en nitrates*.
- Partida-Martinez LP, Heil M. 2011.** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* **2**.
- Pavicic SS, Kukric ZZ, Topalic-Trivunovic LN, Davidovic AN, Zabic MM. 2009.** Antioxydative and antimicrobial activity of *Reynoutria japonica* extracts. *Hemijaska Industrija* **63**(5): 427-432.
- Peng MS, Hudson D, Schofield A, Tsao R, Yang R, Gu HL, Bi YM, Rothstein SJ. 2008.** Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of Experimental Botany* **59**(11): 2933-2944.
- Philip Robertson G 1997.** 10 - Nitrogen Use Efficiency in Row-Crop Agriculture: Crop Nitrogen Use and Soil Nitrogen Loss. In: Jackson LE ed. *Ecology in Agriculture*: Academic Press, 347-365.
- Philippot L. 2002.** Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1577**(3): 355-376.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. 2013.** Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Micro advance online publication*.
- Piola F, Bellvert F, Meiffren G, Rouifed S, Walker V, Comtes G, Bertrand C. 2013.** Invasive *Fallopia × bohemica* interspecific hybrids display different patterns in secondary metabolites. *Ecoscience* **20**(3): 230-239.
- Pirozynski KA, Malloch DW. 1975.** The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**(3): 153-164.
- Plee K, Paction M, Ariztegui D. 2010.** Discriminating the Role of Photosynthetic and Heterotrophic Microbes Triggering Low-Mg Calcite Precipitation in Freshwater Biofilms (Lake Geneva, Switzerland). *Geomicrobiology Journal* **27**(5): 391-399.
- Pollock JL, Kogan LA, Thorpe AS, Holben WE. (-)**-catechin, a root exudate of the invasive *centaurea stoebe* lam. (Spotted knapweed) exhibits bacteriostatic activity against multiple soil bacterial populations. *Journal of Chemical Ecology* **37**(9): 1044-1053.
- Pometto A, Shetty K, Paliyath G, Levin RE. 2005.** *Food Biotechnology, Second Edition*: Taylor & Francis.
- Poole RK, Cook GM. 2000.** Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Advances in Microbial Physiology, Vol 43* **43**: 165-224.
- Potier P. 2003.** Chemistry is everywhere. *Actualite Chimique*(11-12): 7-7.
- Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S. 2014.** Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* **13**(1): 63-77.
- Provorov NA. 1998.** Coevolution of rhizobia with legumes: Facts and hypotheses. *Symbiosis* **24**(3): 337-367.

- Purich DL. 2010.** *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control : a Reference of Theory and Best-practice Methods*: Elsevier/Academic Press.
- Pysek P, Brock JH, Bimova K, Mandak B, Jarosik V, Koukolikova I, Pergl J, Stepanek J. 2003.** Vegetative regeneration in invasive Reynoutria (Polygonaceae) taxa: The determinant of invasibility at the genotype level. *American Journal of Botany* **90**(10): 1487-1495.
- R Development Core Team 2008.** *A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Radersma S, Smit AL. 2011.** Assessing denitrification and N leaching in a field with organic amendments. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **58**(1-2): 21-29.
- Rauber R, Liebenau S, Friedrichs E, Schmidtke K. 2008.** Agronomic effects of underseeding ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.) in organically grown potatoes. *Pflanzenbauwiss*(12): 32-40.
- Rauscher MD 2006.** The Evolution of Flavonoids and Their Genes. In: Grotewold E ed. *The Science of Flavonoids*: Springer New York, 175-211.
- Reeve R, Turner JR. 2013.** Pharmacodynamic Models: Parameterizing the Hill Equation, Michaelis-Menten, the Logistic Curve, and Relationships Among These Models. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* **23**(3): 648-661.
- Reinhart KO, Callaway RM. 2006.** Soil biota and invasive plants. *New Phytologist* **170**(3): 445-457.
- Ridenour WM, Callaway RM. 2001.** The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. *Oecologia* **126**(3): 444-450.
- Robin A, Mazurier S, Mougél C, Vansuyt G, Corberand T, Meyer JM, Lemanceau P. 2007.** Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco. *Environ Microbiol* **9**(7): 1724-1737.
- Robin A, Mougél C, Siblot S, Vansuyt G, Mazurier S, Lemanceau P. 2006.** Effect of ferritin overexpression in tobacco on the structure of bacterial and pseudomonad communities associated with the roots. *FEMS Microbiol Ecol* **58**(3): 492-502.
- Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y 2007.** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C eds. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*: Springer Netherlands, 15-21.
- Routaboul JM, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L. 2006.** Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**(1): 96-107.
- Royer M, Stien D, Beauchene J, Herbette G, McLean JP, Thibaut A, Thibaut B. 2010.** Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti-swelling agents. *Holzforschung* **64**(2): 211-215.
- Rusmana I, Nedwell DB. 2004.** Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. *Fems Microbiology Ecology* **48**(3): 379-386.
- Ryden JC, Ball PR, Garwood EA. 1984.** NITRATE LEACHING FROM GRASSLAND. *Nature* **311**(5981): 50-53.
- Sahayaraj K, Francis Borgio J, Raju G. 2009.** Antifungal activity of three fern extracts on causative agents of groundnut early leaf spot and rust diseases. *Journal of Plant Protection Research* **49**(2): 141-144.
- Sahrawat KL. 1981.** Comparison of Karanjin with other nitrification inhibitors for retardation of nitrification of urea N in soil. *Plant and Soil* **59**(3): 495-498.
- Salsac L, Chaillou S, Morotgaudry JF, Lesaint C. 1987.** NITRATE AND AMMONIUM NUTRITION IN PLANTS. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**(6): 805-812.
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. 2004.** Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol* **136**(1): 2483-2499.
- Schimann H, Ponton S, Hattenschwiler S, Ferry B, Lensi R, Domenach AM, Roggy JC. 2008.** Differing nitrogen use strategies of two tropical rainforest late successional tree species in French

- Guiana: Evidence from N-15 natural abundance and microbial activities. *Soil Biology & Biochemistry* **40**(2): 487-494.
- Schimel JP, Cates RG, Ruess R. 1998.** The role of balsam poplar secondary chemicals in controlling soil nutrient dynamics through succession in the Alaskan taiga. *Biogeochemistry* **42**(1-2): 221-234.
- Schleifer KH. 2004.** Microbial diversity: Facts, problems and prospects. *Systematic and Applied Microbiology* **27**(1): 3-9.
- Schluter D. 1996.** Ecological Causes of Adaptive Radiation. *The American Naturalist* **148**: S40-S64.
- Schofield P, Mbugua DM, Pell AN. 2001.** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* **91**(1-2): 21-40.
- Scott NA, Saggat S, McIntosh PD. 2001.** Biogeochemical impact of Hieracium invasion in New Zealand's grazed tussock grasslands: Sustainability implications. *Ecological Applications* **11**(5): 1311-1322.
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. 2008.** Antibacterial properties of Polygonum cuspidatum roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry* **109**(3): 530-537.
- Sharma V, Noriega CE, Rowe JJ. 2006.** Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(1): 695-701.
- Shaw LJ, Morris P, Hooker JE. 2006.** Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* **8**(11): 1867-1880.
- Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J. 1992.** Denitrification by fungi. *Fems Microbiology Letters* **94**(3): 277-281.
- Siewewerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. 1995.** The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **33**(11): 813-823.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V 2011.** The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. In: VanAlfen NK, Bruening G, Leach JE eds. *Annual Review of Phytopathology, Vol 49*, 465-481.
- Smith DJ. 2013.** Microbes in the Upper Atmosphere and Unique Opportunities for Astrobiology Research. *Astrobiology* **13**(10): 981-990.
- Smith NR. 1948.** Microbiology of soil. *Annual Review of Microbiology* **2**: 453-484.
- Sorger PK. 2005.** A reductionist's systems biology - Opinion. *Current Opinion in Cell Biology* **17**(1): 9-11.
- Staddon WJ, Trevors JT, Duchesne LC, Colombo CA. 1998.** Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada. *Biodiversity and Conservation* **7**(8): 1081-1092.
- Stupnicka-Rodzynek E, Dabkowska T, Stoklosa A, Hura T, Dubert F, Lepiarczyk A. 2006.** The effect of selected phenolic compounds on the initial growth of four weed species. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 479-486.
- Subbarao GV, Ishikawa T, Ito O, Nakahara K, Wang HY, Berry WL. 2006a.** A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with Brachiaria humidicola. *Plant and Soil* **288**(1-2): 101-112.
- Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rondon M, Rao IM. 2006b.** Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**(4): 303-335.
- Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP, Ono H, Moreta DE, Salcedo AF, Yoshihashi AT, Ishikawa T, Ishitani M, Ohnishi-Kameyama M, et al. 2009.** Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(41): 17302-17307.

- Subbarao GV, Nakahara K, Ishikawa T, Ono H, Yoshida M, Yoshihashi T, Zhu Y, Zakir HAKM, Deshpande SP, Hash CT, et al. 2013a. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil* **366**(1-2): 243-259.
- Subbarao GV, Nakahara K, Ishikawa T, Yoshihashi T, Ito O, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Kawano N, Berry WL. 2008. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. *Plant and Soil* **313**(1-2): 89-99.
- Subbarao GV, Rondon M, Ito O, Ishikawa T, Rao IM, Nakahara K, Lascano C, Berry WL. 2007a. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* **294**(1-2): 5-18.
- Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Ishikawa T, Kishii M, Rao IM, Hash CT, George TS, Rao PS, Nardi P, et al. 2012a. BIOLOGICAL NITRIFICATION INHIBITION-A NOVEL STRATEGY TO REGULATE NITRIFICATION IN AGRICULTURAL SYSTEMS. In: Sparks DL ed. *Advances in Agronomy, Vol 114*, 249-302.
- Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Ishikawa T, Kishii M, Rao IM, Hash CT, George TS, Srinivasa Rao P, Nardi P, et al. 2012b. Chapter six - Biological Nitrification Inhibition—A Novel Strategy to Regulate Nitrification in Agricultural Systems. In: Donald LS ed. *Advances in Agronomy*: Academic Press, 249-302.
- Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Rao IM, Ishitani M, Hash CT, Kishii M, Bonnett DG, Berry WL, Lata JC. 2013b. A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany* **112**(2): 297-316.
- Subbarao GV, Tomohiro B, Masahiro K, Osamu I, Samejima H, Wang HY, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Nakahara K, Hossain A, et al. 2007b. Can biological nitrification inhibition (BNI) genes from perennial *Leymus racemosus* (Triticeae) combat nitrification in wheat farming? *Plant and Soil* **299**(1-2): 55-64.
- Subbarao GV, Wang HY, Ito O, Nakahara K, Berry WL. 2007c. NH₄⁺ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant and Soil* **290**(1-2): 245-257.
- Tam L, Derry AM, Kevan PG, Trevors JT. 2001. Functional diversity and community structure of microorganisms in rhizosphere and non-rhizosphere Canadian arctic soils. *Biodiversity and Conservation* **10**(11): 1933-1947.
- Taylor BL. 1983. ROLE OF PROTON MOTIVE FORCE IN SENSORY TRANSDUCTION IN BACTERIA. *Annual Review of Microbiology* **37**: 551-573.
- Tempel AS. 1981. FIELD STUDIES OF THE RELATIONSHIP BETWEEN HERBIVORE DAMAGE AND TANNIN CONCENTRATION IN BRACKEN (*PTERIDIUM-AQUILINUM* KUHN). *Oecologia* **51**(1): 97-106.
- Tenuta M, Bergstrom DW, Beauchamp EG. 2000. Denitrifying enzyme activity and carbon availability for denitrification following manure application. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**(7-8): 861-876.
- Tesfamariam T, Yoshinaga H, Deshpande SP, Rao PS, Sahrawat KL, Ando Y, Nakahara K, Hash CT, Subbarao GV. 2014. Biological nitrification inhibition in sorghum: the role of sorgoleone production. *Plant and Soil* **379**(1-2): 325-335.
- Tharayil N, Alpert P, Bhowmik P, Gerard P. 2013. Phenolic inputs by invasive species could impart seasonal variations in nitrogen pools in the introduced soils: A case study with *Polygonum cuspidatum*. *Soil Biology & Biochemistry* **57**: 858-867.
- Thomazo C, Ader M, Philippot P. 2011. Extreme 15N-enrichments in 2.72-Gyr-old sediments: evidence for a turning point in the nitrogen cycle. *Geobiology* **9**(2): 107-120.
- Tiebre MS, Saad L, Mahy G. 2008. Landscape dynamics and habitat selection by the alien invasive *Fallopia* (Polygonaceae) in Belgium. *Biodiversity and Conservation* **17**(10): 2357-2370.
- Tiebre MS, Vanderhoeven S, Saad L, Mahy G. 2007. Hybridization and sexual reproduction in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium. *Annals of Botany* **99**(1): 193-203.
- Tischner R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell and Environment* **23**(10): 1005-1024.

- Tong H, Chen W, Merritt J, Qi F, Shi W, Dong X. 2007.** Streptococcus oligofermentans inhibits Streptococcus mutans through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Molecular Microbiology* **63**(3): 872-880.
- Trevors JT. 2002.** The subsurface origin of microbial life on the Earth. *Research in Microbiology* **153**(8): 487-491.
- Triebwasser DJ, Tharayil N, Preston CM, Gerard PD. 2012.** The susceptibility of soil enzymes to inhibition by leaf litter tannins is dependent on the tannin chemistry, enzyme class and vegetation history. *New Phytologist* **196**(4): 1122-1132.
- Tzeng SR, Kalodimos CG. 2013.** Allosteric inhibition through suppression of transient conformational states. *Nature Chemical Biology* **9**(7): 462-+.
- Urgenson LS, Reichard SH, Halpern CB. 2009.** Community and ecosystem consequences of giant knotweed (*Polygonum sachalinense*) invasion into riparian forests of western Washington, USA. *Biological Conservation* **142**(7): 1536-1541.
- Ushio M, Balsler TC, Kitayama K. 2013.** Effects of condensed tannins in conifer leaves on the composition and activity of the soil microbial community in a tropical montane forest. *Plant and Soil* **365**(1-2): 157-170.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2013.** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- 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**(3): 296-310.
- Van der Krift TAJ, Berendse F. 2001.** The effect of plant species on soil nitrogen mineralization. *Journal of Ecology* **89**(4): 555-561.
- van der Putten WH, Bardgett RD, Bever JD, Bezemer TM, Casper BB, Fukami T, Kardol P, Klironomos JN, Kulmatiski A, Schweitzer JA, et al. 2013.** Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* **101**(2): 265-276.
- van der Salm C, Dolfig J, Heinen M, Velthof GL. 2007.** Estimation of nitrogen losses via denitrification from a heavy clay soil under grass. *Agriculture Ecosystems & Environment* **119**(3-4): 311-319.
- Van VT, Berge O, Ke SN, Balandreau J, Heulin T. 2000.** Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil* **218**(1-2): 273-284.
- van Wijk DJ, Kroon SGM, Gartener-Arends ICM. 1998.** Toxicity of chlorate and chlorite to selected species of algae, bacteria, and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40**(3): 206-211.
- Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. 2006.** Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(2): 137-144.
- Vastano BC, Chen Y, Zhu NQ, Ho CT, Zhou ZY, Rosen RT. 2000.** Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(2): 253-256.
- Vessey JK. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**(2): 571-586.
- Vial, Ludovic, Groleau MC, Dekimpe V, Deziel E. 2007.** *Burkholderia* diversity and versatility: An inventory of the extracellular products. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**(9): 1407-1429.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC, Deziel E. 2011.** The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environmental Microbiology* **13**(1): 1-12.
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991a.** Nitrogen limitation on land and in sea-How can it occur. *Biogeochemistry* **13**(2): 87-115.

- Vitousek PM, Howarth RW. 1991b.** NITROGEN LIMITATION ON LAND AND IN THE SEA - HOW CAN IT OCCUR. *Biogeochemistry* **13**(2): 87-115.
- Vrchotova N, Sera B. 2008.** Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. *Plant Soil and Environment* **54**(7): 301-303.
- Wallenstein MD, Myrold DD, Firestone M, Voytek M. 2006.** Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecological Applications* **16**(6): 2143-2152.
- Wang CM, Li TC, Jhan YL, Weng JH, Chou CH. 2013.** The Impact of Microbial Biotransformation of Catechin in Enhancing the Allelopathic Effects of *Rhododendron formosanum*. *Plos One* **8**(12).
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD. 2008.** Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* **105**(6): 1744-1755.
- White C. 1991.** The role of monoterpenes in soil nitrogen cycling processes in ponderosa pine. *Biogeochemistry* **12**(1): 43-68.
- White SH, Wimley WC. 1999.** Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **28**: 319-365.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998.** Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12): 6578-6583.
- Wirthmueller L, Maqbool A, Banfield MJ. 2013.** On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology* **11**(11): 761-776.
- Wu H, Pratley J, Lemerle D, An M, Liu D. 2007.** Autotoxicity of wheat (*Triticum aestivum* L.) as determined by laboratory bioassays. *Plant and Soil* **296**(1-2): 85-93.
- Wu VCH, Qiu XJ, Bushway A, Harper L. 2008.** Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *Lwt-Food Science and Technology* **41**(10): 1834-1841.
- Wurms K, Labbe C, Benhamou N, Belanger RR. 1999.** Effects of Milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* **89**(9): 728-736.
- Xu LM, Liu R, Li DD, Tu S, Chen J. 2011.** An in vitro study on the dental caries preventing effect of oligomeric procyanidins in sorghum episperm. *Food Chemistry* **126**(3): 911-916.
- Yang Y, Zhu HG, Colvin VL, Alvarez PJ. 2011.** Cellular and Transcriptional Response of *Pseudomonas stutzeri* to Quantum Dots under Aerobic and Denitrifying Conditions. *Environmental Science & Technology* **45**(11): 4988-4994.
- Yu XT, Chu SD, Hagerman AE, Lorigan GA. 2011.** Probing the Interaction of Polyphenols with Lipid Bilayers by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(12): 6783-6789.
- Zakir H, Subbarao GV, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Ito O, Ishikawa T, Kawano N, Nakahara K, Yoshihashi T, Ono H, et al. 2008.** Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *New Phytologist* **180**(2): 442-451.
- Zavodszky P, Hajdu I. 2013.** Evolution of the concept of conformational dynamics of enzyme functions over half of a century: A personal view. *Biopolymers* **99**(4): 263-269.
- Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P. 2012.** Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology* **21**(9): 2297-2309.
- Zumft WG. 1997.** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(4): 533-616.