



Régulations microbiennes et rhizosphériques des cycles du carbone et de l'azote dans les systèmes de culture conventionnels et innovants

Camille Cros

► To cite this version:

Camille Cros. Régulations microbiennes et rhizosphériques des cycles du carbone et de l'azote dans les systèmes de culture conventionnels et innovants. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC005 . tel-02163770

HAL Id: tel-02163770

<https://theses.hal.science/tel-02163770>

Submitted on 24 Jun 2019

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

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

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Gestion de l'environnement

Présentée par **Camille Cros**

Régulations microbiennes et rhizosphériques des cycles du carbone et de
l'azote dans les systèmes de culture conventionnels et innovants

Thèse soutenue le 15 février 2019

Composition du jury :

Luc ABBADIE	Professeur, Faculté des Sciences de la Sorbonne, Paris	(Rapporteur)
Eric JUSTES	Directeur de Recherche, CIRAD-UMR System, Montpellier	(Rapporteur)
Laetitia BERNARD	Chargée de Recherche, IRD-UMR Eco&Sols, Montpellier	(Examinatrice)
Patricia GARNIER	Directrice de Recherche, INRA, Thiverval-Grignon	(Présidente)
Anne-Catherine LEHOURS	Chargée de Recherche, CNRS-LMGE, Clermont-Ferrand	(Examinatrice)
Télesphore SIME-NGANDO	Directeur de recherche, CNRS-LMGE, Clermont-Ferrand	(Invité)
Pascal CARRERE	Ingénieur de recherche, INRA-UREP, Clermont-Ferrand	(Directeur de thèse)
Gaël ALVAREZ	Ingénieur de recherche, VetAgro Sup-UREP, Clermont-Ferrand	(Co-encadrant)
Sébastien FONTAINE	Chargé de Recherche, INRA-UREP, Clermont-Ferrand	(Co-encadrant)

Unité mixte de Recherche sur l'Écosystème prairial (INRA-UMR 874), Clermont-Ferrand

UMR 0874

Ecosystème Prairial (UREP)



Résumé

La présence de plantes accélère la décomposition de la matière organique du sol (MOS) au travers de l'apport de composés riches en énergie (rhizodépôts et litières) stimulant les microorganismes ; un phénomène appelé « rhizosphere priming effect » (RPE). Une augmentation de la photosynthèse, activité pourvoyeuse d'énergie rhizodéposée, pourrait augmenter le RPE et l'offre du sol en nutriments. Récemment, le modèle SYMPHONY couplant activités photosynthétiques et microbiennes du sol suggère un ajustement de l'offre du sol en nutriments (delta minéralisation-immobilisation) à la demande des plantes. Cependant, le rôle clé de la photosynthèse sur cet ajustement offre-demande reste à étudier expérimentalement.

L'objectif général de la thèse est d'étudier le rôle des interactions des activités photosynthétiques et microbiennes du sol dans les régulations des flux de carbone (C) et d'azote (N) des écosystèmes. Trois écosystèmes types ont été étudiés : la prairie, la monoculture de blé et un nouveau système de culture (NSC) associant blé et plantes pérennes de la prairie. Nous émettons l'hypothèse que les plantes pérennes, via une activité photosynthétique pourvoyant les microorganismes en énergie tout au long de l'année, sont essentielles à l'ajustement offre-demande en N.

De nombreux défis techniques ont été relevés afin de construire une plateforme expérimentale de 40 mésocosmes sous éclairage et température naturels. Cette plateforme permet de coupler marquage ^{13}C des plantes, mesures continues des échanges de CO_2 , du RPE, de la production végétale, du stockage de C du sol, le taux de minéralisation-immobilisation d'N et du lessivage d'N.

Ce dispositif nous a permis de déterminer la contribution du RPE dans les flux de C des écosystèmes comprenant la production nette de l'écosystème (NEP), la production primaire brute (GPP) et la respiration de l'écosystème (RE) exprimées en $\text{g C m}^{-2} \text{24h}^{-1}$. Nous avons montré une relation positive linéaire entre (1) RPE et GPP et (2) RPE et biomasse aérienne (AGB) (g C m^{-2}). A partir de ces relations, le RPE peut être prédit en utilisant les équations suivantes : $RPE = (2.03 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}) \cdot GPP - 1.57 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$ et $RPE = (8.03 \cdot 10^{-4} \pm 7.6 \cdot 10^{-5}) \cdot AGB + 9.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.05$.

Nous montrons un ajustement offre-demande de l'N au cours des saisons : une forte activité photosynthétique (printemps) est liée à un RPE et un delta minéralisation-immobilisation d'N élevés alors qu'une faible activité photosynthétique (automne) est liée à un RPE et un delta minéralisation-immobilisation d'N faibles. Cet ajustement était observé dans la prairie et dans le NSC mais pas en monoculture de blé. Logiquement, la lixiviation d'N était importante en monoculture de blé alors qu'elle était quasi nulle en prairie et dans le NSC. Après deux années de maintien des trois écosystèmes types, la production aérienne totale du NSC était équivalente à la prairie, tous deux étant supérieurs d'environ un facteur deux à la monoculture de blé. Ces résultats confirment l'importance des plantes pérennes dans la synchronisation offre-demande de l'N.

L'ensemble de ces investigations souligne l'importance des activités des plantes et des processus rhizosphériques dans la régulation des cycles CN des écosystèmes. Ces régulations pourront être étudiées *in situ* et à l'échelle globale grâce aux proxys de ces processus rhizosphériques (RPE, ajustement offre-demande) déterminés dans la thèse. Des activités photosynthétiques et rhizosphériques tout au long de l'année sont essentielles à l'ajustement offre-demande en nutriments conduisant à une forte production primaire, à la fermeture des cycles des nutriments et au stockage de MOS. Ces découvertes offrent l'opportunité de construire de nouveaux systèmes de culture, à l'image de l'association blé-plantes pérennes étudiée, à hautes performances agro-environnementales.

Mots clés : « rhizosphere priming effect » ; flux de CO_2 ; ^{13}C ; ^{15}N ; N minéralisation-immobilisation ; couplage carbone et azote ; synchronisation offre-demande ; plantes pérennes ; prairie ; monoculture blé ; services écosystémiques ; agroécologie.

Abstract

The presence of plants accelerates the decomposition of soil organic matter (SOM) through the supply of energy-rich compounds (rhizodeposits and litter) stimulating microorganisms; a phenomenon called rhizosphere priming effect (RPE). An increase of photosynthesis, supplying soil with rhizodeposited energy, could increase the RPE and soil nutrients offer. Recently, the SYMPHONY model coupling photosynthesis and soil microbial activities suggested an adjustment of the soil nutrient offer (delta mineralization-immobilization) to plant demand. However, the key role of photosynthesis in this offer-demand adjustment needs to be investigated experimentally.

The general objective of the thesis is to study the role of interactions between photosynthesis and soil microbial activities in the regulation of carbon (C) and nitrogen (N) fluxes of ecosystems. Three ecosystem types were studied: grassland, wheat monoculture and a new cropping system (NSC) where wheat and perennial grassland species were intercropped. We hypothesize that perennial species, through a continuous photosynthetic activity supplying microorganisms with energy over the year, are essential for offer-demand adjustment.

Many technical challenges were overcome to build an experimental platform of 40 mesocosms under natural light and temperature. This platform allows to couple ^{13}C labeling of plants, continuous CO_2 -exchange measurements, RPE, plant production, soil C storage, N mineralization-immobilization turnover and N leaching.

This experimental platform allowed us to determine the contribution of RPE to C fluxes of ecosystems including net ecosystem production (NEP), gross primary production (GPP) and ecosystem respiration (ER) expressed in $\text{g C m}^{-2} 24\text{h}^{-1}$. We found positive linear relationships between (1) RPE and GPP and (2) RPE and aboveground biomass (AGB) (g C m^{-2}). Using these relationships, the RPE can be predicted with the following equations: $RPE = (2.03 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}) \cdot GPP - 1.57 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$ and $RPE = (8.03 \cdot 10^{-4} \pm 7.6 \cdot 10^{-5}) \cdot AGB + 9.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.05$.

We show an adjustment of soil N-offer to plant N-demand across seasons: a high photosynthetic activity (spring) is linked to high RPE and delta mineralization-immobilization of N whereas a low photosynthetic activity (autumn) is linked to low RPE and delta mineralization-immobilization of N. This adjustment was observed in grassland and NSC but not in wheat monoculture. Consistently, N leaching was high in wheat monoculture while it was almost null in grassland and NSC. After two years of establishment of the three ecosystems, the total aboveground production of the NSC was equivalent to the grassland, each being about twice as high as the wheat monoculture. These results confirm the importance of perennial species in the offer-demand adjustment of N.

Our findings underline the importance of plant activities and rhizosphere processes in the regulation of ecosystems C N cycles. Using the proxies of rhizosphere processes (RPE, offer-demand adjustment) provided in the thesis, further studies could investigate these regulations *in situ* and at the global scale. The presence of photosynthetic and rhizospheric activities over the year are essential for offer-demand adjustment of nutrients leading to high primary production, closing nutrient cycles and SOM storage. These findings offer the opportunity to build new cropping systems such as the wheat-perennial species studied, with high agro-environmental performances.

Keywords: Rhizosphere priming effect; CO_2 fluxes; ^{13}C ; ^{15}N ; N mineralization-immobilization ; C and N coupling; offer-demand synchronization; perennial species; grassland; wheat monoculture; ecosystem services; agroecology.

A ma grand-mère

Jeanine Rigal

Remerciements

Après trois années et quelques mois à me consacrer à la réalisation et à la rédaction de « ma vie, mon œuvre », l'aventure s'arrête ici. Je me dois de remercier sincèrement l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens d'abord à remercier Sébastien Fontaine et Gaël Alvarez, mes deux encadrants de thèse, qui ont su m'accompagner, me soutenir et me supporter tout au long de ces trois années de thèse avec une grande gentillesse et humanité. Je te remercie Sébastien pour ta présence, tes nombreux conseils et pour l'ensemble des connaissances et compétences que tu as su me transmettre tant sur des concepts d'écologie, sur la rédaction et sur les manip'. Je te remercie aussi de m'avoir permis de partager avec toi tous ces beaux voyages et excursions jusqu'au bout du monde. Merci Gaël de m'avoir fait partager tes connaissances de toutes sortes lors de mes interruptions dans ton bureau. Merci de m'avoir transmis tes compétences en programmation sur R pendant de longues journées à s'arracher les cheveux en gobant des tic-tac. Merci de m'avoir aidée et guidée tout au long de ces étapes de traitements de données et d'écriture. Merci de m'avoir changée les idées avec nos discussions sur les champignons et sur notre région d'origine. Je remercie également Frida Keuper, encadrante à distance, pour sa bonne volonté et pour la rigueur qu'elle a su me transmettre pendant ma thèse. Enfin je remercie Pascal Carrère d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et d'avoir fait les démarches administratives quand il le fallait.

Je remercie Catherine Picon Cochard, directrice de l'UREP, qui m'a soutenue lors de la réinscription en 4^{ème} année ainsi que pour la recherche de financement pour la prolongation de salaire.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage, Simon Boudsocq et Pierre Alain Maron pour leurs précieux conseils tout au long de l'avancée de ma thèse.

Je remercie Robert Falcimagne, David Colosse, Alexandre Salcedo, Patrick Pichon, Vincent Guillot, Eric Viallard, Alain Verdier et toute l'équipe du domaine pour m'avoir aidée à monter la plateforme expérimentale. Je remercie PUM plastique et en particulier Guillaume Oleon qui a su me conseiller pour toutes les demandes farfelues lors de la construction et du montage de la plateforme. Finalement, je remercie l'entreprise « Atelier CastelPontin du Plastique » qui nous a fabriqué les mésocosmes.

Après un an de construction et de mise au point de la plateforme, les analyses sur les systèmes sol-plantes ont pu commencer. Je remercie Sandrine Revaillet pour avoir été mon binôme sur la compréhension, l'adaptation et la mise au point du protocole de « ^{15}N pool dilution » permettant les mesures de minéralisation et d'immobilisation brute de l'azote. Je la remercie pour sa bonne humeur et sa joie de vivre sans laquelle nous n'aurions pas passé d'aussi bons moments. Je remercie Hélène Desmyterre, Ludovic Henneron, Vida Rahimian, Pierre Poussard et encore une fois Sandrine pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant les récoltes destructives et les mesures de priming. Merci à Laurence Andanson pour avoir analysé des centaines d'échantillons dans des temps record. Je la remercie également pour ses conseils, sa bonne humeur, son soutien et sa douceur. Merci à Christian Hossann et Olivier Delfosse qui ont également reçu de nombreux échantillons à analyser et qui m'ont aussi conseillée.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'UREP ou qui fût UREP à un moment de leur vie pour leur présence au quotidien. Plus particulièrement merci à Julien Pottier, Raphaël Martin et Vincent Allard pour leur aide sur le traitement des données. Je te remercie Pauline pour tous les fous rires partagés, les randos et les soirées avec la petite Iris. C'est grâce à tes compétences en mathématiques et en géométrie que la plateforme a une forme harmonieuse. Si on ouvre un restau promis je fais la cuisine et je te laisse la comptabilité. Merci d'avoir relu mon manuscrit ! Iris, acolyte des trois années de thèse, on a progressé ensemble sur la frise licorne. On a partagé les bons et mauvais moments associés à la thèse guéris à gros coups de fromages et boissons en tout genre. Merci pour la formation ggplot2 sans quoi mes figures auraient été ...différentes. Merci Andréa pour toutes ces bouffées d'oxygène et ton écoute. Je remercie tous les autres Laurine, Garance, Jean Noël, Geoffrey, Isabelle, Laurence, Eric, Vincent, Patrick, Jean-Marie, Hélène, Benoit, Ludo, Paul, Pierrot, Gaby, Vida qui ont su m'apporter de la joie au quotidien.

Je remercie ma famille qui m'a poussée à continuer et finir cette thèse coûte que coûte. Je remercie particulièrement mes parents qui m'ont soutenue et m'ont permis de faire tant d'études. Je remercie mon frère et Elisa qui ont mis au monde Gabin qui m'a apporté beaucoup de bonheur dans ces derniers mois de thèse. Merci tatie Aimée, merci tonton Jacques. Merci David, tu m'as soutenue dans tous ces moments que ce soit psychologiquement ou techniquement. Tu mérites que l'on se partage une demi-thèse. Merci à mes amies Julie (merci spécial pour la relecture), Iris, Justine, Mathilde, Marie et Tiffany d'être tout simplement là pour moi depuis tant d'années.

Un grand merci à tous les fromages d'Auvergne !

Sommaire

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Contexte.....	3
1.1. Le cycle du carbone en lien avec les changements globaux.....	3
1.2. Le cycle de l'azote en lien avec les changements globaux.....	5
1.3. Différents modes d'occupation des terres en lien avec les services écosystémiques.....	9
1.4. Évolution vers des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement.....	12
2. État de l'art.....	17
2.1. Cycle du carbone et de l'azote dans les écosystèmes.....	17
2.1.1. Couplage dans les écosystèmes.....	17
2.1.2. Des flux de matières importants et similaires entre différents modes d'occupation des terres.....	19
2.2. Paradoxe de la synchronisation sol-plantes dans les systèmes peu perturbés.....	22
2.2.1. Divergence des facteurs environnementaux régissant les activités des plantes et des micro-organismes.....	22
2.2.2. Une synchronisation entre la demande de la plante et l'offre du sol.....	24
2.3. Les processus du sol liés aux interactions sol-plantes.....	25
2.3.1. Matière organique du sol.....	25
2.3.2. Les organismes du sol.....	28
2.3.3. La rhizosphère : interface entre microorganismes et plantes.....	30
2.4. Le « rhizosphere priming effect ».....	32
2.4.1. Définitions.....	32
2.4.2. Facteurs liés à la synchronisation affectant le « rhizosphere priming effect ».....	33
2.4.3. Mesurer le « rhizosphere priming effect ».....	38
2.5. Le mécanisme de banque.....	43
2.5.1. Principe.....	44
2.5.2. Le mécanisme de banque : suggéré mais jamais testé en présence de plantes.....	46
2.6. Pourquoi le fonctionnement des sols cultivés ne semble pas résulter en une synchronisation entre demande de la plante en nutriments et offre du sol ?.....	47
2.6.1. Des pratiques différentes qui résultent en un fonctionnement différent.....	47
2.6.2. Importance des plantes pérennes.....	51
3. Objectifs de la thèse.....	53
3.1. Hypothèses de la thèse.....	53
3.2. Approches de l'étude.....	55
3.2.1. Plateforme expérimentale couplant les mesures de RPE et les flux de CO ₂	56
3.2.2. L'expérimentation dédiée aux mesures de flux d'azote.....	60
4. Plan de la thèse.....	63

CHAPITRE 2 : UNE NOUVELLE PLATEFORME EXPERIMENTALE COUPLANT LE « RHIZOSPHERE PRIMING EFFECT » AVEC LES FLUX DE CO₂ DES SYSTEMES SOL-PLANTES..... 65

Abstract.....	69
1. Introduction.....	70
2. Materials & Methods.....	74
2.1. Description of mesocosms and current experiment.....	74
2.2. System of labeled air production and distribution.....	77
2.3. Monitoring and management of environmental conditions.....	80
2.4. Continuous CO ₂ -exchange measurements.....	80
2.5. Rhizosphere priming effect and dark respiration measurements.....	82
2.6. Uncertainty of rhizosphere priming effect estimates.....	83
2.7. Linking rhizosphere priming effect with CO ₂ fluxes of the plant-soil systems.....	85
2.8. Data analysis.....	85
3. Results.....	86
3.1. Environmental conditions.....	86
3.2. Plant ¹³ C labeling and stability over time.....	87
3.3. Airflow and plant-soil CO ₂ exchange.....	89
3.4. Estimate of rhizosphere priming effect, gross primary production and ecosystem respiration.....	90
3.5. Sensitivity analysis of the rhizosphere priming effect.....	91
4. Discussion.....	94
4.1. The contribution of RPE to plant-soil CO ₂ balance can be quantified with the presented platform....	94
4.2. Uncertainty of RPE estimates due to possible deviation in ¹³ C composition between C source and CO ₂ ...	94
4.3. Air decarbonation coupled to injection of customizable-labeled CO ₂ : an efficient but costly method of plant labeling.....	96
4.4. Air distribution: a simple and efficient system.....	96
4.5. Combining continuous measurements of CO ₂ exchange and plant labeling requires a close surveillance of CO ₂ concentrations in mesocosms.....	97
4.6. The multiple measures to control the environmental conditions partly met their technical challenges.....	97
4.7. Further improvements.....	98
References.....	100
Supplementary materials for “A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems”.....	106
Supplementary tables and figures for “A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems”.....	113

CHAPITRE 3 : PREDIRE LE « RHIZOSPHERE PRIMING EFFECT » : COMPARAISON DE PROXYS REGROUPANT DIFFERENTS TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX..... 121

Abstract.....	125
1. Introduction.....	126
2. Methods.....	127
3. Results & Discussion.....	129
References.....	134
Supplementary materials for “Predicting the rhizosphere priming effect: comparison of proxies under different experimental treatments”.....	138
Supplementary tables and figure for “Predicting the rhizosphere priming effect: comparison of proxies under different experimental treatments”.....	140

CHAPITRE 4: LES PLANTES PERENNES FAVORISENT LA SYNCHRONISATION ENTRE LA DEMANDE DE LA PLANTE EN AZOTE ET L’OFFRE DU SOL EN AZOTE Y COMPRIS EN ASSOCIATION AVEC LE BLE..... 143

1. Introduction.....	146
2. Materials & Methods.....	149
2.1. Experiment presentation and soil sampling.....	149
2.2. Plant sowing and land use management.....	150
2.3. Determination of gross primary production using CO ₂ fluxes measurements.....	152
2.4. Measurements of rhizosphere priming effect and plant C input in soil using ¹³ C isotopic labeling... 153	
2.4.1. The rhizosphere priming effect.....	153
2.4.2. The new plant-originated soil organic carbon.....	154
2.5. Microbial biomass and mineralization-immobilization turnover.....	155
2.5.1. Microbial biomass.....	155
2.5.2. Mineralization-immobilization turnover.....	155
2.6. Leaching measurements.....	157
2.7. Statistical analysis.....	157
3. Results.....	158
3.1. Provisioning and regulating ecosystem services.....	158
3.2. Ecosystem functioning.....	161
3.2.1. Gross primary production.....	161
3.2.2. Rhizosphere priming effect.....	162

3.2.3. Belowground biomass and new plant-originated soil organic carbon.....	163
3.2.4. Microbial carbon biomass.....	165
3.2.5. Mineralization-immobilization turnover.....	165
3.2.6. Mineral nitrogen in soil solution.....	167
3.2.7. Link between belowground and aboveground activities.....	168
4. Discussion.....	170
4.1. Demonstration of the existence of the bank mechanism in grassland.....	170
4.2. Perennial species have a key role in the bank mechanism.....	172
4.3. The functioning of the different land use allows for variable ecosystem services.....	172
4.4. Limits of the study.....	173
4.5. Implications for designing agroecological systems.....	174
References.....	175
Supplementary tables and figures for “Perennial species promote synchronization between plant nitrogen demand and soil nitrogen offer even in wheat intercrop”.....	181
 CHAPITRE 5: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	 185
1. « Rhizosphere priming effect » et flux de carbone.....	187
2. Le mécanisme de banque et la synchronisation sol-plantes.....	191
3. Le mécanisme de banque et les changements globaux.....	197
4. Perspectives.....	201
4.1. Poursuite des efforts méthodologiques pour quantifier les processus rhizosphériques et le mécanisme de banque.....	201
4.2. Implications de nos résultats sur les nouveaux systèmes de cultures.....	205
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 209
 ANNEXES.....	 233
FICHES SYNTHETIQUES.....	234
PART 1: Test of the bank mechanism in a temperate grassland by using seasonal N dynamics and manipulation of carbon and nitrogen to modulate plant nitrogen demand.....	235
PART 2: Intercropping grass with legumes under elevated CO₂ provide higher plant biomass without altering soil regulations.....	243
References.....	251

Index des figures

Chapitre 1 : Introduction générale

Figure 1. 1 : Cycle global du carbone montrant les principaux flux. Source: Lal,2016.....	5
Figure 1. 2 : Schéma global du cycle de l'azote. (a) Processus naturels et anthropiques permettant l'entrée d'N dans les écosystèmes à partir du N ₂ atmosphérique, associés aux taux de dénitrification rejetant du N ₂ dans l'atmosphère. (b) Flux de NO _y et NH _x à l'échelle globale (ne comprenant pas le N ₂ O). Source : Ciais et al., 2013.	7
Figure 1. 3 : Les services fournis par les écosystèmes, indispensables à la vie sur terre, permettent le bien-être des Hommes. Source : Millenium ecosystem assesment.	12
Figure 1. 4 : (A) Compétition, (B) complémentarité (partitionnement des ressources) et (C) facilitation entre deux espèces associées. Les compartiments représentent les différentes formes d'une ressource (i.e. nutriments). Source : Hinsinger et al., 2011.	16
Figure 1. 5 : Schéma simplifié des principaux processus du carbone (C) et de l'azote (N) dans les agroécosystèmes tels que les prairies, les forêts ou les sols cultivés. Source : adapté de Recous et al., 2017	19
Figure 1. 6 : Flux de carbone dans différents modes d'occupation des terres présentés en valeurs absolues et accompagnés de l'incertitude entre parenthèse : (a) Légende des gains et pertes de carbone à partir de la photosynthèse (GPP : production primaire brute) jusqu'au bilan net de gaz à effet de serre, (b) gains et pertes dans les forêts, (c) les prairies et (d) les systèmes cultivés. Source : Schulze et al., 2009.....	21
Figure 1. 7 : Facteurs environnementaux physico-chimiques et biologiques qui affectent l'activité des plantes et des microorganismes.....	23
Figure 1. 8 : Schématisation de la minéralisation de la matière organique associée aux minéraux, dépendante de la libération d'enzymes extracellulaires dans le milieu par les microorganismes. Source : Keiluweit et al. 2015.....	27
Figure 1. 9 : (a) Modélisation du changement de teneur en carbone organique du sol avec le réchauffement à partir de 5 températures initiales ; (b) Relation entre texture du sol et apports de carbone dans le sol sur la teneur en matière organique du sol modélisé avec CENTURY. Source : Krull et al., 2003.	28

Figure 1. 10 : Classification de la faune du sol en fonction de la taille. Source : issue de la présentation de Simon Boudsocq « Interactions biologiques dans les sols ».....	29
Figure 1. 11 : Schéma d'une section longitudinale de racine illustrant les différents types de rhizodépôts relargués par les racines. Source : Jones et al., 2009.....	31
Figure 1. 12 : Schématisation du « rhizosphere priming effect » (RPE) : accélération (RPE positif) ou diminution (RPE négatif) de la décomposition de la matière organique du sol (MOS) due à la présence de racines vivantes. Source : inspiré de Kuzyakov, 2002.....	34
Figure 1. 13 : Effet de la photosynthèse sur l'induction du « rhizosphere priming effect. » (RPE) : (a) estimation du RPE induit dans des pots contenant de la végétation coupée ou non, à 1 et 30 jours après la date de coupe. Source : Shahzad et al., 2012 ; et (b) relation entre RPE et biomasse aérienne d'une méta-analyse. Source : Huo et al., 2017.....	35
Figure 1. 14 : Hypothèses de la magnitude du « rhizosphere priming effect » (RPE) en fonction de la disponibilité en C facilement assimilable (C dec) et en azote minéral dans la solution du sol (N_{min}). MO= microorganismes, SOM= matière organique du sol. Source : Kuzyakov et al., 2002	37
Figure 1. 15 : Schématisation du remplacement du carbone d'un sol sous végétation initiale A (exemple : C3) par le carbone provenant d'une nouvelle végétation B (exemple : C4) Source : Balesdent, 1991.	39
Figure 1. 16 : Méthode de mesures de la respiration des efflux de CO_2 : (a) Méthode développée par Cheng (1996) excluant les parties aériennes des plantes ; (b) Méthode développée par Shahzad et al., (2012) consistant en une incubation de l'ensemble du système sol-plantes....	42
Figure 1. 17 : Schématisation du mécanisme de banque qui ajuste la séquestration de l'azote (N) et du carbone (C) dans la matière organique du sol (MOS) ainsi que leur libération dans la solution du sol. Source : Fontaine et al., 2011.	46
Figure 1. 18 : Évolution de la teneur en carbone organique d'un sol de prairie après avoir été converti en culture. Source : Mariotti ,1996 ; Balesdent et al., 1988	48
Figure 1. 19 : Rendement des principales céréales en France entre 1862 et 2007. Source : Agreste Primeur, 2008.	48
Figure 1. 20 : Flux bruts de transformation de l'azote (N) de prairies et de cultures annuelles : minéralisation brute (min. brute) et immobilisation brute (org. brute) et minéralisation nette. Source : Recous et al., 1996	49

Figure 1. 21 : (a) Effet du labour sur le stock de carbone durant 40 ans dans le sol d'une rotation maïs/blé d'hiver ;(b) Effet du labour sur la teneur en carbone des différents horizons du sol après 40 ans de gestion. Source : Dimassi et al., 2014.....	51
Figure 1. 22 : Azote perdu par lixiviation au cours des 12 années consécutives à l'apport d'azote. Recous et al., (1996).....	52
Figure 1. 23 : Vue d'ensemble de la plateforme expérimentale.....	56
Figure 1. 24 : Réservoir dédié à l'accumulation des eaux de lessivage, intégré à la partie souterraine.	57
Figure 1. 25 : Photographie de la plateforme expérimentale lors des incubations du système sol-plantes pour la mesure du « rhizosphere priming effect ».	59
Figure 1. 26 : Photographie d'un mésocosme équipé d'une chambre transparente..	60
Figure 1. 27 : Incubations et microdiffusion pour déterminer les flux de minéralisation et d'immobilisation brute de l'azote en utilisant une méthode de marquage au ^{15}N	62

Chapitre 2 : Une nouvelle plateforme expérimentale couplant le « rhizosphere priming effect » avec les flux de CO_2 des systèmes sol-plantes

Figure 2. 1 : Schematic representation of the experimental platform.	76
Figure 2. 2 : Pictures of the experimental platform: (A) an overview of the entire platform; (B) a focus on an octopus ; (C) a focus on a mesocosm showing the air flow circulation system and the gas sampling for plant-soil CO_2 exchange analysis ; (D) an overview of the platform after transparent chambers were replaced by dark chambers for the RPE measurements.	79
Figure 2. 3 : (A) Aboveground plant ^{13}C signature over time (February 2017- July 2017) of ryegrass and white clover grown under elevated or ambient CO_2 and initial ^{13}C signature of soil organic carbon; (B) Uncertainty of rhizosphere priming effect (RPE) estimation related to 1‰ change (+0.5‰ and -0.5‰) in delta ^{13}C of plant-derived CO_2 at multiple labeling intensity.	88
Figure 2. 4 : (A) Airflow and net photosynthesis over time (November 2016- July 2017) for one planted treatments: intercrop of ryegrass and white clover under elevated CO_2 ; (B) Net ecosystem productivity (NEP) over two days in February 2017 (2017-02-18 and 2017-02-19) for three treatments: ryegrass under ambient and elevated CO_2 , and unplanted soil.....	90

Figure 2. 5 : Relationship between night respiration estimated by continuous CO ₂ exchange measurements and dark respiration estimated by regular ecosystem incubation for the study period (November 2016 - July 2017).	92
--	----

Chapitre 3 : Prédire le « rhizosphere priming effect » : comparaison de proxys regroupant différents traitements expérimentaux

Figure 3. 1 : (A) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and gross primary production (GPP) (B) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and ecosystem respiration (ER); (C) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and plant aboveground biomass (AGB).	130
--	-----

Chapitre 4: Les plantes pérennes favorisent la synchronisation entre la demande de la plante en azote et l'offre du sol en azote y compris en association avec le blé

Figure 4. 1 : Dynamic of gross primary production from the 1 th November 2016 to the 24 th November 2017 for the different treatments..	162
Figure 4. 2 : Evolution of rhizosphere priming effect (RPE) over the growing season period for each treatment..	163
Figure 4. 3 : (A) Root biomass measured in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment; and (B) new plant-originated soil organic carbon (SOC) for the 0-10cm depth layer across treatments measured in November 2017..	164
Figure 4. 4 : (A) Gross nitrogen (N) mineralization, (B) immobilization and (C) delta of gross N mineralization and immobilization measured in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment.	167
Figure 4. 5 : Mineral nitrogen (N) in soil solution in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment.....	168
Figure 4. 6 : Relationships between the rhizosphere priming effect (RPE) and the gross primary production (GPP) for seven RPE measurements across land uses.....	169
Figure 4. 7 : Relationships between delta MIT and GPP for the two measurements (May and November) across land uses.....	170

Chapitre 5: Discussion générale et perspectives

Figure 5. 1 : Évolution de la production de la biomasse aérienne (AGB) à faible apport de fertilisant ($40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) sur deux ans : (A) 2017 et (B) 2018.. 196

Figure 5. 2 : Rendements aériens de la prairie (grassland), du blé (wheat) et de la culture agro-écologique blé-prairie (wheat+grassland) pour les deux niveaux de fertilisation azotée ($N^- = 40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et $N^+ = 200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) en 2018. 200

Figure 5. 3 : Représentation schématique du système de décarbonatation naturelle de l'air avant marquage au ^{13}C des plantes. 204

Index des tableaux

Chapitre 2 : Une nouvelle plateforme expérimentale couplant le « rhizosphere priming effect » avec les flux de CO₂ des systèmes sol-plantes

Table 2. 1 : Quantification of net ecosystem productivity (NEP), gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER), rhizosphere priming effect (RPE) and the relative contribution of RPE to NEP, GPP and ER during two measurement periods across two treatments: ryegrass under ambient and elevated CO₂, n=4..... 93

Chapitre 3 : Prédire le « rhizosphere priming effect » : comparaison de proxys regroupant différents traitements expérimentaux

Table 3. 1 : Experimental design and treatment codes used in the experimental platform, including three plant species, two levels of N and C fertilization..... 128

Table 3. 2 : Results of mixed linear model to determine a relationship between the rhizosphere priming effect (RPE) and gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER) and plant aboveground biomass (AGB)..... 131

Chapitre 4: Les plantes pérennes favorisent la synchronisation entre la demande de la plante en azote et l'offre du sol en azote y compris en association avec le blé

Table 4. 1 : Soil properties of the three soil layers. 150

Table 4. 2 : Experimental design and treatment codes used in this study. 151

Table 4. 3 : Provisioning and regulating services..... 160

Chapitre 5: Discussion générale et perspectives

Table 5. 1 : Rendement de la production aérienne (t MS ha⁻¹ an⁻¹) de la prairie, de l'association prairie-blé et du blé pour les deux niveaux de fertilisation azotée (N- = 40 kg N ha⁻¹ an⁻¹ et N+ = 200 kg N ha⁻¹ an⁻¹) pour l'année 2018.: 201

Chapitre 1 : Introduction générale

1. Contexte

1.1. Le cycle du carbone en lien avec les changements globaux

Le cycle du carbone (C) s'opère entre différents réservoirs (atmosphère, sol, océan et êtres vivants) traversés par des flux (**Fig.1.1**). Dans la nature, le C peut se retrouver sous la forme inorganique (CO₂, par exemple) ou organique (associé à d'autres éléments pour former les tissus des végétaux et animaux). Le C entre dans les écosystèmes terrestres au travers de l'absorption de CO₂ atmosphérique via la photosynthèse des végétaux (60 Gt y⁻¹) (R. Lal, 2016). Ce C fixé circule ensuite dans les tissus des plantes, la litière et le sol. Au travers de la respiration des végétaux, des animaux et des microorganismes du sol, du C sous forme CO₂ est libéré dans l'atmosphère (**Fig.1.1**). Le cycle du C et le climat sont étroitement liés à l'échelle globale, entraînant la communauté scientifique à porter son attention sur ce cycle dans un contexte de changement planétaire (IPCC, 2014).

Depuis le début de l'ère industrielle (1750), la concentration en CO₂ dans l'atmosphère est en constante augmentation de telle sorte que de 1750 à 2010, elle a augmenté de 40%, passant d'environ 280 ppm à 390 ppm (IPCC, 2014). Cette augmentation s'est accélérée depuis les années 1960 et a atteint une valeur moyenne de +1.93 ppm an⁻¹ entre 2000 et 2006 (Canadell et al., 2007). Cette hausse de la concentration en CO₂ atmosphérique est induite par les activités anthropiques résultant principalement de la combustion des énergies fossiles, du changement d'utilisation des terres et en particulier de la conversion de forêts ou prairies en terres cultivées (Ciais et al., 2013).

Le CO₂ est l'un des principaux gaz à effet de serre et ces émissions ont conduit à l'augmentation de la température moyenne de la surface terrestre (+0.85°C depuis 1880) (IPCC, 2014). Cette augmentation de la température est à l'origine d'une modification profonde du climat aux conséquences désastreuses : augmentation de l'occurrence d'évènements climatiques extrêmes tels que la sécheresse (entraînant de faibles rendements agricoles), fortes

pluies, intensification des ouragans et cyclones détruisant tout sur leur passage (Easterling et al., 2000). La fonte des glaciers (i.e. Groenland, pôles), entraînant une augmentation du niveau des mers et menaçant les îles et villes côtières, est aussi une conséquence directe du changement climatique (Nicholls and Cazenave, 2010). Ce constat est au cœur des préoccupations et conduit la communauté internationale à fixer des orientations pour limiter les émissions de CO₂. Entre autres exemples, le protocole de Kyoto (COP 3, 1997) puis de la COP21 (2015) visent à limiter l'augmentation de la température de 2°C d'ici à 2100 et ce afin d'éviter les scénarii les plus catastrophiques prédisant une hausse de 3.7 °C supplémentaires, si rien ne change (IPCC, 2014). Le dernier rapport de l'IPCC met en avant que, si l'on souhaite tenir ces engagements, les émissions de CO₂ doivent baisser de 45% d'ici à 2030 pour atteindre un bilan (émission - stockage) neutre d'ici à 2050 (IPCC, 2018).

Il est admis que le sol constitue une des plus grandes réserves de carbone terrestre (2300 Gt) environ trois fois supérieure au C contenu dans la biomasse végétale (620 Gt) et deux à quatre fois supérieur au C contenu dans l'atmosphère (828 Gt C) (Lal, 2004; Rattan Lal, 2016) (**Fig.1.1**). De plus, le réservoir de C dans les sols est 227 fois supérieur aux émissions de CO₂ anthropiques (combustion de carburant fossile et déforestation réunis) vers l'atmosphère. En effet, sur les $9.9 \pm 0.5 \text{ Gt C an}^{-1}$ émises par la combustion des énergies fossiles et les $0.9 \pm 0.5 \text{ Gt C an}^{-1}$ émises par le changement d'utilisation des terres, seulement la moitié reste dans l'atmosphère. L'autre moitié est absorbée par les « puits de C » que sont les océans et les écosystèmes terrestres (végétations, animaux et sols) (Rattan Lal, 2016). Ces valeurs soulignent l'importance du sol dans le cycle biogéochimique du C et mettent en avant qu'un petit changement du pool de carbone organique du sol SOC (majorité du C dans le sol) peut avoir de grandes répercussions sur les concentrations en CO₂ atmosphérique à l'échelle globale (Lal, 2004; Kuzyakov, 2006; Heimann and Reichstein, 2008). En ce sens, Stéphane Le Foll, ancien ministre de l'agriculture en France, a proposé, à la COP21 de Paris en 2015, l'initiative 4 pour

mille afin de compenser les émissions annuelles de CO₂ anthropiques. Cela consiste à incorporer dans les sols agricoles quatre grammes de C organique pour mille grammes de CO₂ émis chaque année. Afin de permettre l'augmentation de la séquestration de C, un changement du mode de production est conseillé : favorisation de l'agroforesterie ou des couverts végétaux permanents (Rattan Lal, 2016; Chabbi et al., 2017).

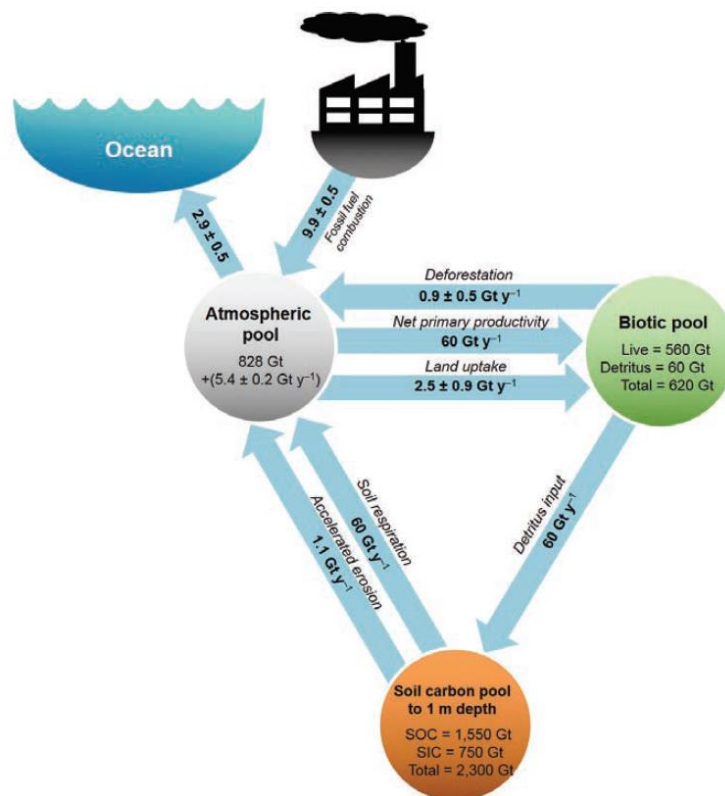


Figure 1. 1 : Cycle global du carbone montrant les principaux flux exprimés en Gt C an⁻¹.

Source: Lal, 2016

1.2. Le cycle de l'azote en lien avec les changements globaux

L'azote (N) est un nutriment essentiel pour la croissance des plantes ainsi que pour tous les organismes vivants puisque c'est un constituant majeur des protéines (Vitousek and Howarth, 1991). Il constitue un des principaux facteurs limitants de la production primaire et par conséquent contrôle la dynamique des écosystèmes au travers des chaînes trophiques (Vitousek

et al., 1997). En effet, les plantes puisent l'N dans le sol, sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+), mais leurs concentrations y sont nulles dans un sol jeune (Richardson et al., 2004). De façon naturelle, la voie majeure d'entrée d'N dans les écosystèmes se fait par fixation biologique de l'azote atmosphérique (diazote, N_2) par certaines espèces de bactéries (rhizobium) ou de plantes (légumineuses) qui sont en symbiose avec ces bactéries fixatrices (Vitousek and Howarth, 1991; Ciais et al., 2013) (**Fig.1.2a**). L'N peut aussi entrer dans les écosystèmes au travers de dépôts d'N atmosphérique (**Fig.1.2b**) par exemple via les pluies où le N_2 est précipité sous forme de NO_3^- et NH_4^+ (Fowler et al., 2004).

Face à l'accroissement de la population mondiale, la révolution verte a permis une augmentation spectaculaire de la production agricole et ainsi la réduction de la faim dans le monde grâce aux progrès scientifiques et techniques réalisés dans le domaine des croisements génétiques, de la chimie et des engins agricoles (Tilman et al., 2001). L'invention du procédé de Haber-Bosch, au début du 20^{ème} siècle, a permis de synthétiser de l'ammonium (NH_4^+) de façon artificielle à partir du N_2 présent en quantité non limitante dans l'atmosphère (Haber and Rossignol, 1913) et de développer la fertilisation avec ces engrais de synthèse. De plus, les cultures de légumineuses participent également à l'enrichissement des sols et sont utilisées pour nourrir les hommes et le bétail, en particulier dans les pays en voie de développement (Hubbell, 1995). Ces deux pratiques agricoles -utilisation d'engrais de synthèse et espèces fixatrices- sont les principales sources d'entrée d'N dans les écosystèmes terrestres et triplent l'apport d'N comparé au cycle naturel, à l'échelle globale (**Fig.1.2a**) (Ciais et al., 2013).

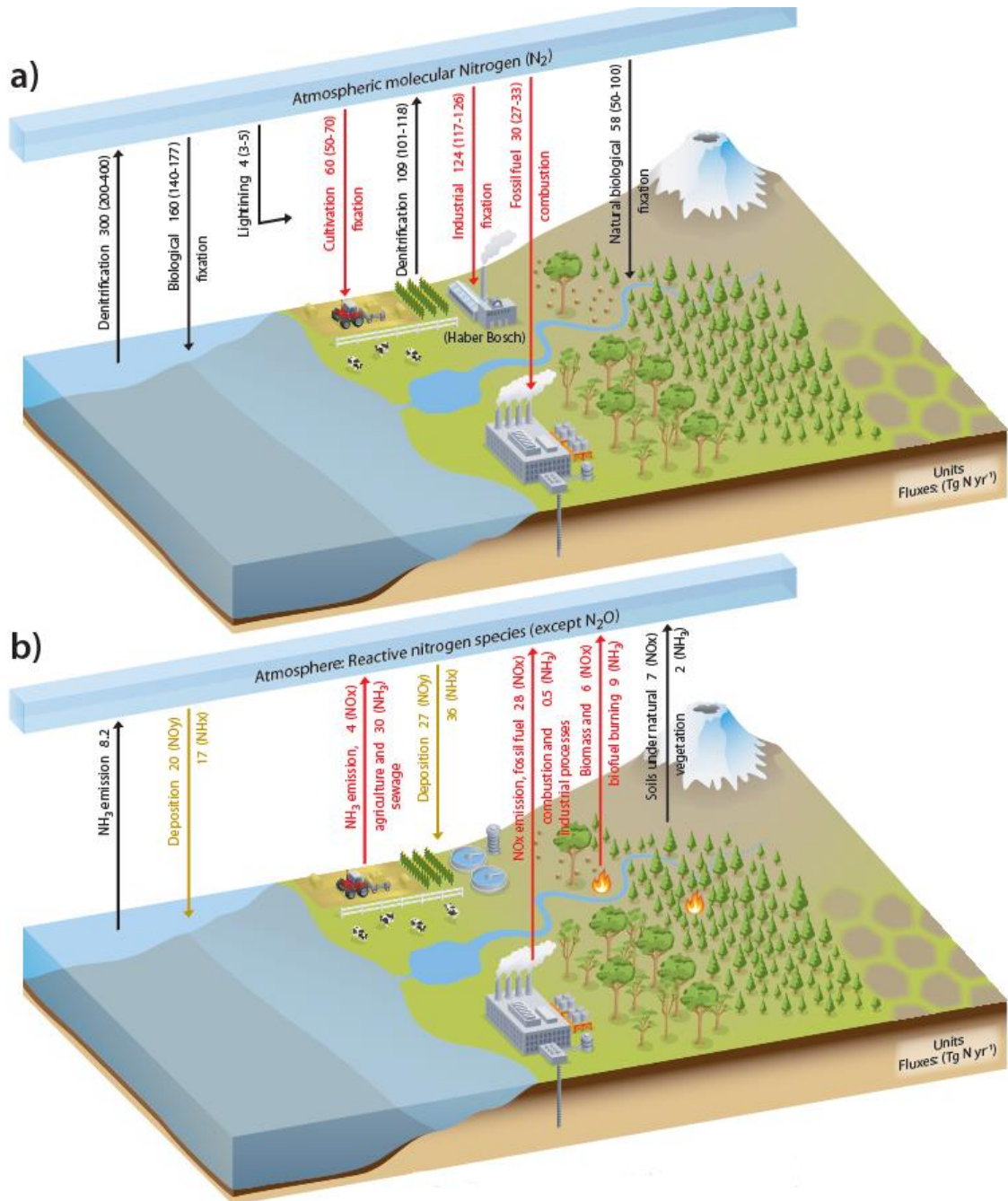


Figure 1. 2 : Schéma global du cycle de l'azote. (a) Processus naturels et anthropiques permettant l'entrée d'N dans les écosystèmes à partir du N_2 atmosphérique, associés aux taux de dénitrification rejetant du N_2 dans l'atmosphère. (b) Flux de NO_y et NH_x à l'échelle globale (ne comprenant pas le N_2O). Source : Ciais et al., 2013.

L'augmentation considérable de ces intrants azotés a pour conséquence la perturbation profonde du cycle de l'N et de graves problèmes environnementaux (Matson et al., 1997; Galloway et al., 2004; Billen et al., 2013). En effet, l'utilisation intensive d'intrants azotés conduit à l'augmentation de la libération de dioxyde nitreux (N_2O) dans l'atmosphère, un puissant gaz à effet de serre dont le potentiel de réchauffement global est 300 fois supérieur à celui du CO_2 et, qui plus est, participe à la destruction de la couche d'ozone (Venterea et al., 2012; IPCC, 2014). De plus, d'importantes pertes d'N sous forme de nitrate (NO_3^-) sont également observées à travers la lixiviation (Smil, 1999; Bodson and Vandenberghe, 2013). La lixiviation des nitrates dans les sols a pour conséquence la contamination des eaux souterraines mais aussi des eaux de surface à travers l'eutrophisation (Matson et al., 1997). L'eutrophisation, touchant les lacs, les rivières, les estuaires et les écosystèmes côtiers, correspond à une prolifération de la biomasse algale en réponse à un excès de nutriments et conduit ainsi, via l'anoxie du milieu, à une perte de la biodiversité de l'écosystème initial (Smith, 2003). Ce phénomène peut avoir des conséquences socioéconomiques importantes pour les écosystèmes côtiers et aquatiques (tourisme, potabilisation, conchyliculture, ostréiculture) (Dodds et al., 2009).

De nombreux progrès ont cependant été réalisés en France afin de réduire les problèmes environnementaux liés à l'utilisation de fertilisants. En effet, la mobilisation de nombreux agronomes a permis l'augmentation de l'efficacité d'utilisation par la plante de l'N apporté (Lemaire and Nicolardot, 1997). La méthode du bilan azoté prévisionnel consiste ainsi à calculer la dose conseillée d'engrais à apporter en culture annuelle en fonction de l'objectif de rendement, de la demande de la plante (*i.e.* environ 3kg quintaux^{-1} en blé) et de la fourniture en N par le sol au cours de la période de croissance (*i.e.* reliquat en sortie d'hiver, minéralisation de la matière organique du sol et arrières effets des cultures précédentes) (Hébert, 1969; Rémy, 1974; Comité Français d'Etude et de Développement de la Fertilisation Raisonnée, 2013). La

meilleure connaissance des stades de croissance des plantes où le besoin en N est primordial a permis le fractionnement au cours de l'année de la dose conseillée d'intrants. Parallèlement, des outils de diagnostic en temps réel, correspondant à des indicateurs de l'état nutritionnel des plantes telles que le blé (Justes et al., 1994), ont été développés afin d'ajuster les apports d'intrants au plus près des besoins des plantes. Ces méthodes ont pu être améliorées et affinées au travers des modèles tels que ceux sur la minéralisation de l'N du sol (Mary et al., 1998; Houlès et al., 2004; Brisson et al., 2010).

Cependant, l'ensemble de ces efforts demeurent insuffisants à l'échelle globale puisque la lixiviation des nutriments minéraux persiste. Certaines études expliquent ce phénomène en montrant que seulement la moitié des intrants de N est absorbée par les cultures et mettent en avant que les applications d'intrants s'avèrent peu efficaces (Smil, 1999; Tilman et al., 2002; Gardner and Drinkwater, 2009). En effet, Hinsinger et al. (2011) montrent que l'utilisation de fertilisant N a augmenté d'un facteur 8,8 entre 1960 et 2008, alors que la production de céréales a seulement triplé à l'échelle mondiale. Si la gestion de la fermeture du cycle de l'N reste extrêmement difficile et délicate en cultures annuelles de céréales, c'est moins le cas pour d'autres modes d'occupation des terres.

1.3. Différents modes d'occupation des terres en lien avec les services écosystémiques

Depuis 12 000 ans, l'agriculture n'a cessé de se répandre à travers le monde au détriment des écosystèmes naturels (*i.e.* forêts) de telle sorte que les surfaces recouvertes par les prairies et les cultures annuelles ont augmenté de 16.7% entre 1985 et 2013 (Borrelli et al., 2017; Lorenz and Lal, 2018a).

Les prairies constituent un mode d'occupation des terres majeur puisqu'elles recouvrent 26% des terres émergées et 70% des terres agricoles, soit 35 million de km² (Conant, 2012). Les prairies se définissent comme des écosystèmes terrestres dominés par une végétation d'espèces herbacées et arbustives pouvant se trouver dans des climats tropicaux, subtropicaux, tempérés

et boréals (Lorenz and Lal, 2018b). La végétation est maintenue à un stade herbacé et arbustif par le feu, le pâturage, la sécheresse ou les basses températures. Dans la plupart des zones, les prairies ne constituent pas la végétation naturelle et sont mises en place par l'Homme en déboisant des terres et sont maintenues pour des raisons agricoles (Chang et al., 2016a). Elles sont dites permanentes dans le cas où elles sont composées de plantes pérennes ou annuelles auto-ensemencées (graminées et légumineuses essentiellement) depuis plus de 5 ans et gérées à différents niveaux d'intensité par le pâturage et/ou par la fauche (Plantureux et al., 2012). Les prairies ont un rôle économique majeur car elles permettent la production de grandes quantités de fourrage servant à alimenter le bétail afin de produire de la viande, du lait, du fromage, du cuir et de la laine. Par exemple en France, les prairies représentent environ 45% de la surface agricole utile (Huyghe, 2007) et ont produit en 2017 environ 62 millions de tonnes de fourrages sur 12.4 millions d'hectares (Agreste Centre-Val de Loire, 2018). Elles constituent un réservoir de C important puisqu'elles stockent à l'échelle globale 119-121 Gt C dans la végétation et 176-295Gt C dans le sol, avec un stockage annuel oscillant entre 0.5 à 3 t C ha⁻¹ an⁻¹ (Conant et al., 2017; Erb et al., 2018; Lorenz and Lal, 2018b). Enfin, en prairie, la lixiviation de l'N reste faible en dessous d'une fertilisation n'excédant pas 250-300 kg N ha⁻¹ (Benoit, 2007; Gibson, 2009; Ledgard et al., 2011).

Les cultures annuelles conventionnelles dédiées à la production de céréales (blé, riz, maïs, tournesol) recouvrent 9% des terres émergées soit 11.25 million de km² dont la plupart sont localisées en Asie, Europe et Union Soviétiques (Ramankutty et al., 2008; Lorenz and Lal, 2018c). Les cultures annuelles conventionnelles actuelles sont le résultat de milliers d'années de domestication par l'Homme. En effet, la révolution verte alliant croisements génétiques, mécanisation et synthèse d'engrais a joué un rôle majeur dans le développement de la production, pour aboutir à un triplement de la production en augmentant seulement de 30% les surfaces utilisées. En parallèle, des pratiques ont été mises en place pour intensifier la

production : labour de plus en plus profond, mise à nu des sols avant la prochaine culture, utilisation intensive d'intrants fertilisants et de pesticides. En 2018 par exemple, 2.6 milliard de tonnes de céréales ont été produites dans le monde dont 63.5 millions de tonnes en France (Agreste, 2018). Étant donné que la demande est toujours plus importante, les écosystèmes prairiaux sont remplacés par des cultures (*i.e.* céréales) et ces conversions ont de lourdes conséquences sur les stocks de C dans le sol puisque 59% du stock de C initial est perdu dans le premier mètre du sol (Guo and Gifford, 2002). En effet, on estime que le stockage des cultures annuelles est de $0.16 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Ciais et al., 2011), ce qui est en deçà du potentiel de stockage du sol (Lorenz and Lal, 2018c). De plus, seulement 30 à 50 % des intrants azotés sont utilisés par les végétaux, conduisant à de fortes pertes d'N via lixiviation lors des périodes de sol nu (Recous et al., 1996; Tilman et al., 2002; Billen et al., 2013).

Les prairies et les cultures fournissent des services à l'homme dont la magnitude dépend du fonctionnement de ces deux agroécosystèmes. Les fonctions et les services écosystémiques associés sont classés en quatre groupes (**Fig. 1.3**) (MEA, 2005) : 1) les services de soutien (production primaire, pollinisation et cycles biogéochimiques) ; 2) les services de régulation (séquestration de C, prévention de la lixiviation des éléments minéraux pour assurer la qualité des eaux et fertilité des sols) ; 3) les services d'approvisionnement (biomasse végétale) ; et 4) les services culturels (paysage, connaissance et savoir-faire). Alors que les prairies sont des systèmes peu perturbés favorisant les services de régulation (stock de C, faible lixiviation de l'N) et d'approvisionnement (production de fourrage), il n'en est pas de même pour les cultures annuelles qui sont en expansion.

Selon les prédictions et malgré la prise de conscience de la dégradation importante des écosystèmes par l'activité agricole, la surface globale dédiée aux cultures devrait encore augmenter au travers de la déforestation et de la conversion de prairies en cultures (Tilman et al., 2001; MEA, 2005). Nous assistons ainsi à un compromis entre nourrir une population

humaine grandissante et les problèmes environnementaux associés. L'ensemble de ces constatations amène aujourd'hui la communauté scientifique à s'interroger sur la durabilité de nos activités ainsi que sur le devenir de la planète, si aucun changement n'est fait (Rockström et al., 2009; Steffen et al., 2015).

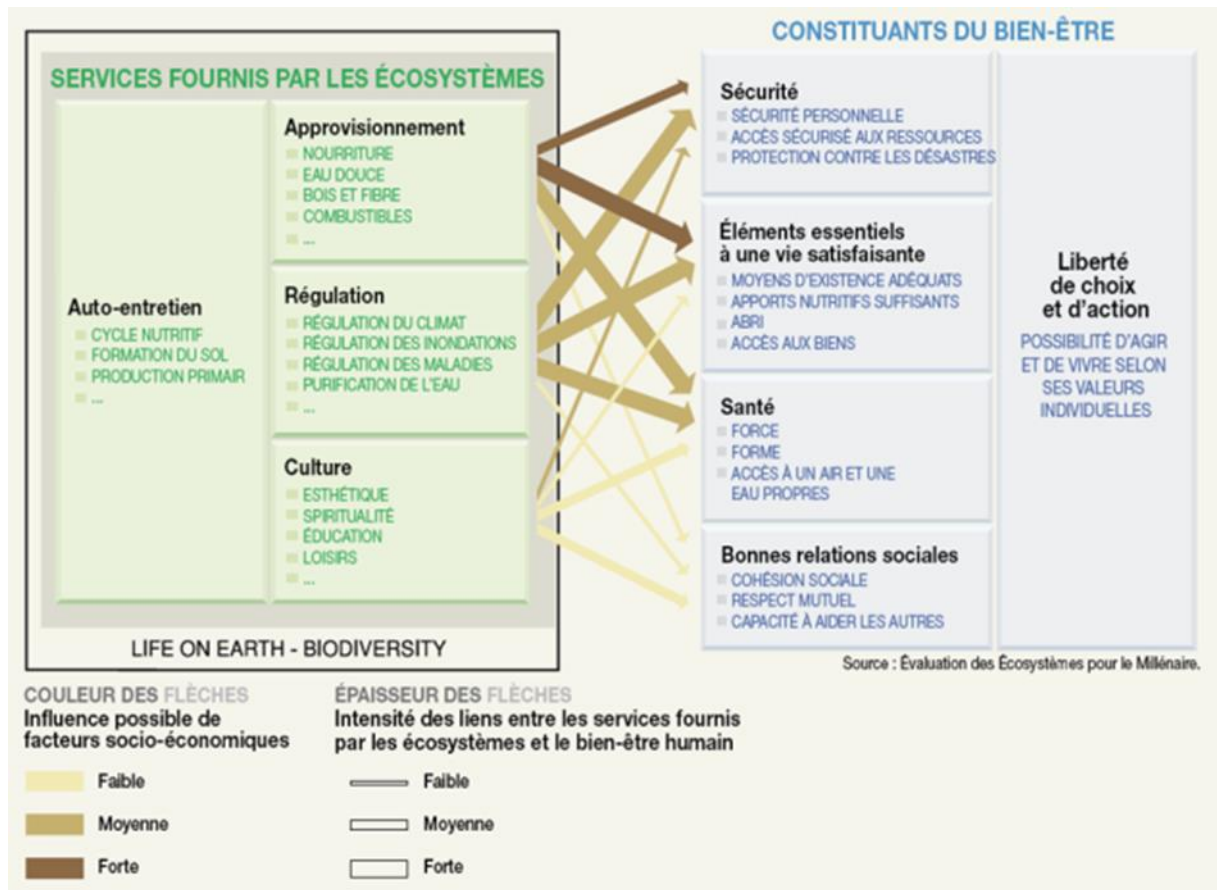


Figure 1. 3 : Les services fournis par les écosystèmes, indispensables à la vie sur terre, permettent le bien-être des Hommes. Source : Millenium ecosystem assesment.

1.4. Évolution vers des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement

La vision du modèle agricole moderne est aujourd'hui remise en cause et un nouveau paradigme a émergé : l'intensification écologique (Altieri, 1989). Elle a pour but de limiter

l'impact négatif de l'activité agronomique sur l'environnement et, ainsi, de préserver les ressources, la diversité et de maintenir des services écosystémiques au travers de la conception de nouveaux systèmes agricoles. Ces agroécosystèmes sont inspirés des processus écologiques observés dans les milieux naturels afin d'atteindre des objectifs de production satisfaisants, tout en respectant l'environnement (Doré et al., 2011). Si les scientifiques s'accordent sur le fait de faire intervenir des organismes vivants afin de rétablir les régulations biologiques perdues dans les systèmes de cultures conventionnelles, différents leviers d'actions sont proposés : diminution des pesticides (insertion de prédateurs naturels des ravageurs), diminution du travail du sol (semis direct), diminution des engrais fertilisants tout en augmentant la fertilité des sols (promouvoir la diversité spécifique et la présence d'un couvert permanent). Au cours de ce travail de thèse, le dernier point a été développé afin d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'N dans des agroécosystèmes en les rendant moins dépendants à la fertilisation.

Les variétés actuelles de céréales ont été sélectionnées pour une forte production dans un milieu non limitant en nutriments, alors que les variétés plus anciennes ont des capacités d'acquisition des ressources plus importantes et peuvent survivre dans des milieux pauvres (Wissuwa, 2003; Hinsinger et al., 2011). Ainsi, certains scientifiques travaillent sur la sélection de variétés anciennes pérennes (blé, maïs, riz, tournesol) en remplacement des cultures annuelles classiques ; ce afin d'éviter la perturbation des sols sur plusieurs années (labour), de diminuer l'utilisation d'intrants et de favoriser le stockage de C, plus important qu'en cultures conventionnelles (Scheinost et al., 2001; J. D. Glover et al., 2010; Pimentel et al., 2012). Cependant, de grandes améliorations peuvent encore être mises en place dans l'utilisation de ces types de cultures afin de permettre un meilleur rendement en grain (Wagoner, 1990; Culman et al., 2013).

La mise en place d'agroécosystèmes basés sur la mise en culture de différentes espèces sur une même parcelle est aussi étudiée afin d'augmenter l'efficacité d'utilisation des nutriments

au travers de régulations et d'interactions biologiques (Malézieux et al., 2009). Sur un même champ, des espèces de grandes cultures, de pâturages, d'arbres ou une combinaison de ceux-ci peuvent coexister au même moment (culture intercalaire en rang ou en mélange) ou dans le temps (rotation) (Snapp, 2017). En général, l'espèce associée à la culture d'intérêt possède des aptitudes particulières de mobilisation des ressources. Différents processus peuvent alors se mettre en place, conduisant à une meilleure exploitation des ressources : complémentarité de niche et facilitation (Hinsinger et al., 2011; Li et al., 2014; Duchene et al., 2017). La complémentarité de niche correspond à une utilisation différentielle d'une même ressource par partitionnement dans le temps, l'espace ou sous différentes formes, diminuant la compétition pour cette ressource (*i.e.* différente profondeur d'enracinement, fixatrice d'N ou non) (Macarthur and Levins, 1967) (**Fig.1.4B**). La facilitation se définit par une interaction dans laquelle une espèce bénéficie de la présence de l'autre, de par la capacité de l'autre espèce à modifier les conditions biotiques et/ou abiotiques du milieu sans que cela lui nuise (exemple : transfert via les mycorhizes) (**Fig. 1.4C**) (Callaway, 1995).

Une des associations végétales les plus étudiées et utilisées consiste en l'association de céréales et de légumineuses telles que le blé et le pois protéagineux. En effet, les légumineuses ont l'aptitude de fixer l'N atmosphérique via la symbiose rhizobienne prenant place dans des nodosités situées sur son système racinaire (Fujita et al., 1992). En association, la légumineuse pourrait privilégier la fixation d'azote atmosphérique laissant l'N minéral du sol pour la céréale (complémentarité). Les études s'intéressant à l'association céréales et légumineuses utilisent soit le semis simultané de deux espèces annuelles d'intérêts pour une récolte au même moment soit les rotations de cultures. Dans le cas de culture simultanée, l'association permet d'augmenter le rendement de la céréale à bas niveaux d'intrants en comparaison à une monoculture. Cette augmentation n'est pas systématiquement observée à plus hauts niveaux d'intrants, soulignant l'importance de la gestion de la compétition (**Fig. 1.4A**) (Brooker et al.,

2005; Hinsinger et al., 2011; Betencourt et al., 2012). De plus, la période de sol nu hivernale reste présente et ne permet pas de diminuer les risques de lixiviation des nutriments (Plaza-Bonilla et al., 2015). Dans le cas de rotation, l'utilisation de légumineuses permet de diminuer les apports d'engrais lors de la culture de la céréale et peut augmenter la production de grain, mais la lixiviation de l'N bien que diminuée reste présente (Plaza-Bonilla et al., 2015, 2017).

Au vu des services apportés par les prairies (peu de lixiviation, stockage du C et production à bas niveaux d'intrants) en comparaison aux cultures annuelles de céréales, de nouvelles orientations ont récemment été proposées mais n'ont pas encore été mises au point. Elles consistent à favoriser une couverture permanente d'espèces pérennes (e.g prairie : légumineuses et non légumineuses) tout au long de l'année afin d'imiter la structure des prairies et de garantir les mêmes fonctions.

S'il semble évident que les pratiques agricoles doivent évoluer afin de pallier aux problèmes environnementaux provoqués par la production de cultures annuelles, les nouveaux systèmes actuellement proposés apparaissent encore largement perfectibles ; bien que des mécanismes clés sur lesquels se focaliser aient été identifiés. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'améliorer notre compréhension du fonctionnement des écosystèmes naturels ou peu perturbés (e.g. prairie). En effet, les régulations microbiennes et rhizosphériques prenant place dans ces écosystèmes pourraient être réinjecter dans les systèmes de cultures afin d'améliorer les services que rendent les agroécosystèmes.

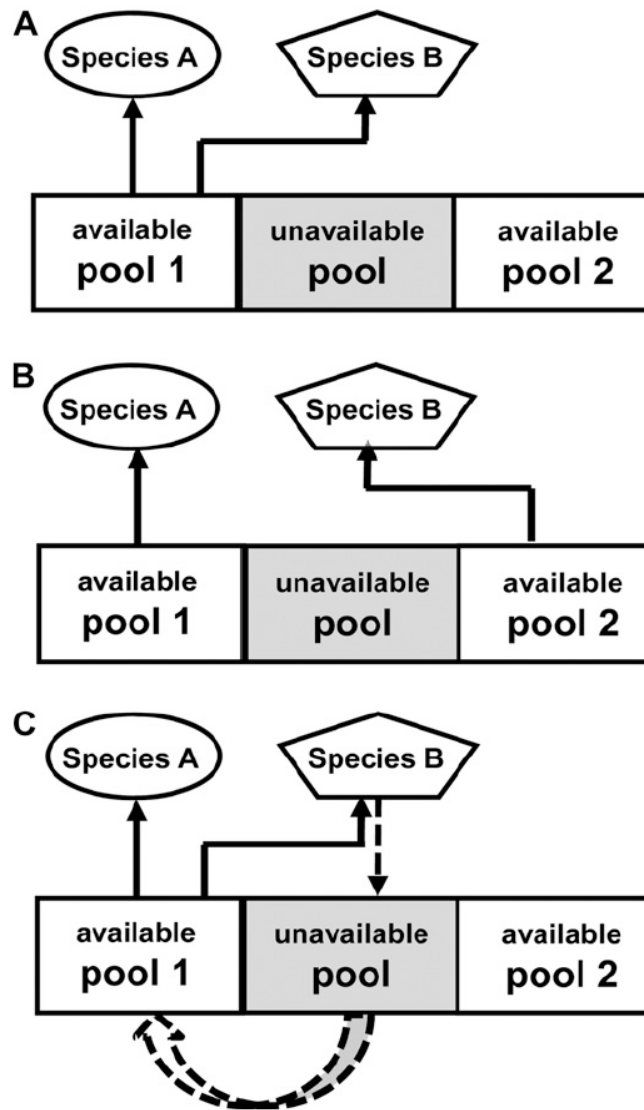


Figure 1. 4 : (A) Compétition, (B) complémentarité (partitionnement des ressources) et (C) facilitation entre deux espèces associées. Les compartiments représentent les différentes formes d'une ressource (i.e. nutriments). Les flèches pleines représentent l'absorption de la ressource et les flèches en pointillées représentent les mécanismes par lesquels l'espèce B acquiert la ressource *a priori* non disponible. Source : Hinsinger et al., 2011.

2. État de l'art

2.1. Cycle du carbone et de l'azote dans les écosystèmes

2.1.1. Couplage dans les écosystèmes

La construction des organismes vivants implique environ 25 éléments différents (C, N, phosphore, soufre...) dans des proportions bien définies (Sterner and Elser, 2002). Les organismes ont besoin de C, mais aussi d'N pour leurs protéines, de phosphore pour les molécules portant l'énergie chimique (ATP), de métaux pour leurs enzymes, de sorte que les rapports d'abondance d'éléments dans les organismes vivants ne peuvent pas varier énormément. L'existence de ces contraintes dites « stœchiométriques » implique que les organismes contrôlent les cycles de la plupart des éléments ainsi que leur couplage. Dans le cadre de cette thèse, le couplage entre le cycle du C et de l'N sera étudié en détail à l'échelle du système sol-plantes des écosystèmes.

La **figure 1.5** représente les processus impliqués dans le couplage des cycles du C et de l'N applicables à tous les écosystèmes cultivés ou non. Dans les écosystèmes, les végétaux prélèvent le CO₂ de l'atmosphère au travers de la photosynthèse et en rejettent par la respiration. Dans le même temps, les plantes absorbent de l'N provenant de la solution du sol et de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Les entrées de C et d'N organiques dans le sol se font au travers de la restitution des litières et de la rhizodéposition des plantes, mais aussi au travers des déjections animales dans le cas d'écosystèmes pâturés. Les microorganismes du sol tirent leur énergie de la décomposition du C et de l'N organique provenant des végétaux, mais aussi de la matière organique déjà présente dans le sol. Une partie du C organique est minéralisée et libérée sous forme de CO₂ et l'autre partie est assimilée par la biomasse microbienne. Dans le même temps, une partie de l'N organique est minéralisée puis assimilée par les microorganismes (immobilisation). Lorsque la minéralisation de l'azote est supérieure à l'immobilisation, l'excédent d'N se retrouve dans la solution du sol et peut être absorbé par les

plantes ou lixivié. Les microorganismes morts sont consommés par des microorganismes vivants et les processus d'assimilation et de minéralisation se reproduisent.

Selon la concentration en N dans le substrat en décomposition (litière et rhizodépôts) et le rapport C : N des microorganismes, l'N disponible pour l'assimilation du C au cours de la dégradation du substrat sera limitant ou pas (Recous et al., 2017). Par exemple, si le rapport C : N du substrat est grand (teneur en C élevé en comparaison de l'N) et que de l'N minéral est disponible dans la solution du sol, il sera prélevé par les microorganismes (i.e. immobilisation) pour permettre l'assimilation du C. Au contraire, si l'N minéral est peu disponible dans la solution du sol, la croissance des microorganismes pourrait être limitée. Dans le cas où le ratio C : N du substrat est petit, l'N disponible lors de la dégradation du substrat sera en excès et pourra être libéré dans le sol (i.e. minéralisation).

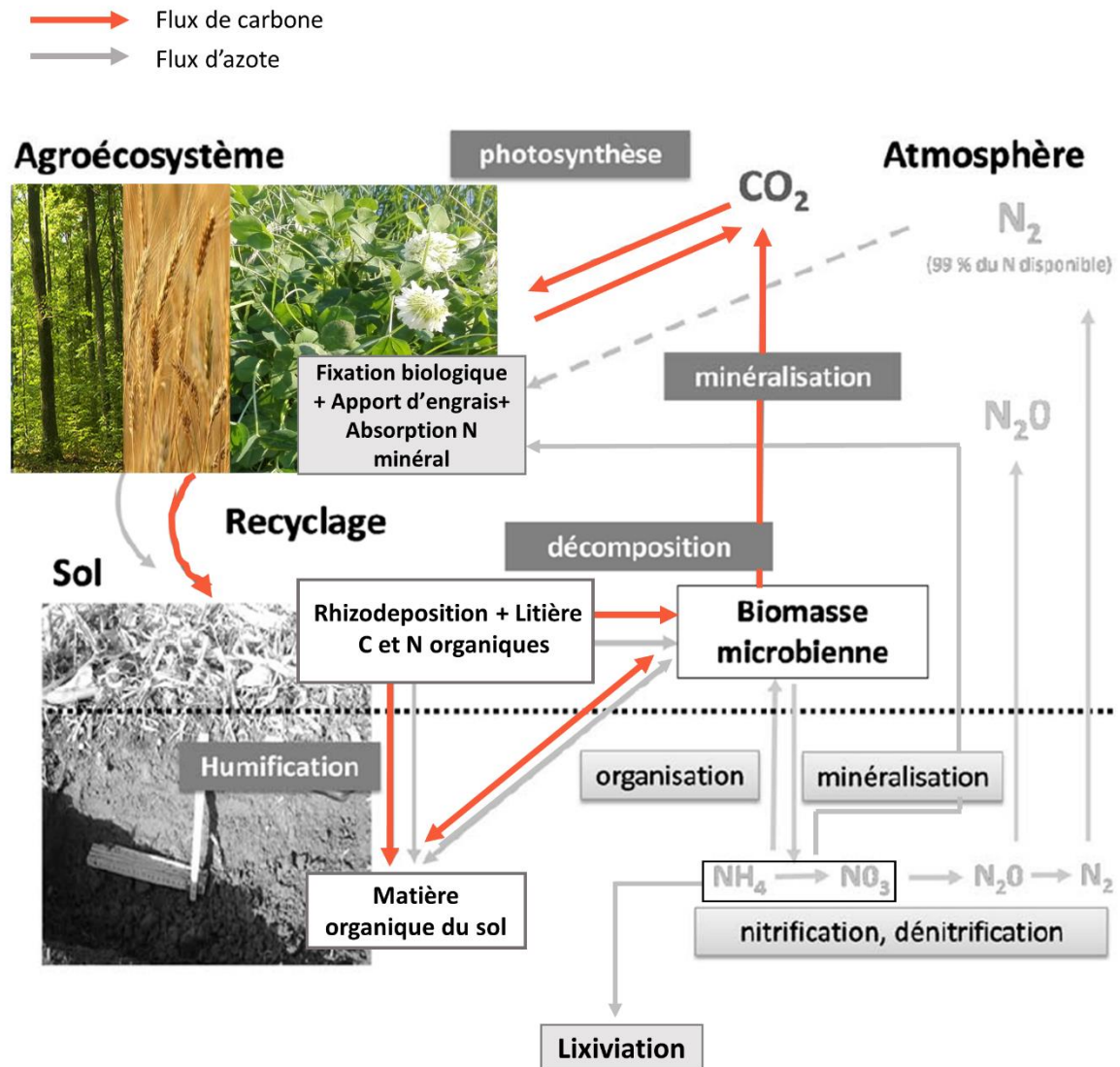


Figure 1. 5 : Schéma simplifié des principaux processus du carbone (C) et de l'azote (N) dans les agroécosystèmes tels que les prairies, les forêts ou les sols cultivés. Source : adapté de Recous et al., 2017

2.1.2. Des flux de matières importants et similaires entre différents modes d'occupation des terres

Bien qu'il soit impossible de quantifier à l'échelle des écosystèmes la part de chacun des flux dans les bilans de C et d'N, la quantification du bilan de l'écosystème est possible grâce aux mesures d'échanges de CO_2 fournies par les tours à flux (soustraction entre la somme des

flux entrants et sortants de l'écosystème) (Reichstein et al., 2005). Ces bilans permettent d'estimer des services écosystémiques fournis par chacun des écosystèmes (production et stockage des éléments).

L'étude de Schulze et al. (2009) modélise en Europe les gains et les pertes de C de trois types d'écosystèmes que sont les forêts, les prairies et les sols cultivés, ainsi que leur bilan net d'émissions de gaz à effet de serre (indicateur du stockage de C). Cette étude montre que la production primaire brute (gross primary production, GPP) semble sensiblement supérieure en prairie avec $13.43 \pm 0.27 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ en comparaison des forêts et terres cultivées avec $11.07 \pm 0.06 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et $11.20 \pm 0.22 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, respectivement (**Fig. 1.6**). Le bilan net d'émission de CO₂ est positif pour les sols cultivés et négatif pour les forêts et les prairies. Cela suggère que les prairies et les forêts sont des puits de C, c'est-à-dire qu'elles permettent de stocker du C, tandis que les sols cultivés (cultures annuelles) sont des sources de C, impliquant qu'ils déstockent du C (Schulze et al., 2009). D'autres études portant sur les stocks de C dans les sols cultivés montrent que le bilan de C des écosystèmes de sols cultivés peut être faiblement positif ($0.16 \pm 0.18 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, stockage) mais aussi négatif ($1.5 \pm 1.1 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, déstockage) (Ciais et al., 2011; Loubet et al., 2011). De plus, la perte d'N dans ces sols cultivés est grande (Recous et al., 1996; Tilman et al., 2002; Loubet et al., 2011). Au contraire, les prairies stockent du C dans le sol quel que soit leur régime de fertilisation (Chang et al., 2016b; Conant et al., 2017) et la lixiviation est très faible même en cas de fertilisation (Benoit, 2007). En forêt, le stockage annuel de C peut varier entre $0.7 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et $3.5 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Curtis et al., 2002).

Comment expliquer que les bilans de ces écosystèmes soient différents alors que les entrées de C à l'intérieur de chacun sont similaires ? Les lois qui régissent les flux de matière entre plantes et microorganismes du sol dans les écosystèmes naturels ou peu perturbés (*i.e.* forêts, prairies) doivent être différentes de celles régissant les écosystèmes cultivés (*i.e.* cultures

annuelles) et doivent être étudiées et comprises plus précisément pour pouvoir améliorer nos modes de productions actuels.

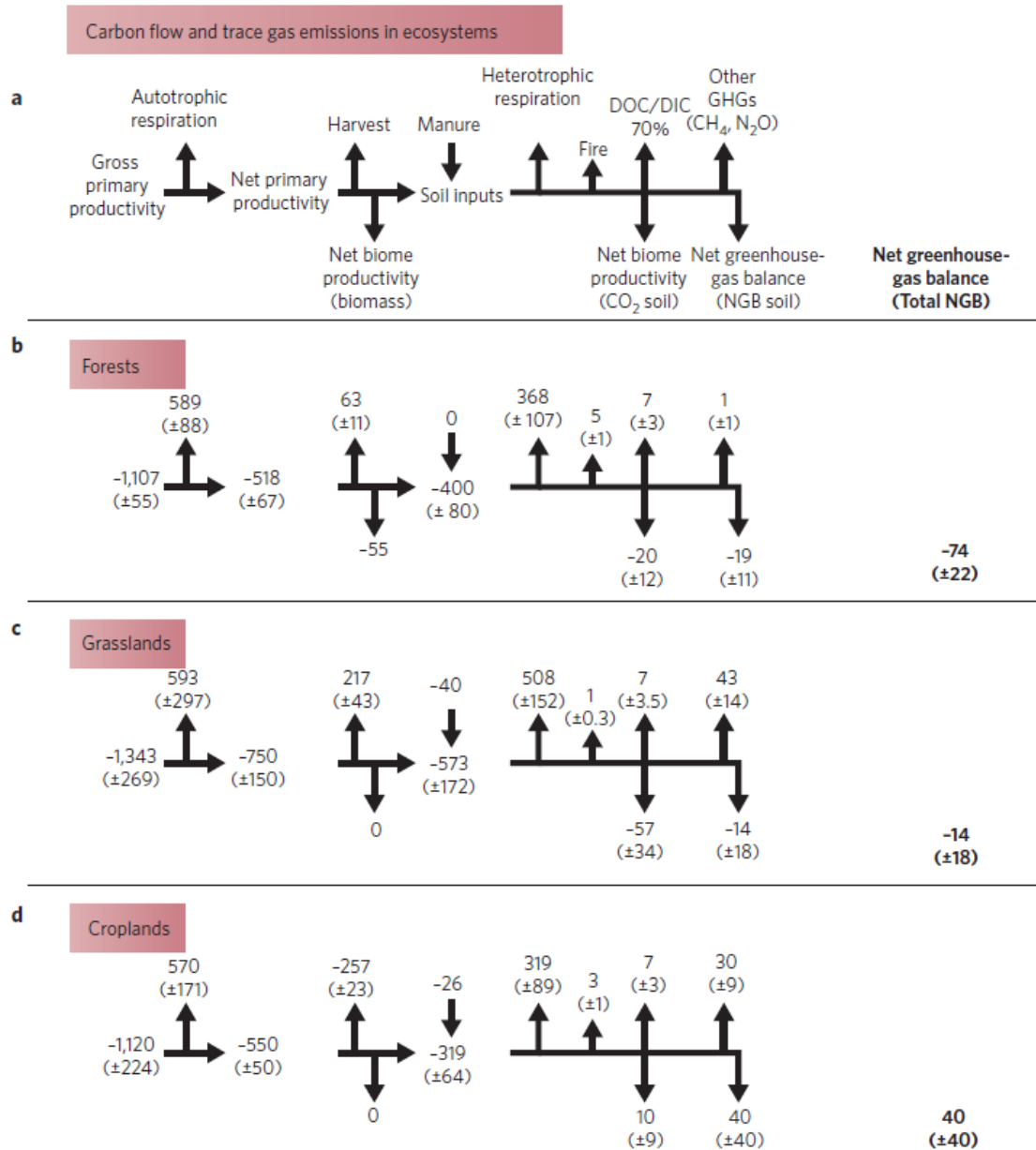


Figure 1. 6 : Flux de carbone dans différents modes d’occupation des terres présentés en valeurs absolues et accompagnés de l’incertitude entre parenthèse : (a) Légende des gains et pertes de carbone à partir de la photosynthèse (GPP : production primaire brute) jusqu’au bilan net de gaz à effet de serre, (b) gains et pertes dans les forêts, (c) les prairies et (d) les systèmes cultivés. Unité en g C m⁻² an⁻¹. Le bilan est présenté du point de vue de l’atmosphère c’est-à-

dire qu'une absorption de carbone par les plantes apparaît négative. Source : Schulze et al., 2009.

2.2. Paradoxe de la synchronisation sol-plantes dans les systèmes peu perturbés

2.2.1. Divergence des facteurs environnementaux régissant les activités des plantes et des micro-organismes

L'observation d'un stockage de C et l'absence de lixiviation de l'N dans les écosystèmes naturels et peu perturbés sont liées aux activités des plantes, des microorganismes et de leurs interactions qui régissent les flux de matière.

L'activité des plantes dépend de plusieurs facteurs (**Fig. 1.7**) dont la lumière qui est essentielle pour la photosynthèse et donc la construction de biomasse. De plus, la croissance des plantes est fortement affectée par la température et l'humidité de l'air et du sol (Schulze et al., 1987; Xu and Zhou, 2006; Wingler and Hennessey, 2016). Les différentes espèces de plantes diffèrent dans leur taux de croissance de par (1) leur structure qui peut permettre d'augmenter la surface des feuilles exposées à la lumière ; (2) leur aptitude à tolérer les fortes chaleurs et faibles humidités (Schulze et al., 1987; Hatfield and Prueger, 2015) ; et (3) leur aptitude à prélever les éléments minéraux du milieu (Li et al., 2014).

Les activités des microorganismes dépendent également des facteurs (1) environnementaux du milieu tels que la température (Paul and Clark, 1989; Lloyd and Taylor, 1994; Alvarez et al., 2018) et l'humidité du sol (Orchard and Cook, 1983; Paul and Clark, 1989) ; et (2) des facteurs physiques (e.g. texture) qui déterminent la taille des pores du sol, limitant la pénétration des microbes à l'intérieur de ces dernières (**Fig. 1.7**) (Paul and Clark, 1989). De plus, la structure des communautés est déterminée par la disponibilité en nutriments solubles dans le milieu qui favorise divers groupes de microorganismes spécialisés dans des activités différentes

(minéralisation ou immobilisation) (Fontaine et al., 2003; Fierer et al., 2007; Schmidt et al., 2007).

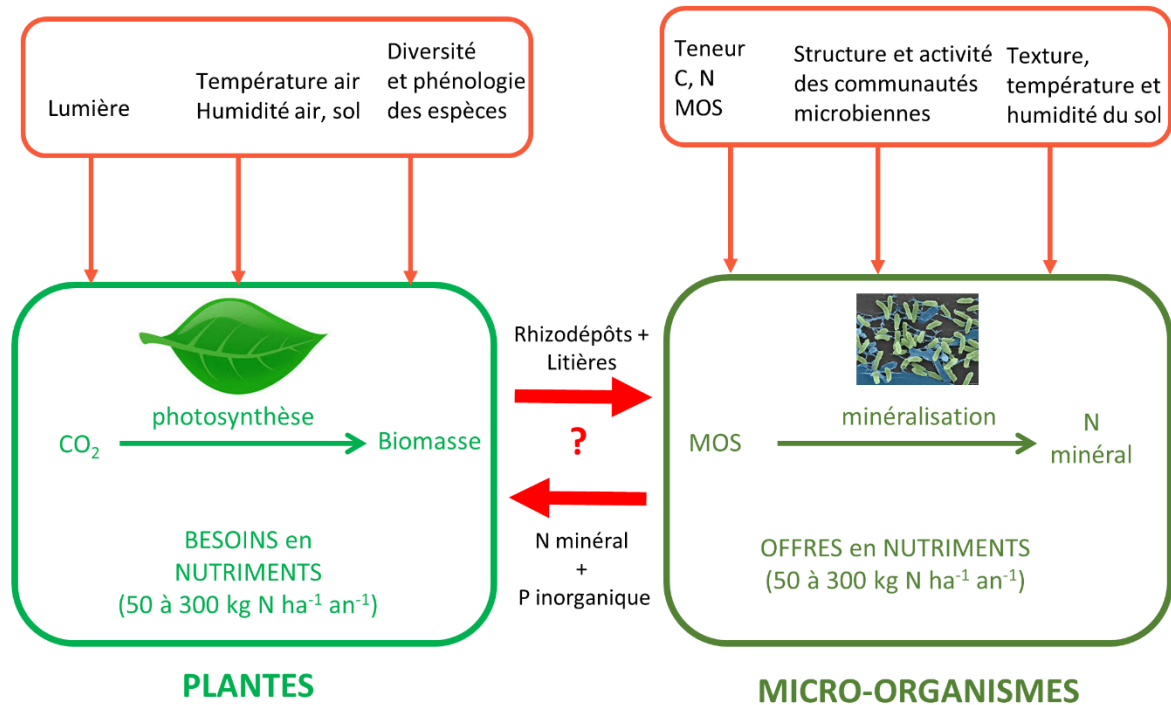


Figure 1. 7 : Facteurs environnementaux physico-chimiques et biologiques qui affectent l'activité des plantes et des microorganismes. C = carbone, N = azote, P = phosphore, MOS = matière organique du sol.

A priori, la concomitance des activités des plantes et des micro-organismes n'est pas évidente car ces deux types d'organismes répondent à des facteurs environnementaux, physico-chimiques et biologiques en partie différents (**Fig. 1.7**). Ainsi, il y aurait un décalage entre la période où les besoins des plantes en N sont maximums (*i.e.* printemps) et celle où les activités des microorganismes sont les plus importantes (*i.e.* automne) (Jaeger et al., 1999). Pourtant, s'il y a une absence de synchronie entre les activités de ces deux groupes d'organismes, les plantes ne pourraient pas obtenir l'N dont elles ont besoin pour vivre au travers de l'offre du sol. L'N minéral serait ainsi lixivié et les plantes dans les écosystèmes naturels ne pourraient pas survivre en l'absence de fertilisation.

2.2.2. Une synchronisation entre la demande de la plante et l'offre du sol

En prairie et en absence de fertilisation, la teneur en N des parties aériennes est aussi grande que celle d'une culture annuelle fertilisée (Glover et al., 2010) et le rendement en biomasse est maintenu stable au cours du temps (Jenkinson et al., 1994). En l'absence de fertilisation, les prairies ont deux moyens d'acquérir l'N dont elles ont besoin pour leur croissance : la fixation symbiotique du N₂ atmosphérique par les légumineuses et principalement l'N minéral provenant de la minéralisation par les microorganismes de la matière organique du sol. Les prairies sont essentiellement constituées de graminées, suggérant que la plupart de l'N intercepté provient de la minéralisation de la matière organique du sol par les microorganismes. Grâce à la présence d'une activité photosynthétique tout au long de l'année due à la présence de plantes pérennes, la concentration en N minéral dans le sol est faible puisque ce dernier est intercepté en continu par les plantes et les microorganismes (Vertès and Decau, 1992; Tuba et al., 2008). Ainsi, l'accumulation d'N minéral dans le sol est faible, limitant fortement les pertes par dénitrification (N₂O) et par lixiviation (Benoit, 2007; Gibson, 2009; Ledgard et al., 2011).

Le fonctionnement du système sol-plantes des prairies suggère fortement l'existence d'une synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol en nutriments au travers des activités des microorganismes. Cette synchronisation consiste en un lien étroit entre la quantité de nutriments disponibles pour la plante et la quantité dont la plante a besoin pour sa croissance (Myers et al., 1994). Les processus liés à la disponibilité en N dans le sol, correspondant à la minéralisation (libération de l'N disponible) et à l'immobilisation (organisation de l'N), déterminent en grande partie le degré de synchronisation puisqu'ils modulent la disponibilité en nutriments solubles (Myers et al., 1994; Crews et al., 2016). En effet, trop peu de minéralisation et la végétation est limitée en N; trop de minéralisation et l'N est lixivié ou perdu sous forme gazeuse dans l'écosystème.

Afin de déterminer plus précisément les régulations biologiques en jeu dans la synchronisation, une étude approfondie du système sol-plantes et des processus qui le composent doit être menée.

2.3. Les processus du sol liés aux interactions sol-plantes

2.3.1. Matière organique du sol

La matière organique du sol (MOS) englobe les résidus végétaux morts (feuilles, tiges, écorces, fruits et racines), les rhizodépôts (*cf.* 2.3.3. *La rhizosphère : interface entre microorganismes et plantes*), les déjections et cadavres d'animaux (faune du sol, microorganismes, animaux terrestres) ainsi que les produits synthétisés par les microorganismes (Kleber and Johnson, 2010; Lorenz and Lal, 2018d). Les résidus végétaux morts constituent la litière.

Il a longtemps été considéré que la MOS récalcitrante (humus) était constituée de résidus de litières récalcitrants à la dégradation microbienne (ex. lignine) et d'autres composés organiques partiellement décomposés (Manlay et al., 2007; Paul, 2016).

Aujourd'hui, cette vision a été remise en question puisque les scientifiques suggèrent que la totalité des litières et des rhizodépôts sont pris en charge par les microorganismes. Les matières organiques récalcitrantes seraient le résultat de protections physiques de la matière organique par (1) des liaisons chimiques fortes, (2) la formation d'agrégats, ou (3) à travers la structuration du réseau poral (Krull et al., 2003; Kravchenko and Guber, 2017). Plus précisément, lorsque les microorganismes meurent, les matières organiques sont restituées dans le sol et peuvent s'agréger entre elles ou s'adsorber sur les minéraux du sol (i.e. argiles, limons) (Krull et al., 2003). Cette adsorption entre minéraux du sol et matière organique est forte grâce à des liaisons avec des oxydes de fer, d'aluminium ou de silice et conduit à la formation de composés très persistants. Ces matières organiques associées aux minéraux (MOAM) peuvent être altérées

grâce aux activités enzymatiques des microorganismes, consistant en une libération d'enzymes extracellulaires pour découper la MOAM en composés de petites tailles facilement assimilables (**Fig. 1.8**) (Keiluweit et al., 2015). Ce processus est très coûteux en énergie et la MOAM est (1) pauvre en énergie ainsi que (2) dispersée dans le sol, indiquant que les enzymes extracellulaires ne l'atteignent pas forcément car elles ne diffusent pas sur de longue distance. Ainsi, dégradées ces MOAM peuvent avoir un coût en énergie supérieur au gain, ce qui peut expliquer leur persistance dans les sols pendant plusieurs centaines d'années (Fontaine et al., 2007). De plus, l'arrangement du réseau poral joue un rôle dans l'accessibilité de la matière organique pour les microorganismes puisque l'accès au substrat est entravé lorsque les pores sont trop petits (Kravchenko and Guber, 2017). Les microorganismes préféreraient donc se regrouper autour des végétaux, sources de litières et de rhizodépôts accumulés au même endroit et riches en énergie permettant d'avoir un gain en énergie supérieur au coût de la dégradation.

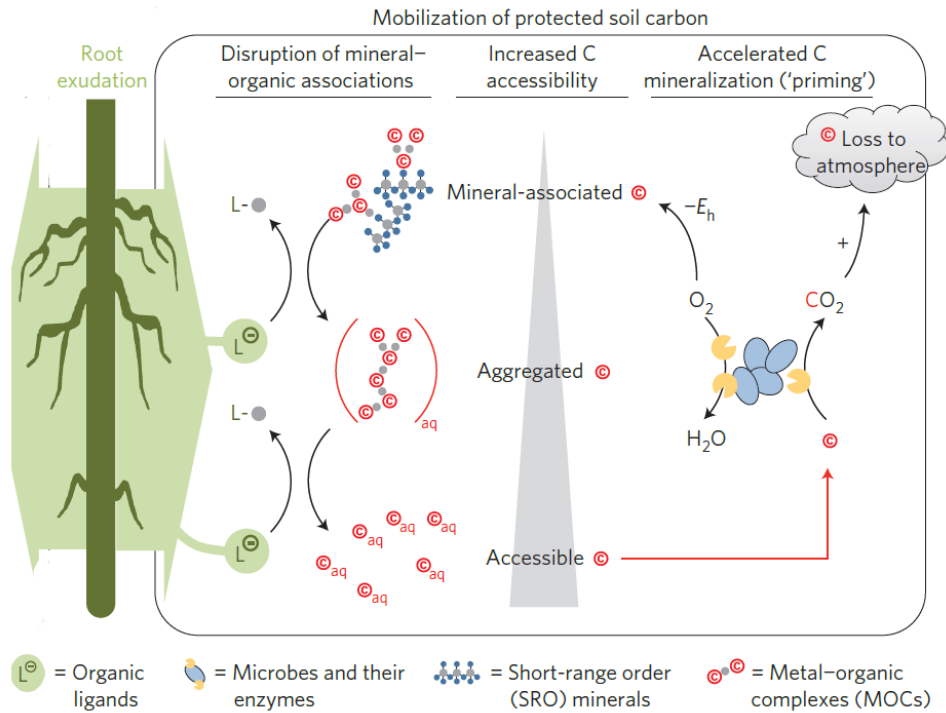


Figure 1. 8 : Schématisation de la minéralisation de la matière organique associée aux minéraux, dépendante de la libération d'enzymes extracellulaires dans le milieu par les microorganismes. Source : Keiluweit et al. 2015

La teneur en MOS peut être affectée par le climat, les propriétés du sol et le mode d'occupation des terres. La température et l'humidité du sol seraient les facteurs qui affectent le plus la décomposition de la MOS (Krull et al., 2003). Par exemple, une augmentation de la température entraînerait une diminution de la MOS par stimulation des activités microbiennes, stimulation d'autant plus grande que la température initiale est basse (**Fig. 1.9a**) (Kirschbaum, 2000), au moins à court-terme (Alvarez et al., 2018). La teneur en MOS dépend également de la texture du sol (teneur en argiles et en limons) (**Fig. 1.9b**) (Paustian et al., 1997). Finalement, le mode d'occupation des terres, dont les pratiques agricoles réalisées sur les sols, peut avoir des effets sur la teneur en MOS, de telle sorte que le labour conduirait à une diminution de la

MOS en surface dans les sols due à un changement de la structure de ce dernier (Dimassi et al., 2014).

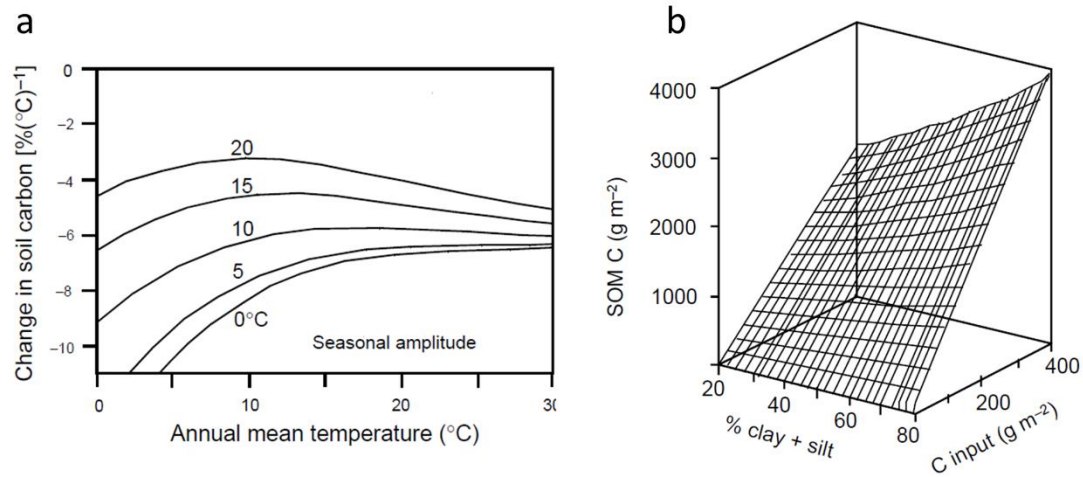


Figure 1. 9 : (a) Modélisation du changement de teneur en carbone organique du sol avec le réchauffement à partir de 5 températures initiales ; (b) Relation entre texture du sol et apports de carbone dans le sol sur la teneur en matière organique du sol modélisé avec CENTURY. Source : Krull et al., 2003.

2.3.2. Les organismes du sol

Les sols constituent un assemblage complexe d'habitats qui en font un immense réservoir de biodiversité, abritant des communautés d'organismes jouant un rôle majeur dans la régulation des cycles biogéochimiques du C et de l'N (Beare et al., 1995; Jones and Hinsinger, 2008). Les organismes du sol sont classés en différentes catégories selon leur grandeur, car cette dernière va déterminer le choix de leur nourriture, leur mode de vie dans les sols (aquatique ou terrestre) ainsi que leur répartition en fonction de la porosité du sol (Gobat et al., 2010). Cette classification est la suivante (**Fig. 1.10**) (Swift et al., 1979) : les microorganismes comprenant les bactéries et les champignons (inférieur à 10 μm) ; la microfaune comprenant les protozoaires et les nématodes (10 - 200 μm); la mésofaune comprenant principalement les collemboles et

les acariens (200 - 2 mm) ; la macrofaune comprend les invertébrés (2 – 80 mm) (vers de terre, larves d'insectes, limaces) ; et la mégafaune (>80 mm) comprenant les vertébrés vivant dans le sol (taupes, campagnols).

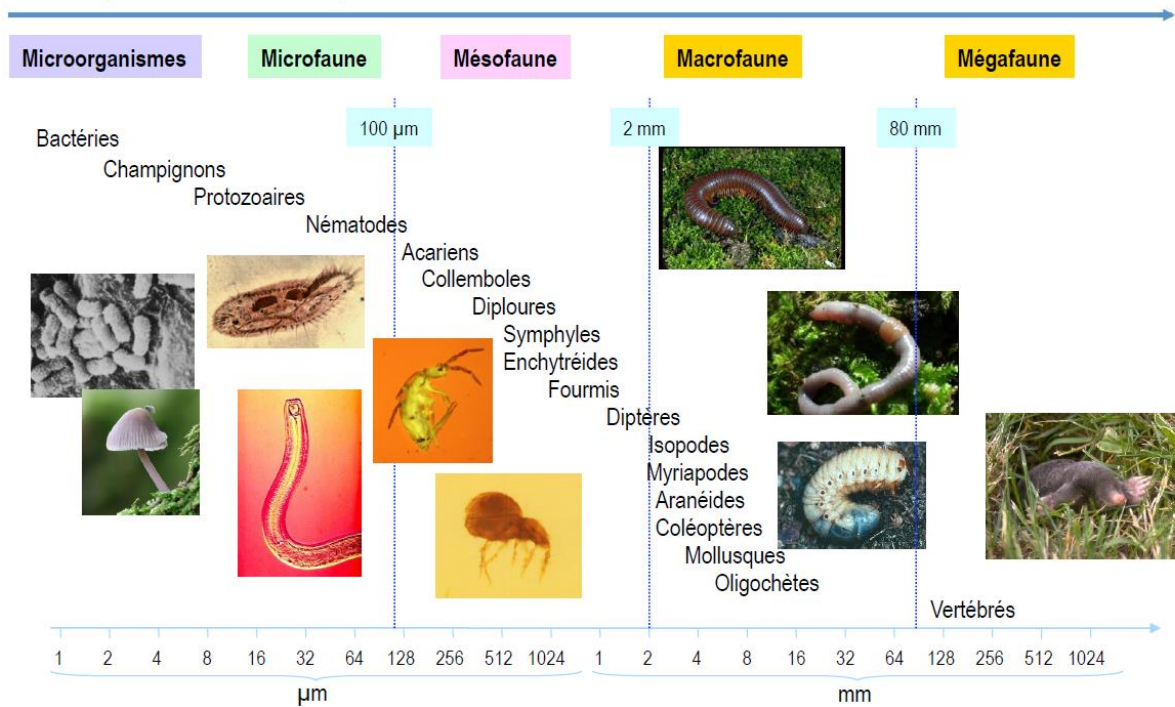


Figure 1. 10 : Classification de la faune du sol en fonction de la taille. Source : issue de la présentation de Simon Boudsocq « Interactions biologiques dans les sols », 2015.

Les deux premières classes de faune du sol (microorganismes et microfaune) jouent un rôle prépondérant dans la minéralisation de l’N rendu disponible pour la croissance des plantes au travers de la boucle microbienne (Clarholm, 1985). En effet, les protozoaires et nématodes bactérivores permettent le relargage de l’N d’origine bactérienne sous forme minérale dans le sol et pourraient augmenter de 60% la quantité d’N accumulée dans la biomasse végétale (Trap et al., 2016).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés au premier maillon de la boucle microbienne : les microorganismes qui permettent la minéralisation de l’N

difficilement accessible aux plantes. Les microorganismes sont les organismes dominants des sols de telle sorte que la diversité microbienne est estimée entre 5000 et un million d'espèces, un gramme de sol pouvant contenir entre 10^7 et 10^{12} bactéries et entre 5 et 25km d'hyphes mycéliens (Young and Crawford, 2004; Gans et al., 2005; Hinsinger et al., 2009). Néanmoins, la majorité de ces organismes serait en dormance, amenant à considérer le sol comme un désert comprenant des zones à forte activité.

2.3.3. La rhizosphère : interface entre microorganismes et plantes

Le sol est caractérisé par des micro-hétérogénéités d'activités enzymatiques liées à différentes sphères d'influence que sont la détritosphère, le drilosphère, l'agrégatusphère, la termitosphère et la rhizosphère abritant les ingénieurs du sol (Beare et al., 1995; Lavelle and Spain, 2001). Ces micro-hétérogénéités du sol sont des « hot spots » d'activité microbienne car les sphères d'influences changent les conditions du milieu telles que la disponibilité des nutriments ou encore la structure du sol (Lavelle et al., 1995).

Plus spécifiquement, la rhizosphère correspond à la zone de sol au contact des racines qui est influencée par ces dernières. Elle se distingue par des modifications induites par les racines, de la structure du sol, de la disponibilité en eau, en C et en nutriments, résultant en un profond changement des communautés microbiennes (Hinsinger et al., 2009). Il a été montré que la biomasse microbienne au sein de la rhizosphère est plus élevée que dans le sol nu et que cette augmentation peut être d'un facteur 1.2 à 2.7 (Lavelle and Spain, 2001; Neergaard and Magid, 2001; Tang et al., 2014). L'activité microbienne intense dans la rhizosphère est largement due au relargage de composés C organiques facilement assimilables (acides aminés, sucres, acides organiques) par les racines dans le sol appelés rhizodépôts (Jones et al., 2004) (**Fig. 1.11**). Les rhizodépôts correspondent à la perte des cellules de la paroi et de la coiffe racinaires, à la mort et à la lyse des cellules racinaires, à l'exsudation racinaire (relargage continu et passif de solutés provenant de cellules vivantes), au flux de C alimentant les mycorhizes et au mucilage

(**Fig. 1.11**) (Jones et al., 2009). Bien qu'il soit difficile de quantifier la part relative de chacun, il semblerait que les exsudats racinaires représentent entre 3 et 10% du C fixé par photosynthèse (Jones et al., 2004). Sachant que la proportion de C fixé perdue sous forme de rhizodépôts est estimée en moyenne à 17% (Nguyen, 2003), l'exsudation représenterait 18 à 59% des rhizodépôts.

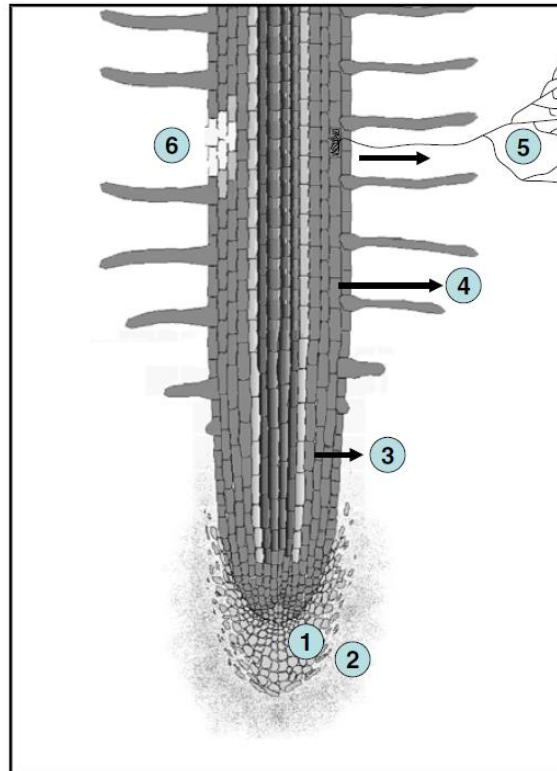


Figure 1. 11 : Schéma d'une section longitudinale de racine illustrant les différents types de rhizodépôts relargués par les racines : 1 = perte des cellules de la paroi et de la coiffe racinaire, 2 = sécrétion du mucilage (polymère insoluble), 3 = exsudats racinaires, 4 = perte gazeuse de carbone organique, 5 = flux de carbone alimentant les mycorhizes, 6 = mort et lyse des cellules racinaires. Source : Jones et al., 2009

2.4. Le « rhizosphere priming effect »

2.4.1. Définitions

Le terme « priming effect » (PE) a été défini pour la première fois par Bingeman et al. (1953) comme une accélération de la décomposition de la MOS suite à un ajout de matière organique fraîche (MOF). Plus précisément, cela correspond à un surplus de relargage de C et d’N sous forme de CO_2 , NH_4^+ et NO_3^- provenant de la MOS d’un sol qui a été amendé avec des composés facilement assimilables comparé à un sol non amendé. Dans un premier temps, pour étudier cet effet, la rhizosphère n’a pas été prise en compte car les expérimentations se déroulaient principalement au laboratoire en incubations de sol. Cependant, les études sur le PE suggéraient fortement que les plantes jouaient un rôle dans le phénomène de PE puisque la MOF ajoutée lors des incubations de sol, pour stimuler la dégradation microbienne, étaient principalement des composés végétaux (Löhnis, 1926; Bingeman et al., 1953; Fontaine et al., 2011; Dimassi et al., 2014; Vestergård et al., 2016).

Ce n’est que plus tard que le terme de « rhizosphere priming effect » (RPE) a été défini comme un changement du taux de décomposition de la MOS dû à la présence de racines vivantes approvisionnant les microorganismes en composés riches en énergie (*i.e.* rhizodepôts) (Liljeroth et al., 1994; Bottner et al., 1999; Kuzyakov, 2002) (**Fig. 1.12**). Plus précisément, l’exsudation racinaire a été identifiée comme le principal mécanisme induisant le RPE et participerait entre 58 et 96% du RPE total (Shahzad et al., 2015). La présence de MOF est un prérequis essentiel pour le maintien à long-terme de la minéralisation de la MOS. En effet, il a été démontré que la MOS peut persister pendant des milliers d’années en l’absence de perturbation physique du sol (*i.e.* apports de MOF) puisque les microorganismes ne peuvent pas enclencher la minéralisation (gain < dépense) (Fontaine et al., 2007; Shahzad et al., 2018).

De plus, tous les microorganismes ne seraient pas capables de dégrader les MOS et une compétition entre deux groupes fonctionnels de microorganismes serait en jeu pour la MOF

(Fontaine et al., 2003; Fierer et al., 2007; Schmidt et al., 2007; Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). Le premier groupe est caractérisé par des microorganismes à croissance rapide (stratégie r) utilisant la matière organique facilement assimilable quand elle est présente en abondance comme source d'énergie. Ces microorganismes sont uniquement spécialisés dans la dégradation des MOF et deviennent dormants lorsque les substrats facilement assimilables s'épuisent. Le second groupe est caractérisé par des microorganismes à croissance lente capables de survivre dans un milieu pauvre en nutriments (stratégie K). Ces derniers ont la capacité de dégrader des substrats plus complexes tels que les MOS grâce à l'énergie acquise à partir de la dégradation de la MOF (RPE) (Pianka, 1970; Fontaine et al., 2003; Fontaine and Barot, 2005; Chen et al., 2014). Des études ont montré que les champignons dominent lorsque le RPE est intense (Shahzad et al., 2015, 2018). La dominance des champignons dans le RPE peut provenir de leur structure en hyphes qui leur permet de coloniser les hot spots d'activités (i.e. rhizosphère) mais aussi d'explorer une grande surface de sol pour acquérir la ressource (Jennings and Lysek, 1996). À l'inverse, les bactéries en forme de coque ou de bacille n'ont pas les mêmes capacités d'exploration du sol. Elles peuvent être localisées dans les hot spots d'activités ou en dehors, où elles sont généralement en dormance (Hinsinger et al., 2009).

2.4.2. Facteurs liés à la synchronisation affectant le « rhizosphere priming effect »

Le changement du taux de décomposition des MOS en présence de plantes vivantes peut être positif ou négatif bien qu'il soit la plupart du temps positif, impliquant une accélération de la décomposition de la MOS induite par la présence de plantes (**Fig. 1.12**). Les estimations du RPE varient entre une diminution de 50% et une augmentation de 380% de la respiration du sol comparée au témoin sans plante (Cheng et al., 2003, 2014). La compréhension de cette variabilité importante de la magnitude du RPE fait l'objet de recherches actuelles sur différents facteurs (Kuzyakov, 2002; Cheng et al., 2014; Huo et al., 2017) dont certains pourraient être déterminants de la synchronisation sol-plantes.

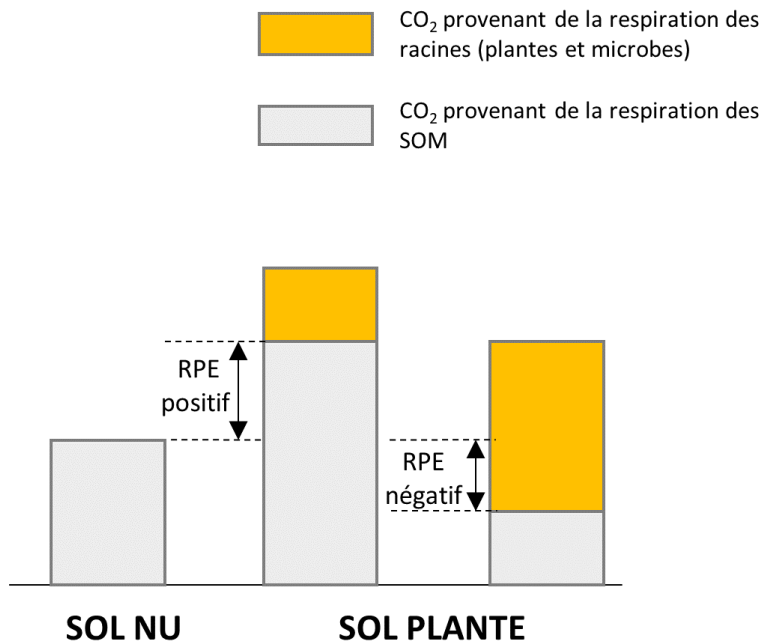


Figure 1. 12 : Schématisation du « rhizosphere priming effect » (RPE) : accélération (RPE positif) ou diminution (RPE négatif) de la décomposition de la matière organique du sol (MOS) due à la présence de racines vivantes. Source : inspiré de Kuzyakov, 2002

1) Le rôle de la photosynthèse

Certaines études, au travers de la manipulation de la photosynthèse (coupe et obscurité) et par des corrélations entre biomasse des végétaux et RPE, ont suggéré que la photosynthèse joue un rôle prépondérant dans la magnitude du RPE (**Fig. 1.13**) (Kuzyakov and Cheng, 2001a, 2004; Dijkstra et al., 2006; Shahzad et al., 2015; Huo et al., 2017). En effet, il a été estimé que 7% à 17% du C assimilé par photosynthèse est perdu dans le sol sous forme de rhizodépôts (Nguyen, 2003; Pausch and Kuzyakov, 2018). Ces rhizodépôts, composés facilement assimilables (MOF), agissent comme une amorce pour minéraliser la MOS en alimentant les

microorganismes. Ainsi une baisse ou une augmentation de la photosynthèse module la quantité de MOF disponible pour les microorganismes ; ce qui pourrait moduler le RPE.

Étant donné que la photosynthèse est un indicateur de la demande de la plante en nutriments, la supposée corrélation positive entre photosynthèse et RPE témoignerait d'une synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol au travers de la destruction des MOS.

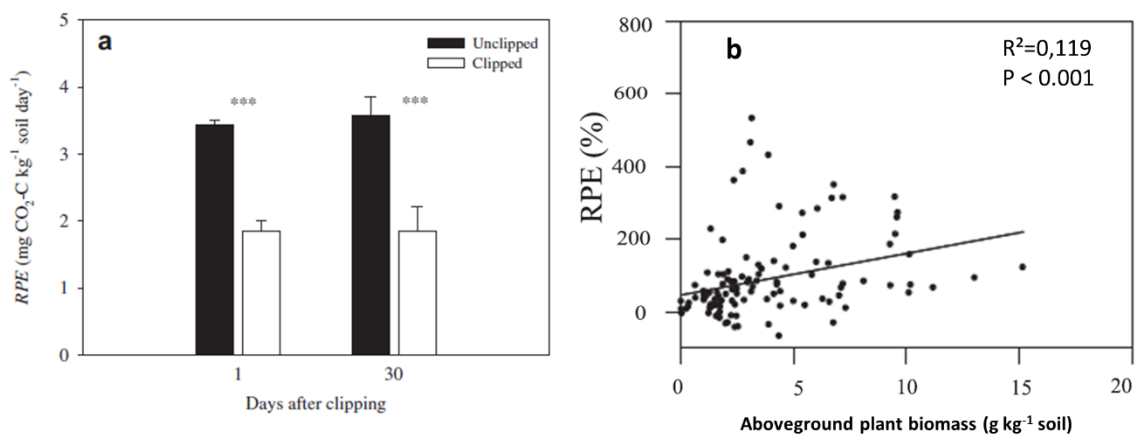


Figure 1. 13 Effet de la photosynthèse sur l'induction du « rhizosphere priming effect. » (RPE) : (a) estimation du RPE induit dans des pots contenant de la végétation coupée ou non, à 1 et 30 jours après la date de coupe. Source : Shahzad et al., 2012 ; et (b) relation entre RPE et biomasse aérienne d'une méta-analyse. Source : Huo et al., 2017.

Comprendre l'influence de l'activité photosynthétique sur le RPE est primordial dans le contexte actuel d'augmentation de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère. Une concentration élevée en CO₂ atmosphérique conduit à une stimulation de la fixation de C par photosynthèse mais ne s'accompagne pas forcément d'une augmentation du stock de C dans le sol (van Groenigen et al., 2017) et pourrait même aboutir à un déstockage de C selon un modèle (Perveen et al., 2014). Certaines études montrent que l'augmentation du CO₂ atmosphérique

induit une limitation de l’N dans le sol (Reich et al., 2006; Reich and Hobbie, 2013; Perveen et al., 2014) puisque la demande de la plante en N augmenterait pour maintenir son ratio C : N. Cet épuisement en N du sol pourrait aboutir à une accélération de la décomposition des MOS (RPE) (Carney et al., 2007; Heimann and Reichstein, 2008; Vestergård et al., 2016). **Cependant, la stimulation du RPE en CO₂ élevé liée à une augmentation de la demande en N de la plante n’a jamais été montrée par l’expérience sur des sols plantés. Cela nécessite plus d’attention puisqu’une accélération de la décomposition des MOS pourrait conduire à une rétroaction positive sur la concentration en CO₂ atmosphérique et par conséquent sur l’effet de serre.**

2) Le rôle de la disponibilité en azote minéral

La concentration en N minéral disponible dans le sol pour les microorganismes contrôle le RPE de telle manière qu’une faible disponibilité en N minéral dans la solution du sol stimulerait la décomposition de la MOS (**Fig. 1.14, encadré orange**) et pourrait conduire à un bilan négatif de C de l’écosystème (i.e. RPE) (Fontaine et al., 2004; Fontaine and Barot, 2005). Ainsi, un apport de fertilisant azoté dans le sol conduirait à une diminution du RPE voire à un RPE négatif (**Fig. 1.14, encadré vert**) (Liljeroth et al., 1994; Fontaine and Barot, 2005; Blagodatskaya et al., 2007; Fontaine et al., 2011; Chen et al., 2014; Kumar et al., 2016). En présence d’une grande quantité d’N minéral dans le sol, les microorganismes ralentissent ou stoppent leurs activités de dégradation de la MOS afin d’économiser leurs enzymes et leur énergie. De plus, dans ces conditions, un changement de communautés de microorganismes est observé, favorisant les microorganismes à croissance rapide (stratégies r) incapables de minéraliser la MOS (Schmidt et al., 2007; Chen et al., 2014; Bell et al., 2015).

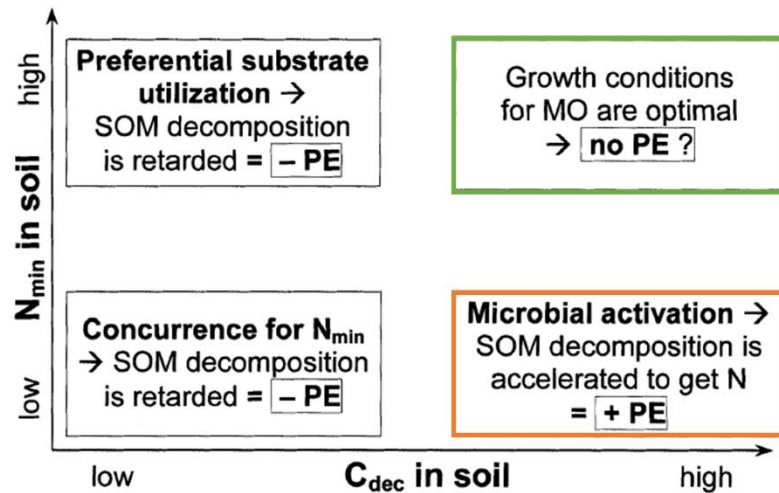


Figure 1. 14 : Hypothèses de la magnitude du « rhizosphere priming effect » (RPE) en fonction de la disponibilité en C facilement assimilable (C_{dec}) et en azote minéral dans la solution du sol (N_{min}). MO= microorganismes, SOM= matière organique du sol. Source : Kuzyakov et al., 2002

3) Le rôle des espèces végétales

Les espèces végétales peuvent induire des RPE différents, même si elles sont cultivées dans les mêmes conditions physico-chimiques (Dijkstra et al., 2010; Pausch et al., 2013; Wang et al., 2016). Par exemple, Shahzad et al. (2015) et Cheng et al. (2003) ont montré qu'en prairie ou en culture annuelle, le RPE est plus élevé pour des légumineuses (*i.e.* trèfle blanc et soja) que pour des graminées (*i.e.* raygrass anglais et blé). De plus, la méta-analyse réalisée par Huo et al. (2017) montre que les arbres induisent un RPE plus important que les espèces prairiales, qui elles-mêmes induisent un RPE plus élevé que les espèces en sol cultivé. L'aptitude des espèces à produire des rhizodépôts peut varier tant en qualité qu'en quantité et induire une large variation de RPE (Wang et al., 2016; Liu et al., 2017). **En effet, chez les légumineuses, la quantité de rhizodépôts serait supérieure aux non légumineuses (Jones et al., 2009) suggérant une photosynthèse plus importante ; ce qui expliquerait les hautes valeurs de RPE en lien avec une demande en nutriments de la plante plus importante.**

2.4.3. Mesurer le « rhizosphere priming effect »

L'estimation du RPE est basée sur la comparaison des émissions de CO₂ provenant spécifiquement de la MOS des sols plantés et non plantés. Cela implique, en présence de plantes, de dissocier les efflux de CO₂ provenant de la MOS (respiration microbienne de la décomposition des MOS) de ceux libérés par les plantes (respiration des racines et des microorganismes dégradants les rhizodépôts) (Keith et al., 1986; Balesdent et al., 1987; Kuzyakov, 2002; Cheng and Dijkstra, 2007). Pour séparer le CO₂-C dérivé de la respiration du sol (MOS) de celui provenant de la respiration des plantes, le marquage isotopique est utilisé. En utilisant les équations du bilan de masse, à partir de la respiration totale du système sol-plantes (R_t , g C 24h⁻¹ m⁻²), le CO₂-C dérivé de la respiration du sol (R_s , g C 24h⁻¹ m⁻²) peut être séparé du CO₂-C provenant de la respiration des plantes (R_p , g C 24h⁻¹ m⁻²).

$$R_s + R_p = R_t \quad (1)$$

$$R_s \times A_s^{13} + R_p \times A_p^{13} = R_t \times A_t^{13} \quad (2)$$

où A_s^{13} est l'abondance en ¹³C du carbone du sol, A_p^{13} est l'abondance en ¹³C du carbone de la plante, A_t^{13} est l'abondance en ¹³C de la totalité du CO₂ rejeté par le système sol-plantes. Ces deux équations peuvent être résolues pour calculer R_s :

$$R_s = R_t \times (A_t^{13} - A_p^{13}) / (A_s^{13} - A_p^{13}) \quad (3)$$

Le « rhizosphere priming effect » (RPE) est calculé en faisant la différence de la respiration du sol planté (R_s) avec celle du sol non planté ($R_{\text{contrôle}}$)

$$\text{RPE} = R_s - R_{\text{contrôle}} \quad (4)$$

La technique la plus simple pour séparer les efflux de CO₂ provenant des plantes et du sol consiste à utiliser l'abondance naturelle du ¹³C des plantes et du sol. Les plantes en C₃ et C₄ n'ont pas la même discrimination des atomes de ¹²C et de ¹³C pendant l'assimilation du CO₂

lors de la photosynthèse ; ce qui induit une différence de composition isotopique entre les matériaux végétaux d'environ 15 ‰ ($\delta^{13}\text{C}$: $\text{C}_3 = -27\text{‰}$ et $\text{C}_4 = -12\text{‰}$) (Balesdent, 1991). Il est ainsi possible d'utiliser cette différence pour séparer le CO_2 provenant des plantes de celui provenant de la MOS en cultivant des plantes en C_3 sur un sol C_4 ou *vice versa* (**Fig. 1.15**) (Balesdent et al., 1987). Cependant, la différence de composition isotopique entre la plante et le sol est faible, conduisant à de nombreuses incertitudes dans l'estimation du RPE en cas de variabilité du $\delta^{13}\text{C}$ des sources qui peuvent être liées aux conditions environnementales (température et humidité) et au fractionnement isotopique (Balesdent et al., 1987; Farquhar et al., 1989; Cheng, 1996; Kuzyakov, 2010). De plus, cette méthode restreint le choix des espèces utilisées.

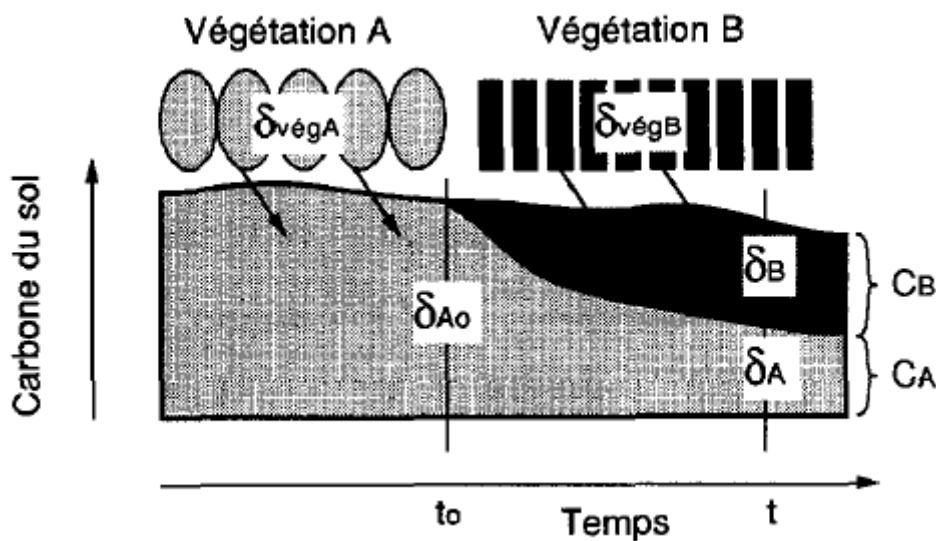


Figure 1. 15 : Schématisation du remplacement du carbone d'un sol sous végétation initiale A (exemple : C_3) par le carbone provenant d'une nouvelle végétation B (exemple : C_4) introduite au temps t_0 . $\delta_{\text{végA}}$ = composition isotopique de la végétation A, $\delta_{\text{végB}}$ = composition isotopique de la végétation B. δ_{A0} = composition isotopique du sol initial à t_0 . CB est la quantité de carbone de la végétation A incorporée dans le sol initial, CA est la quantité de carbone restant du sol initial. Source : Balesdent, 1991.

La méthode de « pulse labeling » consiste en une exposition des plantes à une atmosphère marquée au ^{13}C ou au ^{14}C durant un court laps de temps permettant de dissocier le CO_2 dérivé des plantes (marqué) de celui dérivé du sol (non marqué) (Keith et al., 1986; Jensen, 1993). La principale limite de cette technique facilement applicable, est qu'elle ne permet pas d'obtenir un marquage stable au cours du temps puisque le marquage diminue après un pulse, entraînant des difficultés pour estimer la composition isotopique du matériel plante. Ainsi, être capable de différencier le $\text{CO}_2\text{-C}$ provenant de la respiration du sol de celui provenant de la respiration des plantes présente des difficultés (Hanson et al., 2000; Kuzyakov, 2001, 2006).

Finalement, la méthode du marquage continu permet d'éviter les désavantages des deux méthodes précédentes. Il consiste à exposer en continu les plantes à de l'air marqué au ^{13}C dans une serre afin d'assurer une stabilité du CO_2 marqué et une homogénéité de marquage au cours du temps dans le matériel plante (Schneider et al., 2004; Cheng and Dijkstra, 2007; Shahzad et al., 2012). La plupart des études, pour des raisons financières, utilisent du $^{13}\text{CO}_2$ provenant de la combustion d'énergie fossile comme source de marquage ($\delta^{13}\text{C}_{\text{fossil}} \approx -38\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{air}} \approx -8\text{‰}$) (Cheng and Dijkstra, 2007; Shahzad et al., 2012; Pausch et al., 2013). Le marquage continu peut être obtenu selon deux méthodes distinctes : la première consiste à injecter du $^{13}\text{CO}_2$ dans un flux d'air ambiant (Cheng and Dijkstra, 2007; Pausch et al., 2013) tandis que la seconde consiste à injecter du $^{13}\text{CO}_2$ dans un flux d'air dépourvu de CO_2 (Shahzad et al., 2012). Bien que les expérimentations utilisant la première méthode suggèrent que le marquage de l'air est plutôt stable au cours du temps, des risques persistent car le $\delta^{13}\text{C}$ de l'air ambiant fluctue à proximité d'activités humaines (Peterson and Fry, 1987). Par ailleurs, la seconde méthode basée sur l'injection de CO_2 marqué dans un flux d'air décarbonaté (Shahzad et al., 2012) permet une exposition des plantes à un air environ deux fois plus marqué que la première méthode dans l'enceinte accueillant les plantes ($\delta^{13}\text{C}_{\text{serre_methode1}} \approx -18\text{‰}$ to 24‰ ; $\delta^{13}\text{C}_{\text{serre_methode2}} = -38.55\text{‰}$). Ainsi, la différence de composition isotopique ($\delta^{13}\text{C}$) entre le sol

et la plante est plus grande, permettant d'obtenir une incertitude sur les valeurs de RPE plus faible qu'avec les autres méthodes.

Outre la méthode de marquage, la respiration du CO₂ libéré par les MOS doit être mesurée. La présence de plante augmente la complexité de cette mesure car le CO₂ libéré par le système ne doit pas être réabsorbé par photosynthèse. Deux méthodes ont été développées (**Fig. 1.16**). La première proposée par Cheng (1996) consiste à séparer la partie aérienne et souterraine des végétaux lors de la mesure et se limite ainsi à des espèces avec une large tige (exemple : arbre, maïs, tournesol...) et sur peu d'individus (**Fig. 1.16a**). La seconde méthode développée par Shahzad et al. (2012) lève ce verrou méthodologique en proposant une incubation complète du système sol-plantes à l'obscurité (**Fig. 1.16b**). Cette incubation permet au CO₂ libéré par le système sol-plantes de s'accumuler dans l'enceinte pour une durée déterminée. Le CO₂ libéré lors de ces deux méthodes d'incubation est soit piégé dans une solution de soude, soit directement mesuré par un chromatographe à phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. Après analyse, les équations de bilan de masse présentées précédemment peuvent être appliquées pour séparer le CO₂ libéré par les MOS de celui libéré par les plantes.

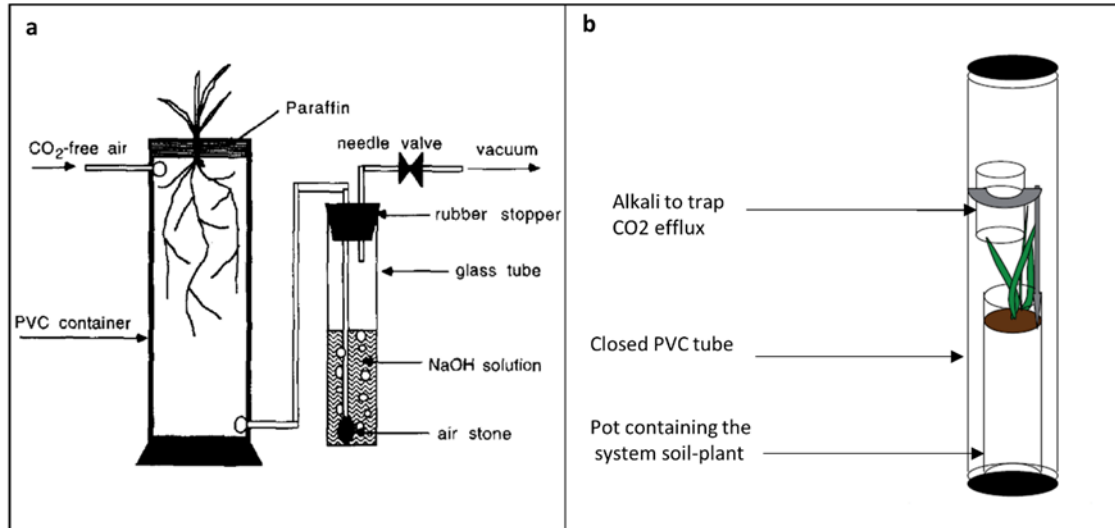


Figure 1. 16 : Méthode de mesures de la respiration des efflux de CO_2 : (a) Méthode développée par Cheng (1996) excluant les parties aériennes des plantes ; (b) Méthode développée par Shahzad et al., (2012) consistant en une incubation de l'ensemble du système sol-plantes.

Ces méthodes d'estimation du RPE sont très couteuses et liées à de fortes contraintes méthodologiques. En effet, mesurer le RPE nécessite d'étudier les systèmes sol-plantes dans un environnement clos afin de permettre un marquage stable et continu du matériel plante. Ces contraintes réduisent pour la plupart les études du RPE à des expérimentations à court-terme sur des plantes annuelles, dans de petits pots (environ 10 à 15 cm de diamètre et 40 cm de profondeur maximale) contenant peu d'individus qui sont la plupart du temps de la même espèce et dans des conditions artificielles de lumière et de température (Cheng et al., 2003; Dijkstra et al., 2006; Shahzad et al., 2012, 2015; Zhu and Cheng, 2012; Pausch et al., 2013; Carrillo et al., 2014; Kumar et al., 2016). **Cela limite grandement la prise en compte de l'ensemble des variations saisonnières et des interactions intra- et inter-spécifiques qui pourraient avoir un effet sur le RPE et ne traduit pas la réalité d'un écosystème naturel.**

Des dispositifs expérimentaux ayant la capacité de produire de gros volumes d'air marqué pour alimenter de grands pots et dans des conditions proches de l'environnement naturel doivent être développés.

De par sa complexité de mesure, le RPE n'est que très peu pris en compte dans les bilans de C à l'échelle des écosystèmes (Perveen et al., 2014; Guenet et al., 2018). Pourtant la stimulation du RPE pourrait découler en un bilan de C négatif de l'écosystème (Fontaine et al., 2004). **Pour intégrer les mesures de RPE dans les bilans de C des écosystèmes, il est nécessaire de développer des méthodes permettant de coupler les mesures de RPE avec les flux de CO₂ des écosystèmes (échange net de l'écosystème, respiration de l'écosystème, production primaire brute). En effet, les mesures des échanges de CO₂ sont essentiellement effectuées par la méthode d'« Eddy covariance », basée sur la turbulence du vent, et sont limitées à la mesure au champ sur de grandes parcelles rendant le marquage impossible.**

Dans cette partie, l'étroite relation entre RPE (offre du sol en nutriments pour la plante) et photosynthèse (demande de la plante) suggérée par des études précédentes (Kuz'yakov and Cheng, 2001a, 2004; Dijkstra et al., 2006; Shahzad et al., 2015; Huo et al., 2017) a été développée mais reste à caractériser par des mesures directes. **Coupler les mesures de RPE avec les flux de CO₂ et en particulier la production primaire brute (photosynthèse) pourrait aider à donner des indications sur l'existence de la synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol.**

2.5. Le mécanisme de banque

La constatation d'une variation du RPE en fonction de la disponibilité en N minéral dans la solution du sol conduisant à la succession d'activités de deux communautés microbiennes différentes (présentées plus haut) a fait émerger l'idée du mécanisme de banque.

2.5.1. Principe

Des travaux de modélisation ont suggéré l'existence d'un mécanisme de banque permettant un ajustement entre la séquestration d’N et de C dans la MOS ou de leur libération dans la solution du sol en fonction de la disponibilité de l’N minéral dans le sol (Fontaine and Barot, 2005; Perveen et al., 2014). Ce mécanisme consiste en une suite d’interactions en chaîne entre disponibilité en N minéral dans la solution du sol, abondance relative de deux populations de microorganismes et évolution de la composition du compartiment de la MOS.

Ces deux populations microbiennes sont identifiées comme les MOS-constructeurs (stratégie-r) et les MOS-décomposeurs (stratégie-K) (Fontaine et al., 2003). Les MOS-constructeurs, microorganismes à croissance rapide, peuvent persister seulement lorsque les nutriments sont abondants. Ils immobilisent l’N minéral disponible dans la solution du sol et le turnover de leur biomasse conduit à la formation de déchets (C et N) qui seront libérés dans le sol et dont une partie sera stockée dans la MOS. L’autre partie des déchets des MOS-constructeurs pourra être utilisée par les MOS-décomposeurs lorsque la disponibilité en nutriments sera faible et qu’il ne restera plus que des composés polymérisés dans la solution du sol. L’énergie acquise par la minéralisation de ces composés pourra permettre aux MOS-décomposeurs de dégrader la MOS (RPE) et de libérer de l’N minéral dans la solution du sol.

Le mécanisme de banque fait entrer en jeu différents processus rhizosphériques tels que la minéralisation et l’immobilisation de l’N, le RPE et l’humification, dont les parts relatives sont fonction de la disponibilité en N minéral dans la solution du sol (**Fig. 1.17**) (Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). La disponibilité ou non de l’N minéral dans la rhizosphère peut être modulée par le prélèvement de l’N minéral par la plante. Ainsi le delta des flux de minéralisation et d’immobilisation de l’N varierait en fonction de la demande de la plante et de son prélèvement en N dans le sol et serait un indicateur l’offre du sol.

Dans le premier cas, lorsque la concentration en N minéral dans le sol est faible, due à un prélèvement d’N par la plante, les espèces microbiennes capables de dégrader la MOS (MOS-décomposeurs) sont favorisées par rapport à celles spécialisées uniquement dans la dégradation des MOF (MOS-constructeurs). Les MOS-décomposeurs, grâce à la présence de C frais riche en énergie déposée par la plante (litière et rhizodépôts), obtiennent l’énergie nécessaire pour décomposer la MOS. De fait, lorsque la disponibilité en N est faible, le RPE et la minéralisation sont intenses, induisant une destruction nette de MOS libérant des nutriments des MOS dans la solution du sol pour la nutrition de la plante (**Fig. 1.17a**).

Dans le cas contraire, lorsque la disponibilité en N minéral est grande, les MOS-constructeurs sont favorisés au détriment des MOS-décomposeurs, conduisant à une immobilisation des nutriments de la solution du sol vers les MOS. Dans ce cas, l’exploitation de la MOS au travers du RPE est faible et conduit à la séquestration de l’N et du C dans la MOS au travers d’une forte immobilisation et humification (**Fig. 1.17b**).

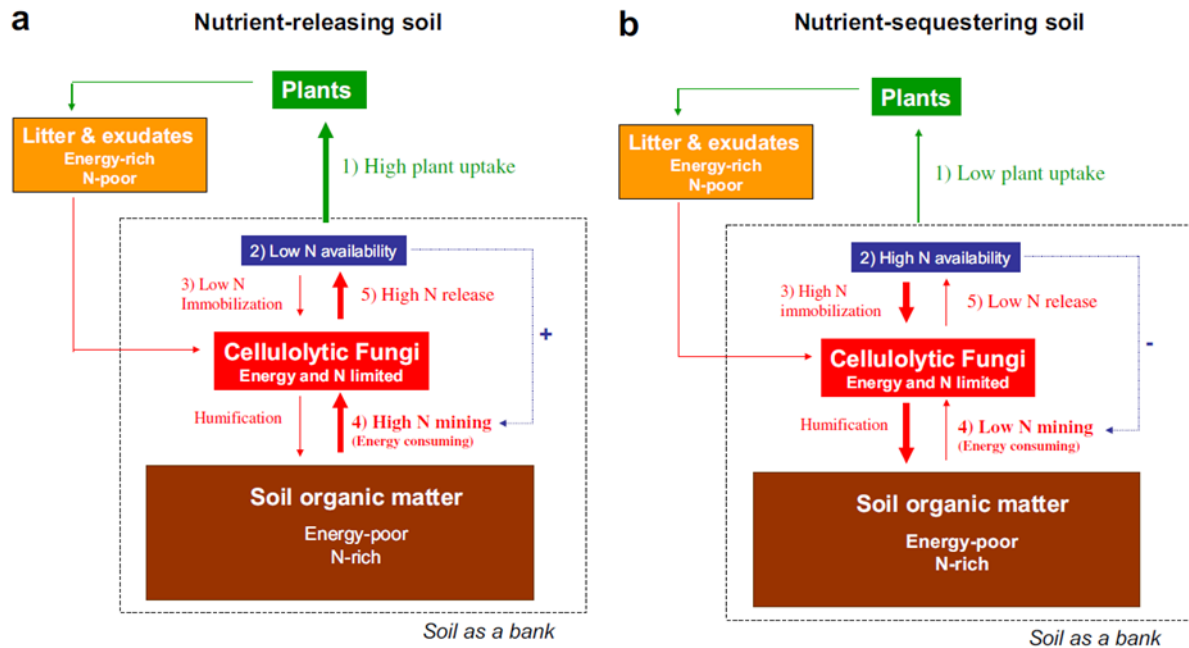


Figure 1. 17 : Schématisation du mécanisme de banque qui ajuste la séquestration de l'azote (N) et du carbone (C) dans la matière organique du sol (MOS) ainsi que leur libération dans la solution du sol. Source : Fontaine et al., 2011.

2.5.2. Le mécanisme de banque : suggéré mais jamais testé en présence de plantes

Des études menant des incubations de sol en laboratoire ont montré un priming plus élevé dans un sol où l'N minéral de la solution du sol était peu disponible en comparaison avec un traitement où sa disponibilité était forte (Fontaine et al., 2004, 2011). Plus tard, une étude travaillant sur des plantes a manipulé la demande de la plante en nutriment au travers d'une coupe de la biomasse et a montré une diminution significative du RPE instantanément après la coupe (Shahzad et al., 2012). Ces résultats ont permis d'étayer l'hypothèse du mécanisme de banque sans pour autant en faire la démonstration.

De par l'ajustement des activités microbiennes en fonction de la concentration en N minéral dans la solution du sol, le mécanisme de banque pourrait aider à synchroniser la demande de la plante en N et l'offre du sol au cours de l'année. Des études devraient être

développées pour explorer le mécanisme de banque en étudiant la réponse des activités microbiennes (part relative de la minéralisation et de l'immobilisation de l'N) en fonction de la demande de la plante, cette demande variant selon les saisons et selon les pratiques de fertilisation (C et N).

2.6. Pourquoi le fonctionnement des sols cultivés ne semble pas résulter en une synchronisation entre demande de la plante en nutriments et offre du sol ?

2.6.1. Des pratiques différentes qui résultent en un fonctionnement différent

La conversion d'une prairie en culture de céréales entraîne l'épuisement de la MOS initiale au travers d'une sur-minéralisation de la MO et peut atteindre jusqu'à 75% de perte du stock initial en moins de 25 ans (**Fig. 1.18**) (Balesdent et al., 1988; Mariotti, 1997). Cette baisse de fertilité des sols a pu participer à une stagnation des rendements de céréales à l'échelle globale y compris en France et une dépendance des cultures à la fertilisation azotée (**Fig. 1.19**) (Tilman et al., 2002; Agreste primeur, 2008; Hinsinger et al., 2011). La biomasse microbienne est environ trois fois plus faible en culture qu'en prairie et les flux bruts d'N (minéralisation et immobilisation) en sont impactés (**Fig. 1.20**) (Lynch and Panting, 1980; Recous et al., 1996; Culman et al., 2010). Ces constatations suggèrent qu'il n'y a pas de synchronisation entre demande de la plante en nutriments et offre du sol en cultures annuelles.

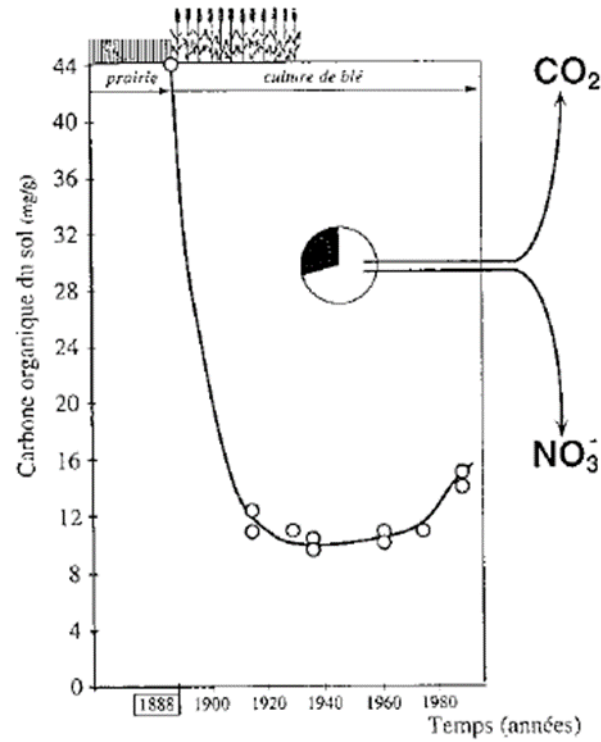


Figure 1. 18 : Évolution de la teneur en carbone organique d'un sol de prairie après avoir été converti en culture. Source : Mariotti ,1996 ; Balesdent et al., 1988

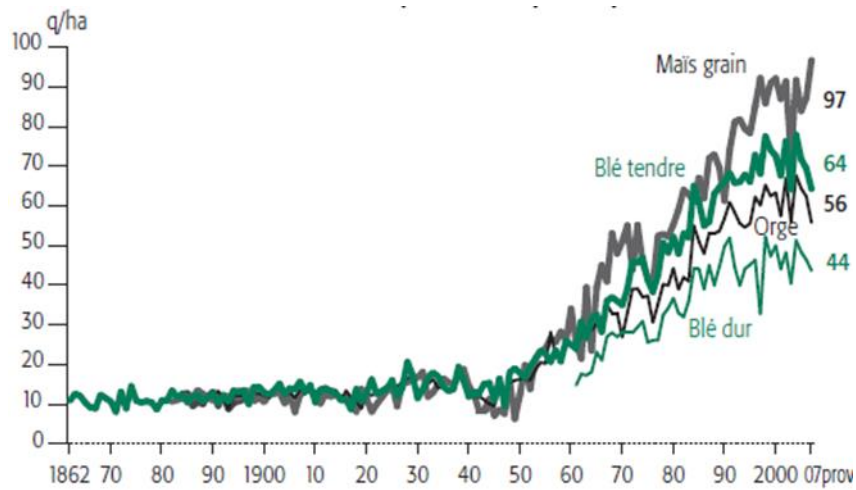


Figure 1. 19 : Rendement des principales céréales en France entre 1862 et 2007. Source : Agreste Primeur, 2008.

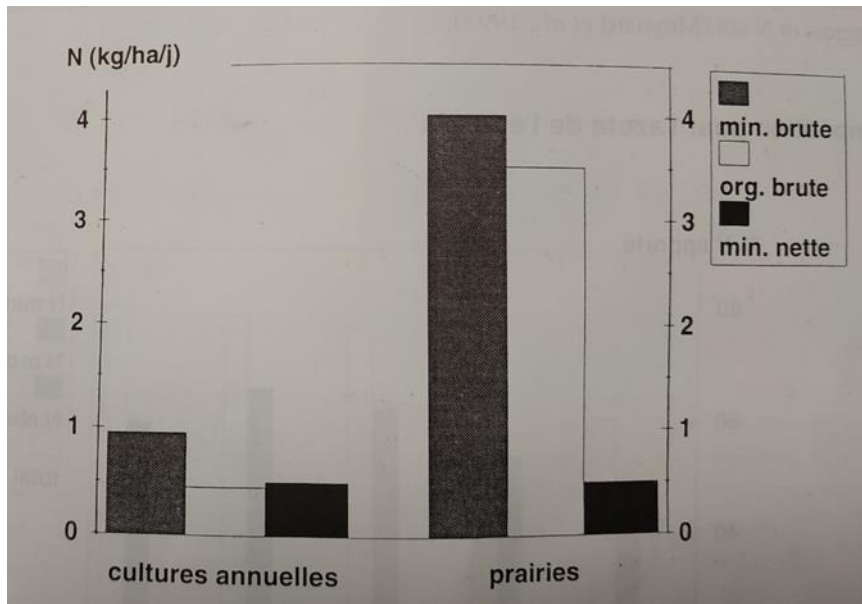


Figure 1. 20 : Flux bruts de transformation de l'azote (N) de prairies et de cultures annuelles : minéralisation brute (min. brute) et immobilisation brute (org. brute) et minéralisation nette correspondant à la différence entre les deux flux bruts. Source : Recous et al., 1996

Les pratiques agricoles réalisées en cultures annuelles diffèrent grandement de celles des systèmes peu perturbés (*i.e* prairies) : pesticides, labour et espèces végétales ; autant de facteurs qui pourraient expliquer cette baisse de fertilité des sols cultivés.

DuPont et al. (2010) ont travaillé sur la conversion de prairies en sols cultivés avec des espèces annuelles sans travail du sol. Les auteurs montrent, après trois ans de conversion, que la biomasse microbienne diminue en particulier en profondeur. Cette étude suggère que ce n'est pas le labour du sol qui affecte le fonctionnement du système sol-plantes après conversion. De plus, une étude réalisée sur 40 ans montre que le travail du sol n'a aucun impact sur le stockage de C d'une rotation de maïs et de blé d'hiver et que l'absence de labour ne permet pas de stocker du C (**Fig. 1.21a**) (Dimassi et al., 2014). En présence de travail du sol, le C est en fait redistribué

en profondeur dans la colonne de sol alors qu'il reste en surface en l'absence de labour (Fig. 1.21b).

Le type d'espèces cultivées semble jouer un rôle important dans l'entretien des biomasses microbiennes dont les activités pourront permettre une synchronisation sol-plantes. Les prairies allouent beaucoup plus de C dans la création de biomasse racinaire que les cultures (Culman et al., 2010). Les estimations montrent que jusqu'à 65% de la biomasse totale est allouée aux parties souterraines en prairie (Saugier et al., 2001; Zhang et al., 2017) alors que les estimations sont seulement de 20% pour les cultures (Sun et al., 2018). La différence majeure entre ces agroécosystèmes est la durée de vie des espèces qui les composent. En effet, les prairies sont majoritairement constituées d'espèces pérennes et ont une croissance continue tout au long de l'année, à l'inverse des cultures qui sont constituées d'espèces annuelles conduisant à la mise à nue des sols une bonne partie de l'année. De fait, les espèces pérennes apportent du C en continu dans le sol de façon proportionnelle à leur activité photosynthétique (Nguyen, 2003; Pausch and Kuzyakov, 2018); ce qui conduit à la nutrition des communautés microbiennes tout au long de l'année. **L'incorporation du C dans le sol semble essentielle au maintien des régulations microbiennes et à la synchronisation sol-plantes.**

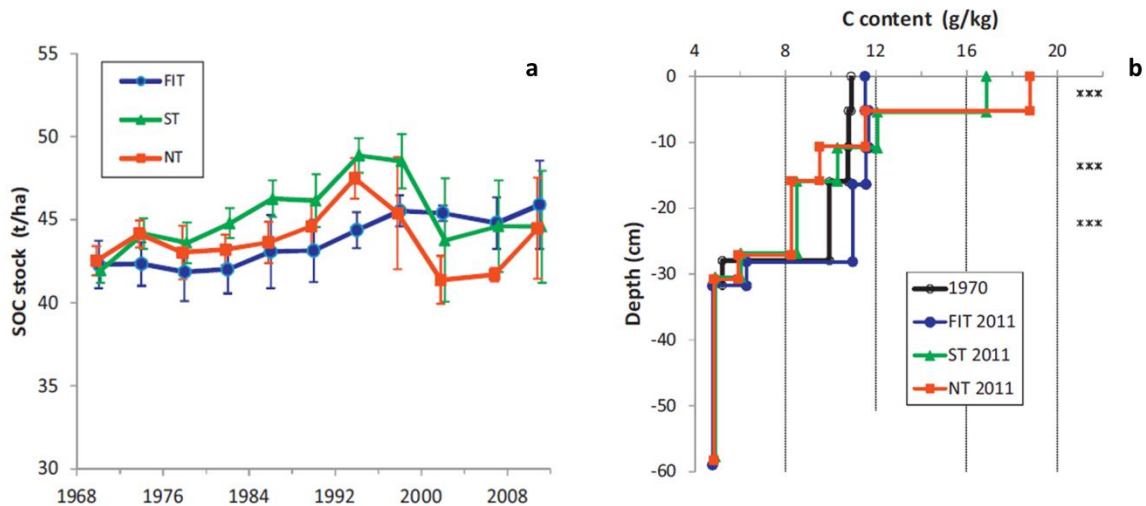


Figure 1.21 : (a) Effet du labour sur le stock de carbone durant 40 ans dans le sol d'une rotation maïs/blé d'hiver ;(b) Effet du labour sur la teneur en carbone des différents horizons du sol après 40 ans de gestion. FIT = travail du sol profond, ST = travail du sol de surface, NT = aucun travail du sol. Source : Dimassi et al., 2014.

2.6.2. Importance des plantes pérennes

Il est fortement suggéré que la présence de plantes pérennes est au cœur de la synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol, puisque ces plantes vont nourrir en continu les microorganismes du sol avec leurs rhizodépôts et vont donc favoriser leurs activités (Recous et al., 1996; Culman et al., 2010; Glover et al., 2010; Crews et al., 2016). Il a été montré que l'introduction de prairie en rotation entre des cultures d'espèces annuelles permet de stopper dès la première année la lixiviation de l' N , mais n'empêche pas son retour lors des cycles de cultures annuelles (**Fig. 1.22**) (Recous et al., 1996).

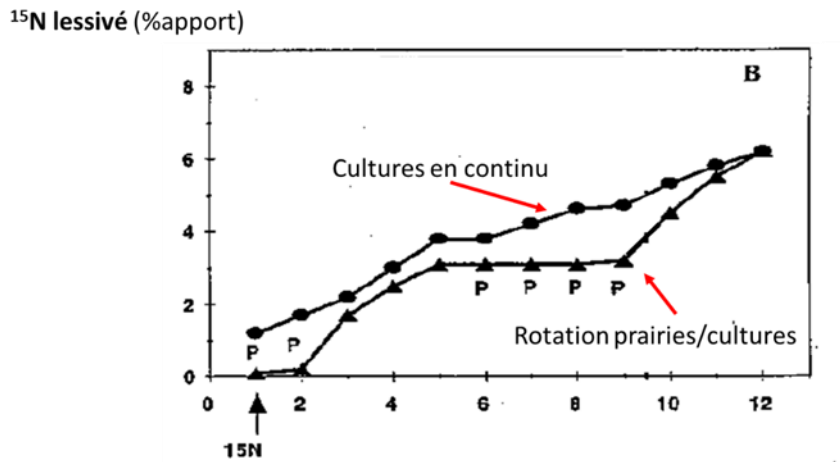


Figure 1. 22 : Azote perdu par lixiviation au cours des 12 années consécutives à l'apport d'azote. Recous et al., (1996).

L'intégration des espèces pérennes dans les nouveaux systèmes de cultures semble essentielle pour réintroduire les régulations microbiennes indispensables à la synchronisation sol-plantes. De nombreux challenges doivent être relevés afin d'optimiser de tels systèmes de culture, alliant production de grains et présence de plantes pérennes (faible compétition).

3. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ma thèse était de montrer l'importance du RPE dans les flux de C ainsi que l'importance du mécanisme de banque dans la synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol. Le premier objectif de ma thèse a été de mettre en place un dispositif expérimental permettant de coupler des mesures de RPE et de flux de C dans des conditions proches de celles des écosystèmes naturels. Des estimations de l'incertitude des mesures du RPE ont été faites en parallèle. Le second objectif a été de rechercher des proxys du RPE afin de pouvoir étendre les études du RPE aux écosystèmes et de permettre leur intégration au bilan de C dans de futures études. Le troisième objectif de ma thèse était de tester l'existence du mécanisme de banque en présence de plantes pérennes en comparaison à une culture annuelle ; mais aussi en manipulant la demande en C et en N d'une prairie. Le quatrième objectif a été de tester si l'association de plantes pérennes et annuelles permettait de rétablir les régulations microbiennes perdues permettant la synchronisation sol-plantes. Le dernier objectif a été de tester l'effet de l'augmentation du CO₂ atmosphérique sur le RPE.

Les résultats concernant les objectifs 1 et 2 seront présentés dans les chapitres 2 et 3, ceux du troisième objectif seront présentés en partie dans le chapitre 4 et en annexes dans la fiche synthétique n°1. Les résultats concernant le quatrième objectif seront présentés dans le chapitre 4 et ceux du dernier objectif seront présentés en annexes dans la fiche synthétique n°2, les données étant toujours en cours d'analyse.

3.1. Hypothèses de la thèse

Les hypothèses liées au premier objectif sont :

- Il est possible de coupler les mesures de RPE avec les flux de C en utilisant le marquage continu des plantes et la mesure des échanges de CO₂ des écosystèmes.

Une méthode basée sur la mesure différentielle de CO₂ entre l'entrée et la sortie d'une serre existe (Schneider et al., 2004) et pourrait s'adapter aux mesures de RPE en mettant en place des mésocosmes individuels pour chaque traitement.

- Il est possible d'améliorer le réalisme des mesures du RPE en s'approchant expérimentalement des conditions naturelles des écosystèmes (température, lumière, surface, nombre d'individus) comparées aux méthodes actuelles.

Le choix de matériaux évitant l'effet de serre et laissant passer la lumière naturelle pourrait permettre de rester proche de l'environnement extérieur. La méthode d'incubation de l'ensemble du système sol-plantes permettrait la mesure du RPE sur un grand nombre d'individus.

- L'incertitude de l'estimation du RPE dépend de l'intensité de marquage choisie.

Plus la différence entre les deux sources (plantes et sol) est grande, moins l'incertitude de la mesure de la composition isotopique des deux sources aura d'effet sur les estimations de RPE.

L'hypothèse liée au second objectif est :

- Le RPE pourrait être prédit par l'activité photosynthétique (production primaire brute) quel que soit l'espèce végétale, la fertilisation azotée et la concentration en CO₂ atmosphérique.

En effet, les études présentées dans l'état de l'art suggèrent le fort lien entre RPE et photosynthèse (Kuzakov and Cheng, 2001b; Shahzad et al., 2012; Huo et al., 2017).

L'hypothèse liée au troisième objectif est :

- L'offre du sol s'ajuste à la demande de la plante en nutriments en prairie mais pas en culture annuelle.

Cet ajustement ne serait pas possible en culture annuelle de par la discontinuité des dépôts d'exsudats dans le sol alimentant les microorganismes, à la différence des plantes pérennes.

L'hypothèse liée au quatrième objectif est :

- L'association prairie et céréale annuelle permet de stimuler les activités microbiennes et de rétablir la synchronisation sol-plantes

La présence de plantes pérennes dans les prairies tout au long de l'année permettrait les dépôts d'exsudats en continu dans le sol pour alimenter les microorganismes et éviterait la lixiviation de l'N.

Les hypothèses liées au cinquième objectif sont :

- L'augmentation de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère stimule la destruction des MOS à cause d'une augmentation de la demande en nutriments de la plante.

Cette stimulation de la destruction des MOS (RPE) serait liée à une stimulation de la photosynthèse qui augmenterait la demande de la plante en N, aboutissant à un épuisement du sol en N.

- La présence d'une légumineuse permet d'atténuer cette stimulation du RPE

Grâce à la fixation symbiotique de l'N au sein des nodosités, la présence de légumineuse aurait le même effet qu'une fertilisation azotée naturelle.

3.2. Approches de l'étude

Pour répondre aux objectifs ci-dessus, nous avons mis en place deux expérimentations complémentaires. Nous avons construit une plateforme expérimentale permettant de mesurer les flux de C (respiration de l'écosystème et production primaire brute, exportations dans la biomasse), le RPE et les pertes d'N (exportations dans la biomasse, lixiviation) sur le long terme dans des mésocosmes. Pour étudier les flux internes d'N contrôlés par les activités des

microorganismes, un dispositif annexe a été mis en place. Il permettait les récoltes destructives de pots nécessaires à la quantification du potentiel de minéralisation et d'immobilisation brute de l'N à différents moments de l'année.

3.2.1. Plateforme expérimentale couplant les mesures de RPE et les flux de CO₂

1) La plateforme expérimentale contient 40 mésocosmes



Figure 1. 23 : Vue d'ensemble de la plateforme expérimentale

La plateforme expérimentale consiste en 40 mésocosmes indépendants comprenant une partie souterraine enterrée (PCV, 100 cm de hauteur, 25cm de diamètre) et deux parties aériennes interchangeables (90 cm de hauteur, 25cm de diamètre) (**Fig. 1.23**). La partie aérienne utilisée en continu était transparente (poly-méthyl méthacrylate (PMMA)) et a été fixée à la partie souterraine par des grenouillères permettant son remplacement par les chambres de nuit opaques (PVC). L'étanchéité entre les parties souterraines et aériennes a été testée en début d'expérimentation et a été assurée par un joint en caoutchouc. Les espèces végétales pérennes

ont été semées en septembre 2016 tandis que la céréale annuelle a été plantée en février 2017. Les mesures ont débuté en novembre 2016, une fois que la couverture végétale était installée.

2) Mesures des lixiviats

Afin de récupérer les eaux de lessivage, une plaque perforée recouverte d'une toile empêchant le passage des racines a été placée dans la partie souterraine à 90cm de profondeur pour former un réservoir (**Fig. 1.24**). Les eaux de lessivage ont été récoltées en fin d'hiver puis de fortes pluies ont été simulées entre mars et avril 2018 pour provoquer un drainage total d'en moyenne 242 mm. Afin de déterminer la quantité d'N lixivié, le volume d'eau drainé a été mesuré et multiplié par sa teneur en NO_3^- et NH_4^+ .



Figure 1. 24 : Réservoir dédié à l'accumulation des eaux de lessivage, intégré à la partie souterraine. L'accès est possible grâce au tuyau blanc qui permet le pompage depuis le haut du pot.

3) Technologie de marquage continu des plantes

La quantification du RPE nécessite de marquer le matériel plante afin de séparer la respiration des plantes de celle de la MOS du sol initial. La méthode utilisée est celle proposée par Shahzad et al. (2012) basée sur la production d'un air sans CO₂ puis d'une injection de CO₂ marqué à la concentration et à l'intensité de marquage désirée. Nous avons utilisé du CO₂ appauvri en ¹³C originaire de la combustion fossile, pour des raisons économiques ($\delta^{13}\text{C} : -35.23 \pm 0.02$). La concentration en CO₂ atmosphérique était de 400 ± 20 ppm pour 32 mésocosmes et 700 ± 20 ppm pour 8 mésocosmes. La qualité de l'air produit a été continuellement contrôlée au travers de deux points de mesures : l'un après décarbonatation, l'autre après injection du CO₂. La stabilité du marquage a été assurée au travers de la forme en pieuvre du système de distribution d'air (**Fig. 1.23**).

Le RPE a été mesuré en adaptant la méthode d'incubation du système sol-plantes proposée par Shahzad et al. (2012) par des incubations *in situ* grâce à la mise en place de chambres opaques sur les mésocosmes durant 24 heures (**Fig. 1.25**). L'absence de lumière stoppait la photosynthèse afin de prévenir une ré-assimilation du CO₂ dérivé du sol par la plante. Après 24 heures d'incubation, des échantillons de gaz ont été prélevés afin de quantifier l'accumulation de CO₂ correspondant à la respiration du système sol-plantes de chaque mésocosme. L'analyse des échantillons consistait à déterminer leur concentration en CO₂ puis leur composition isotopique. Le RPE est ensuite calculé en utilisant les équations 1-4 présentées dans la partie « 2.4. *Le rhizosphere priming effect* ».



Figure 1. 25 : Photographie de la plateforme expérimentale lors des incubations du système sol-plantes pour la mesure du « rhizosphere priming effect ».

4) Mesures continues des échanges de CO₂

Les échanges continus de CO₂ ont été quantifiés continuellement en comparant la concentration de CO₂ entrant et sortant des mésocosmes (dCO₂) (**Fig. 1.26**). L'air entrant dans les mésocosmes a été collecté à deux points sur le système de distribution d'air : un point pour le CO₂ ambiant et un autre pour le CO₂ élevé, tandis que l'air en sortie a été mesuré sur chaque mésocosme. L'air collecté a été distribué, grâce à un multiplexeur, à trois analyseurs se répartissant les 40 mésocosmes. Pour les mésocosmes en CO₂ ambiant, chaque analyseur enregistrerait les échanges de CO₂ de 16 mésocosmes à une fréquence de mesure de deux par heure. Pour les mésocosmes en CO₂ élevé, la fréquence de mesure était de 4.3 par heure. En parallèle, la température de l'air et le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) ont été mesurés continuellement.

La productivité nette de l'écosystème (NEP) a ensuite été calculée (1) en multipliant le dCO_2 par le débit d'air traversant les mésocosmes (mesurés fréquemment en sortie des mésocosmes) ; (2) en convertissant le flux en mole par unité de temps en utilisant la loi des gaz parfaits ; (3) en convertissant les moles en g de carbone par unité de temps par m^2 . Finalement la NEP a été partitionnée en production primaire brute (GPP) et en respiration de l'écosystème (RE) en utilisant la méthode de Reichstein et al. (2005).

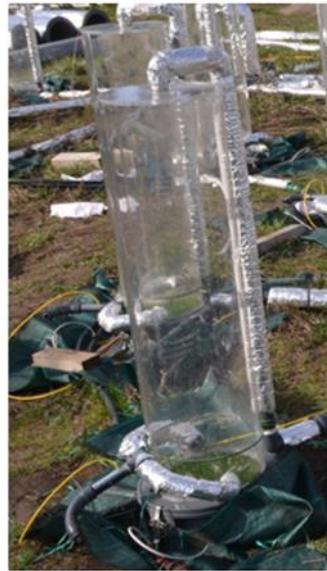


Figure 1. 26 : Photographie d'un mésocosme équipé d'une chambre transparente. Le tuyau jaune en sortie correspond au prélèvement de gaz pour les mesures d'échange continu de CO_2 .

3.2.2. L'expérimentation dédiée aux mesures de flux d'azote

La plateforme expérimentale étant dédiée à la mesure des différents flux de C (RPE, GPP, RE, NEP), le prélèvement de carottes de sol aurait pu perturber l'activité des microorganismes et les flux associés mesurés. Afin de mesurer les activités des microorganismes, deux serres ont été mises en place. Les pots contenus dans les serres avaient les mêmes caractéristiques que ceux des mésocosmes mais un diamètre plus petit (10 cm). Les mêmes traitements ont été mis

en place et subissaient la même gestion au même moment que ceux des mésocosmes (semis, fauche, fertilisation). Chaque traitement contenait 4 répétitions répliquées trois fois afin de réaliser trois récoltes destructives au cours de l'année (hiver, printemps et automne).

Lors de ces récoltes destructives, différentes mesures ont été réalisées : biomasse microbienne (Vance et al., 1987) ; concentration en N disponible dans le sol ; biomasse des racines et teneur en carbone et en azote des parties aériennes et souterraines des plantes.

Les mesures de flux de minéralisation et d'immobilisation brute de l'N ont aussi été réalisées en utilisant la méthode de marquage au ^{15}N (Davidson et al., 1991; Recous et al., 1995; Mary et al., 1998). Des incubations de sols ont d'abord été réalisées après marquage au $^{15}\text{N-NH}_4$ pendant 2 heures et 26 heures et correspondent au temps initial (t_0) et à la fin de l'incubation (24h, t_1) (**Fig. 1.27**). La détermination de la teneur en N inorganique a été réalisée avant marquage, à t_0 (2h) et à t_1 (26h) par des extractions d'N au KCl. Le surplus de ces extraits d'N minéral a été réservé pour réaliser une microdiffusion des ions NH_4^+ et NO_3^- au travers de l'utilisation de réactifs (Manganèse et alliage de dervada). Les NH_4^+ et NO_3^- évaporés dans des flacons hermétiques ont été capturés sur des disques (**Fig. 1.27**) et ces derniers ont été analysés pour connaître leur teneur en ^{15}N inorganique. Le sol utilisé pour les extractions au KCl a été récupéré, rincé pour éliminer le KCl puis séché et broyé pour déterminer la teneur en N organique au deux temps d'incubations.



Figure 1. 27 : Incubations et microdiffusion pour déterminer les flux de minéralisation et d'immobilisation brute de l'azote en utilisant une méthode de marquage au ^{15}N .

La minéralisation (m) et l'immobilisation (i) brute de l'N ($\text{mg N kg sol}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) ont été calculées avec les équations suivantes (Davidson et al., 1991; Mary et al., 1998) :

$$m = \frac{M_0 - M_1}{t} \times \frac{\log\left(\frac{H_0 \times M_1}{H_1 \times M_0}\right)}{\log\left(\frac{M_0}{M_1}\right)} \quad (5)$$

où M_0 est la concentration de $^{14+15}\text{NH}_4$ à t_0 ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$), M_1 est la concentration de $^{14+15}\text{NH}_4$ à t_1 ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$), H_0 est la concentration de $^{15}\text{NH}_4$ à t_0 ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$), H_1 est la concentration de $^{15}\text{NH}_4$ à t_1 et t est le temps d'incubation soit 24 heures. L'immobilisation brute de l'N est ensuite calculée en utilisant une constante k et la différence de concentration en ^{15}N organique entre t_0 et t_1 appelée $V_{t=1}$ ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$).

$$i = \frac{V_{t=1}}{\frac{H_0}{M_0} \times \left(\frac{1 - e^{-k}}{k}\right)} \quad (6)$$

$$k = -\ln \left(\frac{H_1 \times M_0}{H_0 \times M_1} \right) \quad (7)$$

L'offre du sol a été estimée en calculant la différence entre minéralisation et immobilisation brute de l'N.

$$\Delta MIT = m - i \quad (8)$$

4. Plan de la thèse

Lors de cette thèse, différentes hypothèses ont été posées et ont été testées au travers de la plateforme expérimentale et des serres annexes dédiées aux récoltes destructives. L'étude de ces hypothèses a été présentée sous la forme d'articles finalisés dans les trois chapitres qui suivent et dans les annexes.

Le premier article décrit la plateforme expérimentale et met en avant l'ensemble des défis associés au couplage des mesures de RPE avec ceux des échanges gazeux de CO₂ (GPP, RE, NEP) sur des systèmes sol-plantes aux traitements contrastés évoluant dans des conditions de lumière et de température proches de celles de l'environnement naturel. De plus, une analyse d'incertitude du RPE liée à notre expérimentation est fournie et est mise en lien avec les incertitudes fournies par d'autres types d'expérimentations présents dans la littérature. Cet article a été accepté dans le journal « Soil Biology & Biochemistry ».

Le second article investigate des proxys du RPE au travers de variables facilement mesurables que sont la biomasse aérienne, la GPP et la RE. Cet article a été soumis dans le journal « Scientific reports ».

Le troisième article apporte des preuves sur l'existence du mécanisme de banque au travers de la mesure des régulations rhizosphériques. La mise en place ou non d'un ajustement de l'offre du sol à la demande de la plante détermine le pouvoir de synchronisation sol-plantes de différents modes d'occupation des terres (prairies, cultures annuelles et innovantes).

Une discussion générale et des perspectives mises en avant par ce travail de thèse font l'objet de la dernière partie de cette thèse.

Les annexes contiennent des fiches synthétiques correspondant à deux articles en préparation dans lesquels des résultats préliminaires émanant de la thèse sont présentés sur (1) l'effet de la manipulation de la demande de la plante en C et N sur le mécanisme de banque et (2) l'effet de l'augmentation du CO₂ atmosphérique sur le RPE.

Chapitre 2 : Une nouvelle plateforme expérimentale couplant le « rhizosphere priming effect » avec les flux de CO₂ des systèmes sol-plantes



**A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect
with CO₂ fluxes of plant-soil systems.**

Camille Cros^{a*}, Gaël Alvarez^a, Frida Keuper^b, Sébastien Fontaine^a

Article accepté dans « Soil Biology and Biochemistry »

^aUCA, INRA, VetAgro Sup, UMR Ecosystème Prairial, 5, Chemin de Beaulieu, 63000, Clermont-Ferrand, France

^bINRA, UR AgroImpact, 180, rue Pierre-Gilles de Gennes, 02000, Barenton-Bugny, France

Email addresses: CC camille.cros.sci@gmail.com GA gael.alvarez@inra.fr, FK frida.keuper@inra.fr, SF sebastien.fontaine@inra.fr

*Author for correspondence

Camille Cros, UCA, INRA, VetAgro Sup, UMR Ecosystème Prairial, 5, Chemin de Beaulieu, 63000, Clermont-Ferrand, France

Email: camille.cros.sci@gmail.com

Keywords:

Rhizosphere priming effect; plant-soil CO₂ fluxes; ¹³C labeling, experimental platform; priming uncertainty.

Highlights

- A new platform was designed to couple rhizosphere priming to plant-soil CO₂ fluxes
- The platform advantage is to provide priming estimates under semi-natural conditions
- Disadvantages are the cost and multiple controls to limit estimate uncertainty
- Uncertainty lower than 10% of priming value requires a labeling intensity >60‰

Abstract

Forty years of research on the rhizosphere priming effect (RPE) has demonstrated the potentially large increase (up to a factor 3) of soil organic matter mineralization induced by plant roots, but failed to directly quantify its contribution to the carbon (C) balance. Combining continuous CO₂ flux measurements with RPE measurements has thus far been technically challenging. Here, we present an experimental platform of 40 mesocosms (volume = 88L; surface = 0.049m²), including a ¹³C-labeled CO₂ air-production system with a maximum capacity of 4m³ min⁻¹ and customizable labeling intensity. For this study, ¹³C depleted fossil C was used as source of labeled CO₂ and the experiment was run for 250 days. Continuous net CO₂-exchange measurements allowed us to estimate net ecosystem productivity, gross primary production and ecosystem respiration of the studied plant-soil systems. The RPE was regularly (bi-monthly to monthly) quantified by measuring the accumulation and isotopic composition of CO₂ in dark chambers placed over the mesocosms. Our results show a good relationship between night plant-soil respiration (from continuous CO₂-exchange measurements) and dark plant-soil respiration (from CO₂ accumulation in dark chambers). This result suggests that our estimates of RPE and plant-soil fluxes based on the different methods are comparable. Preliminary results obtained in spring with grasses cultivated under ambient or elevated CO₂ indicate that the RPE represents $1.22 \pm 0.16\%$ of gross primary production and $4.64 \pm 1.12\%$ of ecosystem respiration. The RPE estimates may have an uncertainty linked to the possible deviation in delta ¹³C between C sources (soil or plant) and released CO₂ from these sources. We performed a sensitivity analysis on how the variation in intensity of isotopic labeling (difference in delta ¹³C between plant and soil) affects the uncertainty of RPE estimates considering 1‰ delta ¹³C deviation. Estimation of the RPE with an uncertainty lower than 10% of the estimated value requires a labeling intensity higher than 60‰. The developed platform will help to scale up the study of the RPE control on C cycling to the ecosystem level.

1. Introduction

Globally, the soil C pool is about three times larger than the atmospheric carbon pool (Ciais et al., 2013). This means that small changes in soil respiration in response to global warming could have a large effect on atmospheric CO₂ concentration with a positive feedback on climate warming (Kuzyakov, 2006; Lal, 2016). CO₂ efflux from soil includes the rhizosphere priming effect (RPE), a change of soil organic matter (SOM) decomposition due to the presence of living roots supplying soil microorganisms with energy-rich compounds (rhizodeposition, litter) (Liljeroth et al., 1994; Kuzyakov, 2002; Huo et al., 2017). RPE estimates vary between a decrease of -50% to an increase of 380% in soil respiration measured under experimental conditions (Cheng et al., 2014). Hence, at the ecosystem level, the RPE could play an important role in C soil stock fluctuation through C released by SOM mineralization (Fontaine et al., 2007; Heimann and Reichstein, 2008). However, methodological constraints prevent large-scale estimates of the contribution of the RPE to the ecosystem CO₂ balance.

Current experimental studies on the RPE are mostly short-term (days to months) pot-experiments with annual species (Cheng et al., 2003; Dijkstra et al., 2006; Pausch et al., 2016; Shahzad et al., 2015; Zhu et al., 2014). Thus far, the seasonal variations in RPE are most likely underestimated by omitting the low plant-growth seasons such as fall and winter. Moreover, interactions between plants (individuals and species) are not often taken into account (but see: Dijkstra et al., 2010; Pausch et al., 2013). In addition, the plants are often cultivated in short pots (max 40 cm depth) under artificial light and temperature, making extrapolation of measured RPE to ecosystem scale difficult (Shahzad et al., 2012; Zhu and Cheng, 2012; Pausch et al., 2013; Carrillo et al., 2014). Furthermore, the RPE is often coupled with sporadic measurements of night ecosystem respiration (RE_{night}) (Shahzad et al., 2012; Moinet et al., 2016) but are less often coupled with photosynthetic fixation (Kuzyakov and Cheng, 2001; Shahzad et al., 2015), while net CO₂ balance has never been measured along with the RPE.

Such measurements linked to CO₂ fluxes are difficult to set up due to constraints imposed by RPE measurements techniques, especially isotope labeling. In summary, there is a necessity to develop set ups allowing RPE quantification and its contribution to ecosystem CO₂ fluxes over longer time scales at higher complexity (multiple species, individuals) and thus better mimicking natural environmental conditions.

The estimation of the RPE is based on the comparison of SOM-derived CO₂ efflux from planted and unplanted soil (Dijkstra and Cheng, 2007; Pausch et al., 2016; Shahzad et al., 2012). However, the CO₂ efflux from planted soil is mixture of two C sources: the plant-derived CO₂ (root respiration and microbial decomposition of rhizodeposits) and SOM-derived CO₂ (microbial respiration of SOM decomposition) (Kuzyakov, 2002, 2006). The only reliable way to separate these two CO₂ sources is the use of different C isotope techniques in order to trace the origin of carbon (plant or soil) in CO₂ emissions.

The pulse labeling method, which consists of a single short-term exposure of plants to a labeled ^{13/14}CO₂ atmosphere, is not adequate for RPE measurements. This technique leads to heterogenous distribution of labeled C in the different plant compartments, and the amount of labeled C in a plant decreases with time (Keith et al., 1986; Jensen, 1993; Kuzyakov, 2001). Methods using the difference in isotope composition between C₃ and C₄ plants allow for long term RPE measurements but are limited by the weak difference in isotope composition ($\delta^{13}\text{C} = -14\text{‰}$) and by the choice of species used (Cheng, 1996; Kuzyakov, 2002). Compared to pulse labeling or the C₃C₄ methods, continuous plant ¹³C labeling is by far a better method of labeling to assess the RPE. Continuous plant ¹³C labeling is based on a continuous injection of labeled CO₂ in a greenhouse allowing a homogeneous distribution of labeled C in plant compartments and a stable plant isotopic composition over time. Due to the cost of ¹³C-labeled CO₂, all recent RPE studies with living plants used depleted-¹³CO₂ injection from fossil fuel combustion ($\delta^{13}\text{C}_{\text{fossil}} \approx -38\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{air}} \approx -8\text{‰}$) (Cheng and Dijkstra, 2007; Shahzad et al., 2012; Pausch et

al., 2013; Zhu et al., 2014). These studies differ by two types of methodology. The first method consists of adding fossil $^{13}\text{CO}_2$ in a flow of ambient air (Cheng and Dijkstra, 2007; Pausch et al., 2013; Carrillo et al., 2014). The limitation of which is that the intensity of ^{13}C labeling inside the greenhouse is less strong ($\delta^{13}\text{C}_{\text{greenhouse}} \approx -18\text{‰}$ to 24‰) and can fluctuate over time due to non-stability of atmospheric ^{13}C because of anthropogenic activities (Peterson and Fry, 1987). The second method, generation of CO_2 free-air followed by a ^{13}C -labeled CO_2 injection, avoids ambient air pollution and ensures stable ^{13}C labeling inside the greenhouse over time ($\delta^{13}\text{C}_{\text{greenhouse}} = -38.55\text{‰}$) (Shahzad et al., 2012). This method (Shahzad et al., 2012) was used in a greenhouse with relatively little pots (40 cm high, 9.8 cm diameter) and could thus be improved by using larger mesocosms and growth conditions closer to natural growing conditions.

Sampling SOM-derived CO_2 in the presence of a plant requires avoiding plant uptake of CO_2 by photosynthesis. The historical method of sampling SOM-respired CO_2 is to separate aboveground and belowground plant parts, allowing soil respiration measurements but limiting the measurements to species with a big stem most of the time (Cheng et al., 2003; Cheng and Dijkstra, 2007; Pausch et al., 2013; Zhu et al., 2014). Another recent method to sample SOM-respired CO_2 , was adapted to herbaceous species by incubation of the whole pot combining above and belowground parts (Shahzad et al., 2012). This method requires dark incubation to stop photosynthesis and to avoid plant absorption of SOM-respired CO_2 . Due to the relatively small size and weight of the pots used by Shahzad et al. (2012), this dark incubation could take place outside the greenhouse in a laboratory. If larger mesocosms and more natural environmental conditions are required, the Shahzad et al. (2012, 2015) methodology would need to be adapted to perform direct RPE measurements.

In order to quantify the contribution of the RPE to ecosystem CO_2 fluxes, a method for measuring the ecosystem CO_2 exchange must be developed, taking into account all the

constraints linked to the RPE measurements presented above. The eddy covariance method traditionally used for quantifying ecosystem CO₂ exchange requires a large flat area (Baldocchi et al., 1998; Luyssaert et al., 2009) making plant labeling unfeasible. Another method that could make continuous plant labeling and CO₂ exchange measurements compatible is the quantification of the amount of CO₂ entering and leaving closed mesocosms (Schnyder et al., 2003). However, this method must combine several technologies in order to maintain the quality of plant labeling over time; to adapt the airflow to plant photosynthetic activity; and to limit a greenhouse effect.

The aim of this study is to present an innovative experimental platform, which combines RPE and CO₂ flux measurements. This platform resulted from deep modifications of the method developed by (Shahzad et al., 2012) that allowed plant labelling and RPE measurements. The novelties are: the building of forty individual mesocosms with interchangeable transparent and dark aboveground chambers, a system distributing homogeneously the ¹³C-labelled air to mesocosms, a system of air sampling coupled to a multiplexer connected to differential CO₂ analyzers, and different sensors to control soil and air temperature and moisture. The overall platform was designed in order to face the following technical challenges (each challenge has a specific label, which is used throughout the manuscript):

- Technical challenges specific to the RPE measurements:
 - Strong (> 14 ‰ difference between soil and plant) and stable plant labeling (Shahzad et al., 2012) (**C_RPE_1**);
 - Ecosystem dark incubation for recovery of SOM respired-CO₂ (**C_RPE_2**);
 - The estimation of the RPE requires comparison of soil C mineralization in planted and in unplanted soil. In order to focus on factors that led to the RPE (rhizodepositions and plant litters), the other environmental factors such as soil

moisture and temperature have to be similar (**C_RPE_3**) (Schimel et al., 2007; Chen et al., 2015).

- Technical challenges specific to plant-soil CO₂ exchange measurements:
 - Detecting the difference in CO₂ concentration between inlet and outlet of each mesocosm while adapting to seasonal variation due to plant/soil activities (Schnyder et al., 2003) (**C_FLUX_1**);
 - Quantification of the airflow through the mesocosms (**C_FLUX_2**).
- General technical challenge: conditions of light, temperature and soil column similar to natural conditions (**GC**).

If the above listed technical requirements are met by our platform, the continuous measurements of CO₂ exchange measurements will permit to quantify net ecosystem productivity (NEP), growth primary production (GPP) and ecosystem respiration (ER) of the studied plant-soil systems. Moreover, regular measurements using dark chambers would allow for quantification of dark respiration and RPE. In order to validate our data, we compared night plant-soil respiration (continuous CO₂-exchange measurements) and dark plant-soil respiration (CO₂ accumulation in dark chamber). If the data provided by the two methods are comparable, we can compare and link estimates of RPE with plant-soil fluxes (NEP, GPP and ER). A sensitivity analysis of RPE to uncertainties of plant and soil isotopic composition at different labeling intensities was done to determine the labeled intensity to use depending on RPE uncertainty chosen.

2. Materials & Methods

2.1. Description of mesocosms and current experiment

The experimental platform consists of 40 independent mesocosms with a buried belowground part (PVC, 100 cm height, Ø 25 cm) and two aboveground chambers (90 cm height, Ø 25 cm) (**Fig. 2.1, Fig. 2.2A**). A perforated plate covered by a mesh preventing root

penetration was placed at 90 cm depth in the belowground part building a tank (10 cm high) collecting leachates (**Supplementary Fig. S1**). For the transparent aboveground chamber polymethyl methacrylate (PMMA) was used, securing ambient light conditions in the mesocosms (**General challenge, GC**). The transparent chamber was fixed to the belowground pot with clips permitting its removal in order to replace it by a dark chamber (opaque PVC) for RPE and dark respiration measurements (**Fig. 2.2D**). Air-tightness was ensured by a rubber seal on the belowground pot.

The current experiment involved ten treatments that do not follow a factorial design (**Table S1**). These treatments included three different plant species (*Trifolium repens*, *Lolium perenne*, *Triticum aestivum* var. *lennox*), four plant assemblages and one unplanted soil used to calculate the RPE. Two CO₂ atmospheric concentrations and two levels of nitrogen (N) were applied on several assemblages. There were four replicates per treatment.

The soil was a drained Cambisol sampled from an upland grassland in central France (Theix 45° 43' N, 03° 01' E). The five first centimeters corresponding to the root mat were removed and the soil from three distinct layers (5-20cm, 20-50cm, 50-90cm) was sampled. The fresh soil of the three layers was separately sieved at one cm in order to remove the biggest stones. Then, the soil was transferred in the mesocosms by reconstituting the natural layering of the sampled soil column (5-20 cm; 20-50 cm; 50-90 cm, respectively) (**GC**). The soil properties were pH 5-20 cm layer: 6.29 ± 0.14 (mean $\pm$ 1 se), 20-50 cm layer: 6.63 ± 0.04 , and 50-90 cm layer: 6.68 ± 0.09 ; soil organic carbon (g kg⁻¹ soil) 5-20 cm layer: 30.28 ± 0.32 , 20-50 cm layer: 25.27 ± 0.51 , and 50-90 cm layer: 17.62 ± 0.21 . Ten treatments with four replicates were installed in September 2016 (**Table S1**), and for this article, we used the data from November 2016 to July 2017. September and October 2016 were excluded because they corresponded to the establishment of the plant cover. Since the aim of this paper is to present the experimental platform and its performance, only a selection of data and treatments is presented.

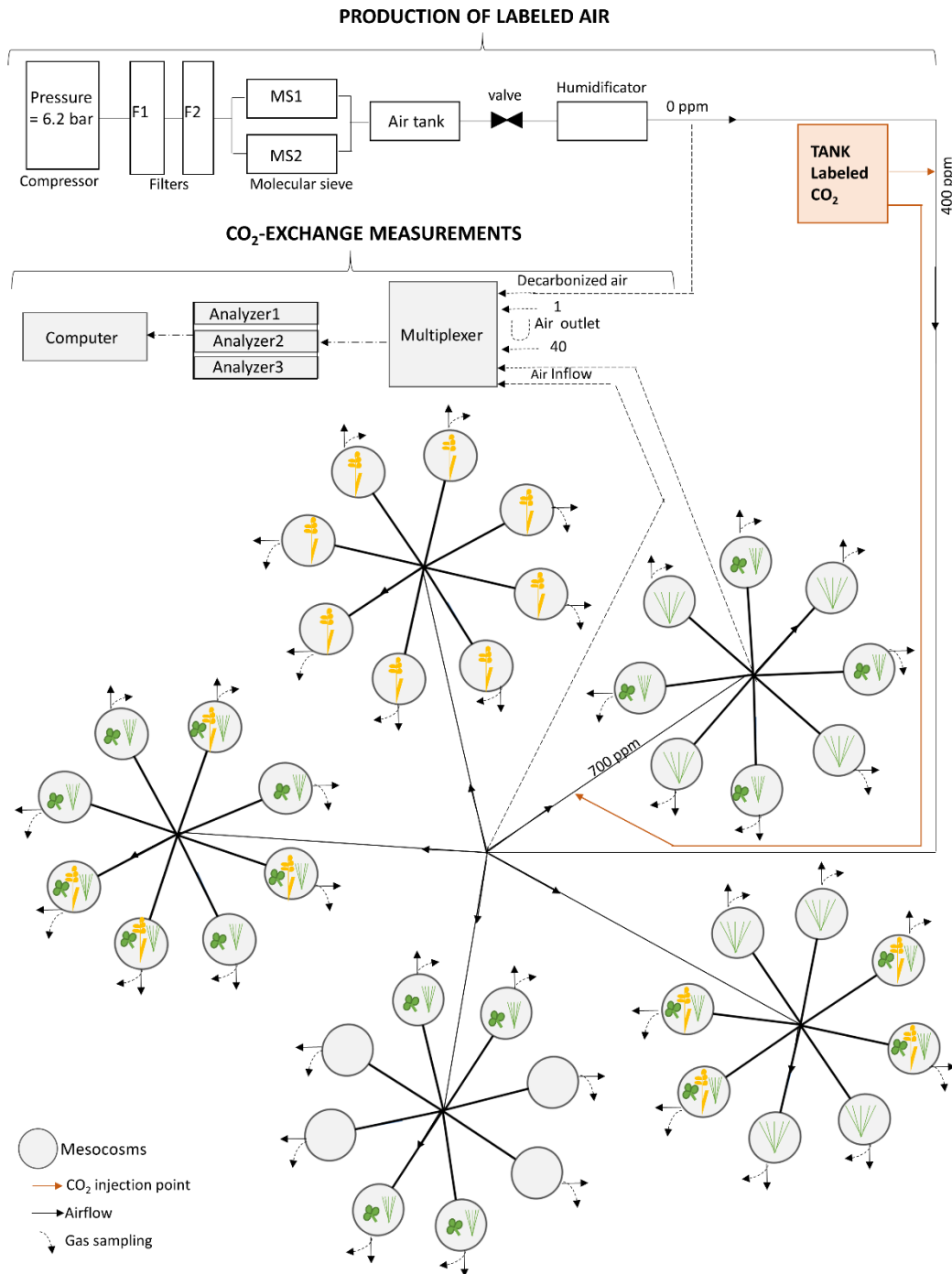


Figure 2. 1 : Schematic representation of the experimental platform: the production of labeled air consisted of a compressor (Worthington Creyssensac, Rollair 50), filters for oil and water (F1) and for oil, water and particles (F2), two molecular sieves (MS1, 2; Adsorption dryers Zander ecodry KEN-3100MSTE), an air tank, a valve regulating the airflow, an humidifier, a tank containing 2.4 tons of CO₂ of fossil fuel origin and two points of CO₂ injection in the

airflow. The first injection point allowed increasing CO₂ concentration from about 0 to 400 ppm. The second injection point placed on the tube supplying the octopus distributing the air to mesocosms with treatments “elevated CO₂” increased CO₂ concentration from 400 to 700 ppm. The CO₂-exchange measurements included a multiplexer composed of primary and secondary pumps and multiple electrovalves for gas sampling, three differential gas-analyzers (Licor LI-700 CO₂/H₂O Analyzer) and a PC for data acquisition. Air is distributed over five independent octopus, each of them connected to eight mesocosms. For the present experiment, the CO₂ injections were adjusted to set up CO₂ concentrations of 400 ± 20 ppm in 32 mesocosms (Ambient CO₂ treatment) and 700 ± 20 ppm in 8 mesocosms (Elevated CO₂ treatment).

2.2. System of labeled air production and distribution

The labeling system was based on generation of CO₂-free air and subsequent injection of labeled CO₂ (**C_RPE_1**) (**Fig. 2.1**). The labeled air production system was adapted from Shahzad et al. (2012). Ambient air was injected into the system by a compressor and was distributed to a molecular sieve removing CO₂, H₂O and all other particles. The produced air was stored in a tank at a constant pressure of 6.2 bars thanks to a regulator of pressure. This constant pressure combined to a valve allowed to deliver a constant flow of decarbonized air. The decarbonized air passed through a humidifier before labeled CO₂ was injected. For economic reasons, ¹³C-depleted CO₂ from fossil fuel origin was used ($\delta^{13}\text{C}$: -35.23 ± 0.02). Two successive injection points of CO₂ injection were placed along the air distribution system allowing for a custom atmospheric CO₂ concentration in the mesocosms (**Fig. 2.1**). The current experiment included 32 mesocosms under ambient and eight mesocosms under elevated CO₂ concentrations: 400 ± 20 ppm (ambient) and 700 ± 20 ppm (elevated) (**Fig. 2.1**).

The quality of the produced air (CO₂ concentration and isotopic ¹³C composition) was continuously controlled by analyzing the residual CO₂ concentration after decarbonation and the CO₂ concentration after injections of labeled air (**Fig. 2.1**). Previous studies showed that the isotope composition of such produced CO₂ is stable if the residual CO₂ concentration is maintained below 20 ppm and if the CO₂ concentration after injection is fixed (Shahzad, 2012; Shahzad et al., 2012). The ¹³C isotope composition of the labeled plants was measured on the aboveground material of two species following five biomass harvests (November 2016, December 2016, February 2017, May 2017 and July 2017). The first three harvests were pooled in order to reach a sufficient amount of plant material for analysis. These chosen species, *Lolium perenne*) and *Trifolium repens*, were selected based on their perennial character, thus allowing harvest of material throughout the experiment. Aboveground plant material was ground and analyzed using an elemental analyzer (EA; Carlo Erba, Rodana, Italy) coupled to an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; Elementar, Langenselbold, Hesse, Germany) in order to determine plant C content and delta ¹³C.

To ensure stable plant labeling and to quantify the airflow through the mesocosms, the air has to be homogeneously distributed in each mesocosm (**C_RPE_1**, **C_FLUX_2**). Several air distribution systems were tested (details are available in **Sup. Mat. 1.1**) and the selected system had an ‘octopus’ shape (**Fig. 2.2A, B, and C**). Although the air production and distribution system was designed to ensure a stable airflow across mesocosms over time, the pipes could be obstructed (e.g. by spider webs) disturbing air distribution among mesocosms. Therefore, we checked the airflow crossing all mesocosms initially and regularly (three times per month on average) by measuring the wind speed at the outlet of each chamber with an anemometer. The airflow rate was calculated by multiplying the wind speed by the pipe cross-section.

The air production was adjusted across seasons to permit the detection of CO₂ exchanges and to limit CO₂ depletion inside the mesocosms. A depletion of 70 ppm of CO₂ induced by

plant photosynthesis was fixed as the threshold to adapt the air production. Grass intercropped with legumes under elevated CO₂ was chosen to illustrate the adaptation of airflow to intensity of CO₂ exchange.

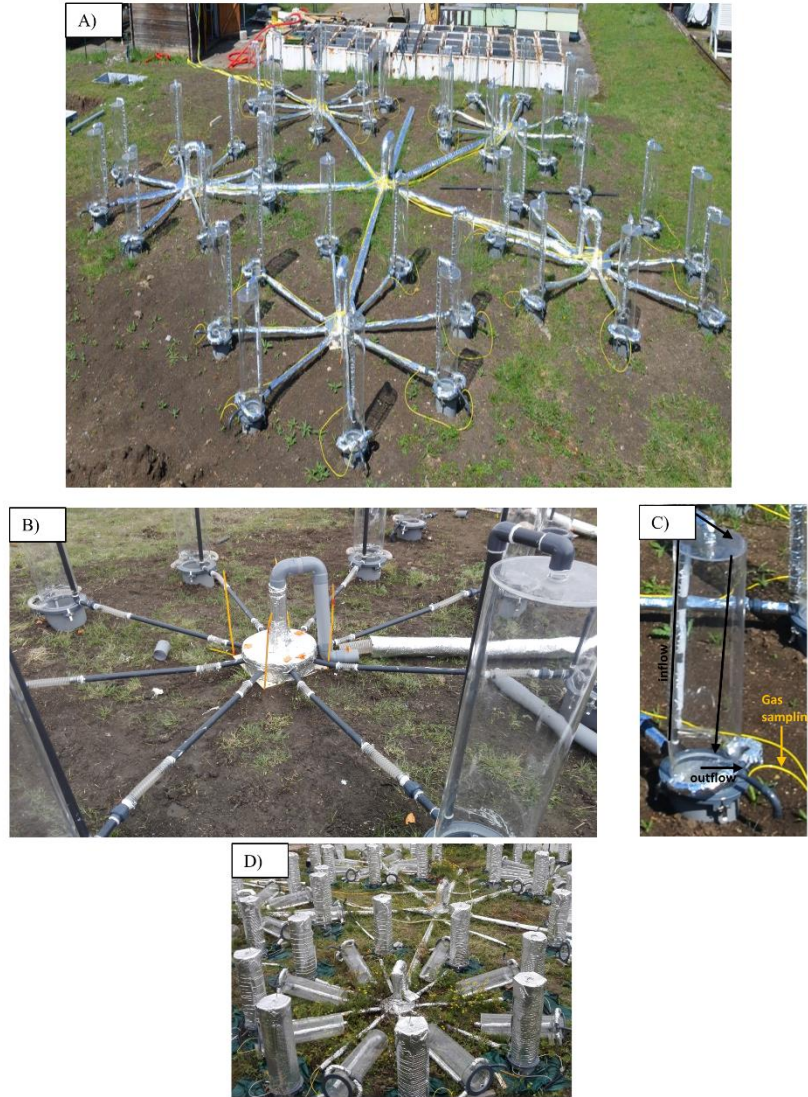


Figure 2. 2 : Pictures of the experimental platform: (A) an overview of the entire platform; (B) a focus on an octopus built with PVC rigid and flexible tubes and joined to the transparent chamber of the mesocosm by a screw union ; (C) a focus on a mesocosm showing the air flow circulation system and the gas sampling for plant-soil CO₂ exchange analysis ; (D) an overview of the platform after transparent chambers were replaced by dark chambers for the RPE measurements.

2.3. Monitoring and management of environmental conditions

Soil moisture and temperature were continuously measured with sensors (two replicates per treatment) (Decagon ECH₂O 5TM ®, Pullman, USA) inserted at 15 cm depth (surface) and 60 cm depth (deep) and connected to a data logger (Campbell CR1000 ®, Utah, USA). Based on these measurements, an irrigation system equipped with ten independent electro-valves (one per treatment) was programmed to maintain soil moisture at about 60% of field capacity in surface of all mesocosms. Soil moisture variation was accepted as long as the soil water potential stayed between field capacity and -8×10^5 Pa. Therefore, the supply of water was adapted to each treatment depending on their drying rates in order to allow aerobic microbial activity and comparable moisture conditions between mesocosms (**C_RPE_3**).

Several specific measures were set up in order to limit temperature increase due to a greenhouse effect of the mesocosms (**Sup. Mat. 1.2**), (**C_RPE_3**, **GC**). To quantify the potential greenhouse effect, the air temperature inside five randomly selected mesocosms (one per octopus) was recorded at 2-min intervals with sensors (Pt 100 SI 1108, Thermo Est, Maizières-Les-Metz, France). The ambient air temperature, photosynthetic active radiation (PAR) and atmospheric pressure were continuously recorded by the meteorological station '0874-eco-env' located at 100 meters from our experimental platform. To check the potential greenhouse effect of the mesocosms, we calculated the difference of temperature between ambient and mesocosm air.

2.4. Continuous CO₂ -exchange measurements

Continuous CO₂-exchange was quantified by comparing the CO₂ concentration of the air entering and leaving the mesocosms (**C_FLUX _1**). The air entering the mesocosms was collected at two locations on the air pipes to capture both the ambient and elevated CO₂ concentrations, and was pumped to three analyzers (Licor LI-700 CO₂/H₂O, Lincoln, USA) (**Fig. 2.1**). One analyzer was dedicated to the elevated CO₂ treatments and the two others to

ambient CO₂ treatments. The air leaving the mesocosms was individually collected and continuously pumped to the multiplexer at a rate of approx. 1 L min⁻¹. The multiplexer sequentially injected the collected air in the dedicated analyzer at 2-min intervals for CO₂ analysis. After a flushing period of 30 secs, the electric signal delivered by the CO₂ analyzers was converted to CO₂ concentration and recorded on a computer (Schnyder et al., 2003; Madsen et al., 2010). For ambient CO₂, each analyzer monitored the CO₂-exchange of 16 mesocosms corresponding to a frequency of measurements of 2 hour⁻¹. For elevated CO₂, because only eight mesocosms were connected to the analyzer the frequency of measurements was 4.3 hour⁻¹.

Data recorded during platform interventions (maintenance, plant-soil incubations measurements, mesocosms aboveground part removal) were removed from the dataset. Differential CO₂ concentrations (dCO₂) were corrected with respect to the analyzers drifts between two calibrations. The analyzer drift was considered linear over time.

The net ecosystem productivity (NEP) was calculated as follows. First, dCO₂ (ppm) is transformed in a flux of CO₂ (F_{CO₂}, m³ min⁻¹) using the airflow crossing the mesocosm (F_{air}, m³):

$$F_{CO_2}(m^3) = F_{air} \times dCO_2 \quad (1)$$

This flux of CO₂ expressed in m³ min⁻¹ is converted in mole mn⁻¹ F_{CO₂}(mole) using the ideal gas equation:

$$F_{CO_2}(mole) = (P \times F_{CO_2}(m^3)) / (R \times T) \quad (2)$$

R is a gas constant (8.314 J·K⁻¹·mol⁻¹) and P (Pa) and T (°K) the pressure and temperature of mesocosm air, respectively. It was assumed that P corresponded to the atmospheric pressure.

Finally, the net ecosystem productivity (NEP, g C min⁻¹ m⁻²) was obtained with the following equation:

$$NEP = F_{CO_2}(mole) \times 12 \times (1/0.049) \quad (3)$$

where 12 is the C molar mass and 0.049 the mesocosm surface in m². Daytime NEP (PAR > 0) and nighttime NEP (PAR = 0) were separated and will from now on be referred to as ‘net photosynthesis’ (gross primary production minus ecosystem respiration) and ‘night respiration’ respectively.

In order to distinguish the NEP into GPP and ER, the method of partitioning proposed by Reichstein et al. (2005) was adapted to address our dataset. This partitioning is based on the regression of nighttime respiration with temperature in order to estimate ER (daytime respiration and nighttime respiration) according to Lloyd and Taylor (1994) equations. These estimates permitted to calculate GPP using $NEP = GPP - RE$. The sign convention for NEP is positive for net CO₂ uptake and negative for the release of CO₂ by the plant-soil system.

2.5. Rhizosphere priming effect and dark respiration measurements

The RPE and dark respiration of the plant-soil system were measured bimonthly or monthly depending on plant activity, using an adapted version of the incubation method developed by Shahzad et al. (2012) (**C_RPE_2**). The evening before each plant-soil incubation, the air production system was stopped and ambient air was run through the system. The transparent chambers were replaced the next morning, by dark PVC chambers and left in place for an incubation of 24 hours (**Fig. 2.2D, Fig. S2**). The absence of light stopped the photosynthesis and prevented re-assimilation of soil-derived CO₂ by plants, thus permitting RPE estimation (**C_RPE_2**). Kuzyakov and Cheng (2001) showed that prolonged dark conditions decrease root activity and soil respiration only when the darkness exceeds two days.

At the beginning and after 24 hours of incubation, gas samples from each chamber were pumped and stored in an airtight glass bottle (120 mL) (**Fig. S2**) in order to quantify the accumulation of CO₂ corresponding to plant-soil respiration. The CO₂ concentration in gas sample was determined by gas chromatography (Gas Chromatograph Clarus 480, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The ¹³C isotopic composition of CO₂ was measured with a CRDS

Analyzer for Isotopic CO₂ (Picarro, Santa Clara, CA, USA) coupled to the small sample isotope module (SSIM). Preliminary dilutions of gas samples could be made to respect the Picarro specification for CO₂ range.

The change in CO₂ concentrations within 24 hours was transformed in quantity of C-CO₂ released by the plant-soil system by using the ideal gas equation and volume, temperature and pressure of chambers. The total released C-CO₂ corresponds to dark ecosystem respiration (R_t , g C d⁻¹ m⁻²). Using isotope mass balance equations, the soil-derived CO₂-C (R_s , g C d⁻¹ m⁻²) was separated from plant-derived CO₂-C (R_p , g C d⁻¹ m⁻²):

$$R_s + R_p = R_t \quad (4)$$

$$R_s \times A_s^{13} + R_p \times A_p^{13} = R_t \times A_t^{13} \quad (5)$$

where A_s^{13} is the ¹³C abundance of soil-derived carbon, A_p^{13} is the ¹³C abundance of plant C, A_t^{13} is the ¹³C abundance of total CO₂ released from the plant-soil system. We used the ¹³C abundance of aboveground plant biomass for A_p^{13} and the ¹³C abundance of soil organic carbon at the beginning of the experiment for A_s^{13} . To this end, plant biomass corresponding to the five harvests (see section 2.2) and initial soil were analyzed with an elemental analyzer (EA; Carlo Erba, Rodana, Italy) coupled to an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; Elementar, Langenselbold, Hesse, Germany), after material drying (60°C for 24h) and grinding.

Equations 4 and 5 were solved to calculate R_s as follows:

$$R_s = R_t \times (A_t^{13} - A_p^{13}) / (A_s^{13} - A_p^{13}) \quad (6)$$

The rhizosphere priming effect (RPE, g C d⁻¹ m⁻²) was calculated as:

$$RPE = R_s - R_{\text{control}} \quad (7)$$

where R_{control} is the CO₂ released by the unplanted control soil (g C d⁻¹ m⁻²).

2.6. Uncertainty of rhizosphere priming effect estimates

The accuracy of the partitioning of R_t into R_p and R_s depends on the accuracy of isotopic composition estimates of the CO₂ released from soil and plant. These estimates are generally

obtained by measuring the isotopic composition of plant material and soil organic matter. However, deviation in isotopic composition between these sources and the measured CO₂ might occur due to 1) isotopic fractionation during respiration and 2) contribution of the different plant- and soil chemical compounds with distinct isotopic composition, to the released CO₂ (Mary et al., 1992; Balesdent et al., 1993; Werth and Kuzyakov, 2010; Zhu and Cheng, 2011). According to these studies, isotopic composition deviation rarely exceeds 1‰ delta ¹³C except in some cases where it can reach 2-3 ‰. In order to understand how such a deviation might affect the partitioning of R_p and R_s and thereby the calculation of RPE, we performed a sensitivity analysis. In this analysis, we quantified the effect of an amplitude of 1‰ change in delta ¹³C of either soil-derived or plant-derived CO₂ on the value of the RPE. Given that the deviation in delta ¹³C can be positive or negative, we tested a deviation of +0.5‰ and -0.5‰ in delta ¹³C values corresponding to the amplitude of 1‰. Simulations were done using data from one date of RPE measurements (2017-04-12) and for one treatment (grass in ambient CO₂). The change in RPE value induced by the isotopic deviation was calculated as $((RPE_{\text{new}} - RPE_{\text{initial}}) / RPE_{\text{initial}}) \times 100$ where RPE_{initial} and RPE_{new} are the values of RPE before and after the delta ¹³C change (+0.5‰ or -0.5‰). For each C source (plant or soil), we calculated an RPE uncertainty as the sum of the two RPE changes consecutive to +0.5‰ and -0.5‰.

The labeling intensity, i.e. the difference in delta ¹³C between plant-C and soil-C, most likely influences the uncertainty in RPE estimation because the weight of a 0.5‰ deviation in delta ¹³C (noise) is relative to the labeling intensity. Therefore, we performed our analysis of the sensitivity of the RPE to an amplitude of 1‰ deviations (+0.5‰ and -0.5‰) in delta ¹³C of soil-derived or plant-derived CO₂ for different fictive labeling intensities: 5‰, 7‰, 14‰, 40‰, 60‰, 80‰ and 100‰. For these simulations, we modified A_s¹³ or A_p¹³ in order to reach the targeted labeling intensities. Considering that the labeling intensity does not affect R_t and its

partitioning in R_s and R_p , we calculated a new value of A_t^{13} using Eq. 5. With the new values of A_s^{13} , A_p^{13} and A_t^{13} , we calculated RPE before and after the 0.5‰ delta ^{13}C deviations.

2.7. Linking rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of the plant-soil systems

Different methods, which did not take place at the same time, were used for the plant-soil incubations (RPE, dark respiration) and CO₂ exchange measurements (NEP, GPP and ER). During plant-soil incubations, CO₂ exchange was not recorded for two days corresponding to the 24-hour dark incubation plus the time of the manipulations. The comparison of RPE with CO₂ fluxes (NEP, GPP and ER) is, however, only valid if the two methods give comparable results. To check this, we compared the dark respiration to the night respiration. For the comparison, we used the night respiration measured before the installation of dark chambers. The night respiration recorded at each time interval was integrated on the nighttime length and then expressed for 24 hours to be comparable with the dark respiration.

In order to provide a preliminary comparison of RPE to NEP, RE and GPP, two periods with contrasted plant-soil activities were chosen (from 2017-03-12 to 2017-03-14 and from 2017-04-09 to 2017-04-12). NEP, ER and GPP were integrated for 24 hours ($\text{g C d}^{-1} \text{m}^{-2}$). Values of RPE were given as absolute values ($\text{g C d}^{-1} \text{m}^{-2}$), and in % of unplanted soil respiration, NEP, GPP and ER.

2.8. Data analysis

The C flux partitioning (GPP and ER estimates) was implemented by building an algorithm adapted from the R code available at github.com/bgctw/REddyProc dedicated to eddy covariance CO₂ data analysis. The algorithm was mainly modified in order to address the higher time resolution of our measurements than these of the eddy covariance method (half-hourly). Statistical analysis were done using a significance level of $*P < 0.05$. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used on plant ^{13}C isotopic composition to test for an effect of time and treatments. The deviation of soil moisture from the fixed optimum (60% of field capacity) and

difference of soil moisture between planted and unplanted treatments were tested using a non-parametric compliance test (Wilcoxon Mann Whitney). The same procedure was applied to soil temperature. The effect of soil temperature and moisture on unplanted soil respiration was investigated using a linear mixed model (R, package nlme, **Sup. Mat. 2.1**). Comparison of monthly temperatures (Wilcoxon Mann Whitney) between ambient and mesocosm air was made to test for a greenhouse effect. A one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted to test significant differences in distributed airflow between the octopuses. The relationships between night respiration (CO₂ exchanges) and dark respiration (plant-soil incubation), and between net photosynthesis and PAR were assessed by simple linear regression. The effect of time and treatment on NEP, GPP, RE and their contribution to RPE was analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA). Normality of the residuals and homogeneity of variance were respected for plant isotopic ¹³C composition, airflow, NEP, GPP, RE and RPE data. For temperature and moisture data, these assumptions were not met and non-parametric Wilcoxon Mann Whitney tests were applied. All data cleaning and calculations were performed with R software (R Core Team, 2013, R version 3. 4. 3).

3. Results

3.1. Environmental conditions

Chamber air temperature was significantly different from ambient air temperature (*P < 0.05, **Table S2**). An overall cooling of $-0.67 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$ was observed in the chambers compared to ambient air (daytime and nighttime pooled). When the data were separated for daytime and nighttime, we observed a warming of $0.47 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$ and a cooling of $-2.24 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$, respectively (**Table S2**).

Volumetric soil moisture was not significantly different from the optimum for plant growth (at 28%; 60% of field capacity) in any of the treatments, with a treatment average of $28.05 \pm 0.90\%$ (*P < 0.05, **Table S3**). Moreover, soil water potential was within the selected deviation

range of the field capacity at -8×10^5 Pa (**Fig. S3A**). The soil moisture was lower and the soil temperature was higher in unplanted compared to planted treatments ($*P < 0.05$, **Table S3**). The differences were 2.2% for soil moisture and 0.74°C for soil temperature. The difference in soil temperature between unplanted and planted soil was maximum in summer (**Fig. S3B**).

During incubations of plant-soil systems, differences in soil temperature and moisture remained significant (data not shown). A statistical analysis of unplanted soil respiration showed that respiration was significantly affected by soil temperature but not soil moisture (**Sup. Mat. 2.1**).

3.2. Plant ^{13}C labeling and stability over time

Plant isotopic composition varied from -55.30‰ to -48.63‰ depending on species and was highly different to the isotopic composition of native soil organic carbon (SOC) (at $-26.82 \pm 0.13\text{‰}$) ($*P < 0.05$, **Fig. 2.3A**). Moreover, the isotopic composition of plants did not significantly vary with time in any of the treatments, except for one treatment (grass under elevated CO_2) which showed a small increase in delta ^{13}C , from $-55.30 \pm 0.92\text{‰}$ to $-54.16 \pm 0.33\text{‰}$ ($*P < 0.05$, **Fig. 2.3A**).

Plant species and CO_2 treatments (ambient *versus* elevated) had a significant effect on plant isotopic composition ($*P < 0.05$, **Fig. 2.3A**). Specifically, the delta ^{13}C of grass was lower than of the legume, and the elevated CO_2 induced an overall decrease of plant delta ^{13}C compared to ambient CO_2 (grass C^+ : $-54.82 \pm 0.22\text{‰}$ *versus* grass C^- : $-52.63 \pm 0.16\text{‰}$; legumes C^+ : $-51.25 \pm 0.14\text{‰}$ *versus* legumes C^- : $-49.99 \pm 0.18\text{‰}$).

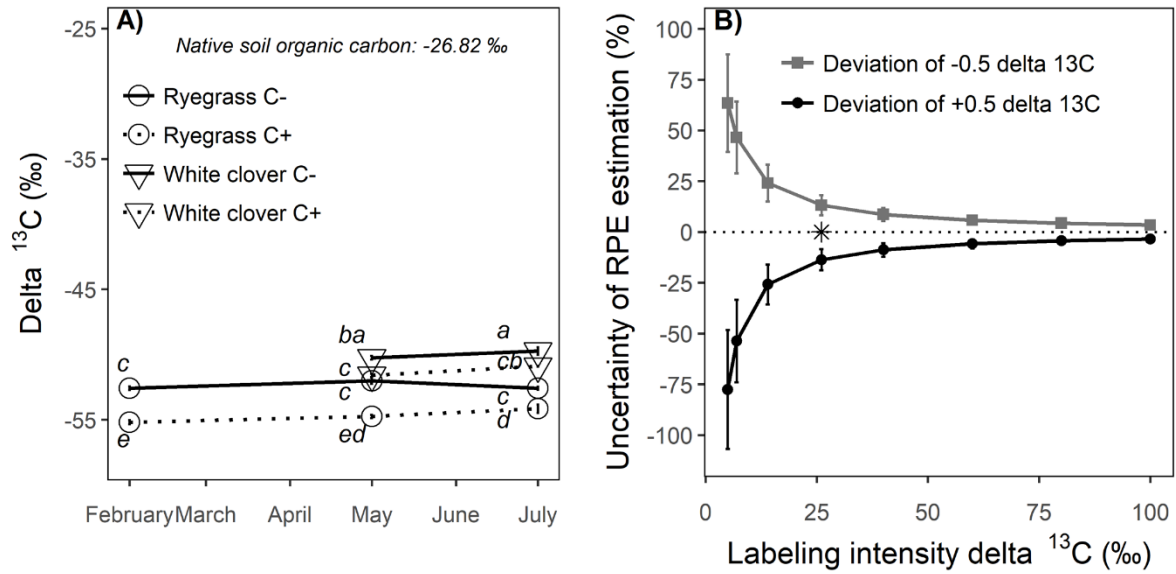


Figure 2. 3 : (A) Aboveground plant $\delta^{13}\text{C}$ signature over time (February 2017- July 2017) of ryegrass and white clover grown under elevated or ambient CO_2 and initial $\delta^{13}\text{C}$ signature of soil organic carbon, $n = 4$. The February time point combine the aboveground plant material from three cuts due to low dry matter harvested (November 2016, December 2016, and February 2017). Letters indicate significant differences between treatments at each time point (two-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, $*P < 0.05$) ; (B) Uncertainty of rhizosphere priming effect (RPE) estimation related to 1‰ change (+0.5‰ and -0.5‰) in $\delta^{13}\text{C}$ of plant-derived CO_2 at multiple labeling intensity. The change of RPE value induced by the isotopic deviation was calculated as $((\text{RPE}_{\text{new}} - \text{RPE}_{\text{initial}}) / \text{RPE}_{\text{initial}})$ where $\text{RPE}_{\text{initial}}$ and RPE_{new} are the values of RPE before and after the $\delta^{13}\text{C}$ change (+0.5‰ or -0.5‰). The uncertainty of RPE estimate corresponded to the addition of two RPE changes consecutive to +0.5‰ and -0.5‰. The labelling intensity is the difference in $\delta^{13}\text{C}$ between labelled plant material and soil organic C. Uncertainty analysis was made on results from the treatment "grass monoculture (ryegrass) under ambient CO_2 concentration" measured the 12th April 2017. The asterisk represents the labeling intensity obtained in this experiment (26 ‰). The uncertainties of RPE

estimation for the labeling intensities 5‰, 7‰, 14‰, 40‰, 60‰, 80‰ and 100‰ were obtained by modeling (see Methods).

3.3. Airflow and plant-soil CO₂ exchange

The air distribution into mesocosms did not significantly differ between the five octopuses (air distribution system) at the beginning and throughout the experimentation (**Fig. S4**). Moreover, the coefficients of variation of airflow distributed by the octopuses are low and not significantly different (3.87 % to 5.21%, *P > 0.05). The airflow was stable over time except if an electric cut happened or a modification was made to adjust airflow to seasonal change of plant photosynthetic activity. The airflow was maintained at about 45 L min⁻¹ mesocosm⁻¹ (1 air renewal min⁻¹; **Fig. 2.4A**).

Continuous CO₂ exchange measurements were able to detect small changes of net ecosystem productivity (NEP) in response to light in planted soils (**Fig. S5**). NEP showed the classical diurnal cycles with negative values during the night (night respiration) and positive values during the day (Net photosynthesis, **Fig. 2.4B**). It is interesting to note that unplanted soil also displayed small but detectable diurnal cycles of NEP.

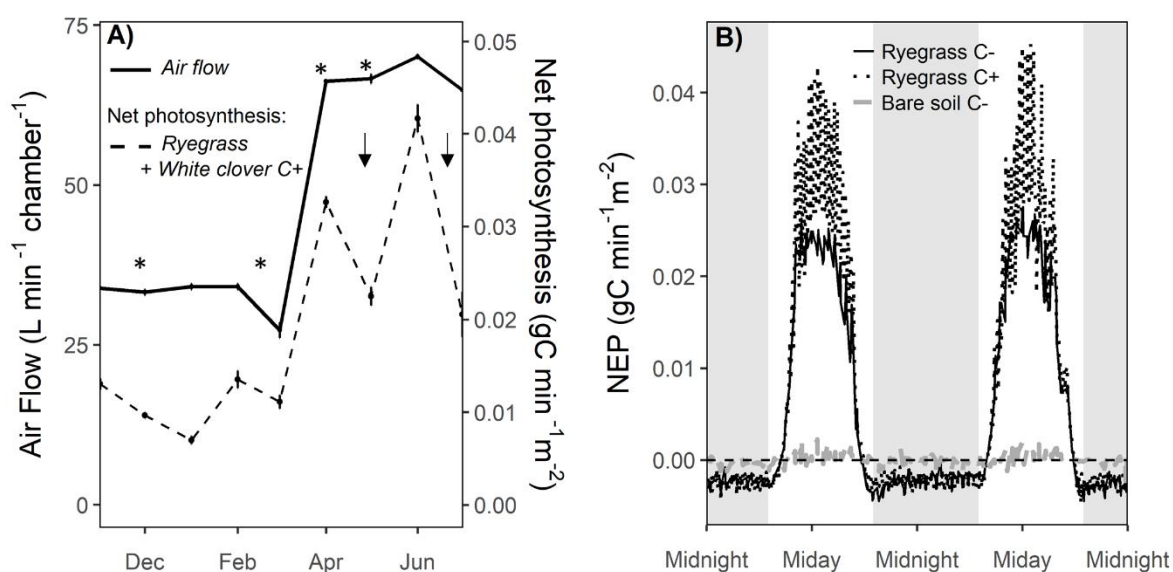


Figure 2. 4: (A) Airflow and net photosynthesis over time (November 2016- July 2017) for one planted treatments: intercrop of ryegrass and white clover under elevated CO₂, n = 4. Black arrows depict partial removal of the aboveground plant material and stars indicate an adjustment of the airflow; (B) Net ecosystem productivity (NEP) over two days in February 2017 (2017-02-18 and 2017-02-19) for three treatments: ryegrass under ambient and elevated CO₂, and unplanted soil. Grey shading indicates nighttime (photosynthetic active radiation (PAR = 0)) and white indicates daytime (PAR > 0).

3.4. Estimate of rhizosphere priming effect, gross primary production and ecosystem respiration

Plants significantly increased the release of unlabeled CO₂ compared to unplanted soil for the two measurement dates, that is, induced a positive RPE (**Table 2.1**). The RPE amounted for 0.09 to 0.41 g C m⁻² d⁻¹, which corresponded to 50% to 149% of unplanted soil respiration depending on treatments and measurement time. The RPE significantly increased from March

to April, and the elevated CO₂ had a significant positive effect on RPE only in March (**Table 2.1**).

The GPP did not significantly respond to the CO₂ treatment whereas it increased by a factor of 3.5 from March to April (10.25 and 35.4 g C m⁻² d⁻¹, respectively) (**Table 2.1**). The ER amounted to 3.5 to 7.1 g C m² d⁻¹ and slightly increased from March to April. The elevated CO₂ had a significant positive effect on ER only in March (**Table 2.1**). The GPP was on average between 2.3 and 5.5 times higher than ER in March and April, respectively, indicating that plant-soil systems induced a net fixation of CO₂ (positive NEP value).

Dark respiration (plant-soil incubation) and night respiration (CO₂ exchanges) were strongly correlated ($R^2 = 0.67$) (**Fig. 2.5**). However, small deviations between results of the two methods were observed for the smallest respiration values. Overall, this correlation indicated that these two methods provide comparable results making a comparison between RPE and plant-soil CO₂ fluxes possible. Overall, the RPE represented 1.22% of GPP and this percentage did not vary significantly among dates and treatments, except for grass under elevated CO₂, which showed a significantly higher value for one date (1.66%). The contribution of RPE to ER significantly increased from 2.8% in March to 6.5% in April.

3.5. Sensitivity analysis of the rhizosphere priming effect

The sensitivity analysis made on the experimental data showed that the uncertainty of RPE estimates is higher when the isotopic deviation of delta ¹³C concerned the plant-derived CO₂ rather than the soil-derived CO₂. The -0.5 ‰ and +0.5 ‰ deviations in delta ¹³C of plant-derived CO₂ respectively led to 13.1% and -13.7% change in RPE value corresponding to a total uncertainty of 26.8%. In contrast, the -0.5 ‰ and +0.5 ‰ deviations in delta ¹³C of soil-derived CO₂ respectively led to 3.37% and -3.25% change in RPE value corresponding to a total uncertainty of 6.6%. (**Fig. 3B** and **Fig. S5**). These results also showed that the sign of the

isotopic deviation (+0.5 or -0.5 ‰) affected the direction and magnitude of the RPE value change.

The different fictive labeling intensities showed that the uncertainty of RPE rapidly decreased with labeling intensity until 40‰ (**Fig. 3B**, RPE uncertainty decreased from 141 to 17.4% in average when labeling intensities increased from 5‰ to 40‰). Beyond this limit, an increase in labeling intensity only slowly decreased the RPE uncertainty, with in average 0.17% uncertainty decrease per 1‰ increase in labeling intensity. Estimation of the RPE with an uncertainty lower than 10% of the estimated value requires a labeling intensity higher than 60‰.

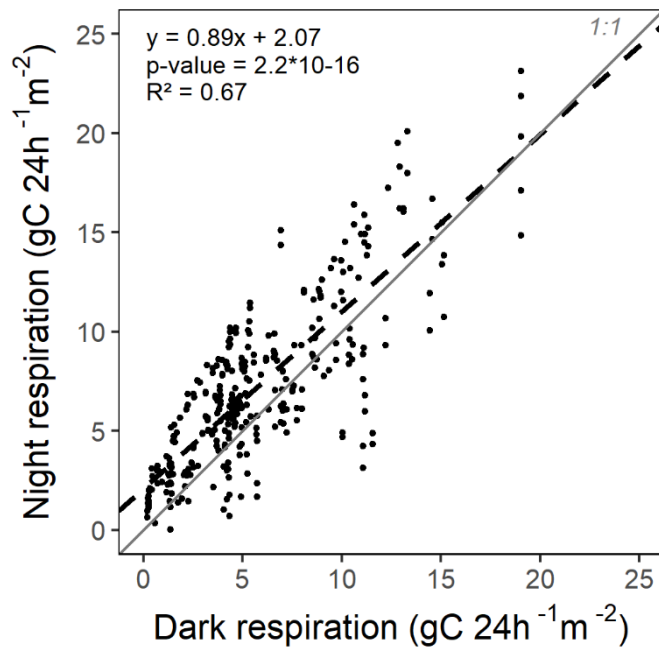


Figure 2. 5: Relationship between night respiration estimated by continuous CO_2 exchange measurements and dark respiration estimated by regular ecosystem incubation for the study period (November 2016 - July 2017), $N = 320$. The dataset corresponds to measurements made during six periods of 36 hours on the 40 mesocosms. The night and dark respirations were made with a time lag of two days. Dashed line represents the simple linear regression between night and dark respiration. Black line represents the regression line $y=x$.

Table 2. 1 : Quantification of net ecosystem productivity (NEP), gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER), rhizosphere priming effect (RPE) and the relative contribution of RPE to NEP, GPP and ER during two measurement periods across two treatments: ryegrass under ambient and elevated CO₂, n=4. SOM stands for soil organic matter. Mean values are coupled with standard error (SE). Letters indicate significant differences between treatments and periods (two-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, *P < 0.05).

Periods	Treatments	CO ₂ fluxes of the plant-soil system								RPE relative to CO ₂ fluxes															
		NEP		GPP		ER		RPE				% of NEP		% of GPP		% of ER									
		gC 24h ⁻¹ m ⁻²		gC 24h ⁻¹ m ⁻²		gC 24h ⁻¹ m ⁻²		gC 24h ⁻¹ m ⁻²		% of unplanted soil															
		mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE								
2017-03-15	GN-C-	b	6.9	0.3	b	10.4	0.44	c	3.5	0.2	c	0.09	0.01	c	50.25	5.79	b	1.38	0.22	b	0.92	0.14	b	2.72	0.44
	GN-C+	c	4.2	0.6	b	10.1	1.00	b	5.9	0.5	b	0.16	0.01	b	87.75	7.52	a	4.15	0.45	a	1.66	0.10	b	2.82	0.13
2017-04-12	GN-C-	a	29.2	1.5	a	35.3	1.26	a	6.1	0.8	a	0.40	0.05	a	147.3	18.64	b	1.37	0.16	b	1.14	0.13	a	7.24	1.78
	GN-C+	a	28.4	0.3	a	35.5	0.53	a	7.1	0.3	a	0.41	0.03	a	148.8	11.91	b	1.43	0.12	b	1.15	0.10	a	5.76	0.65

4. Discussion

4.1. The contribution of RPE to plant-soil CO₂ balance can be quantified with the presented platform

The close positive correlation found between dark respiration (plant-soil incubation) and night respiration (CO₂ exchanges) suggests that these two independent methods provide reliable and comparable results (**Fig. 2.5**). These findings also mean that estimates of RPE and NEP, GPP, RE measured by these two methods can be linked. Our preliminary results obtained on two-measurement dates show that RPE could represent 1.2% of GPP and between 2.8 and 6.5% of ER. The absolute values of RPE and GPP seem to evolve similarly with time (**Table 2.1**) emphasizing the role of photosynthetic activity and associated rhizodepositions on the RPE (Kuzyakov and Cheng, 2001; Kuzyakov, 2002; Shahzad et al., 2015; Huo et al., 2017). As far as we are aware, no other experimental study has produced similar ratios of RPE/NEP, RPE/GPP and RPE/ER for comparisons. Nevertheless, our estimates of RPE expressed as a % of unplanted soil respiration can be compared to numerous previously-published studies on RPE. Our estimates varying between 50 and 150% fall in the range of values provided by the meta-analysis of Huo et al. (2017) for 7-8 months after planting. Collectively, our findings show that the technology developed on the present platform could help to scale up the study of the RPE control on C cycling to the ecosystem level.

4.2. Uncertainty of RPE estimates due to possible deviation in ¹³C composition between C source and CO₂

Considering an amplitude of 1‰ delta ¹³C deviation between C source and CO₂, we quantified that the uncertainty of our RPE estimates reach up to 26.8% of the mean value when the deviation concerns the plant C. The higher sensitivity of RPE estimates to the deviation of delta ¹³C of plant rather soil C can be explained by the higher contribution of plant C to the total CO₂ emissions (82% of the total in the studied example). These findings indicate that a special

attention has to be paid to plant processes leading to isotopic ^{13}C deviation (heterogeneous ^{13}C distribution in plant compartments, isotope fractionation during plant respiration) when quantifying the RPE. Moreover, we recommend to measure regularly the ^{13}C isotopic composition of the plant material and CO_2 released by plants, and to estimate the related RPE uncertainty.

Our results also show the strong nonlinear dependence of RPE uncertainty to labeling intensity (the difference in $\delta^{13}\text{C}$ between plant-C and soil-C). A quantification of the RPE with an uncertainty lower than 10% requires a labeling intensity higher than 60‰ (**Fig. 2.3B**). To our knowledge, all published studies show lower labeling intensity with values varying from 14‰ to 30.5‰ (Cheng and Dijkstra, 2007; Shahzad et al., 2012; Pausch et al., 2013; Carrillo et al., 2014; Zhu et al., 2014). Considering the lowest values of labeling intensity (14‰), the uncertainty can be very high exceeding 50% of the estimated RPE (**Fig. 2.3B**). In line with our findings, Dijkstra et al. (2010) calculated an RPE uncertainty of up to 40% for a 1‰ deviation in $\delta^{13}\text{C}$ of plant derived- CO_2 . Therefore, the results provided in RPE studies must be analyzed with caution, through careful consideration of the possible $\delta^{13}\text{C}$ deviation between C source and CO_2 , a deviation that might be affected by treatments (e.g. plant species, CO_2 concentration). Our findings also underline the importance of developing new technologies to increase the plant labeling and thereby reduce uncertainty in RPE estimates.

In this study, the plant isotopic composition varied between species (2.5‰ to 4.4‰; **Fig. 2.3A**), which may be due to different ^{13}C isotopic fractionation during photosynthesis and contrasting ecophysiological functioning across species (Marshall et al., 2007). This difference between species is likely to complicate the calculation of the $\delta^{13}\text{C}$ of the plant derived- CO_2 in crop mixtures because the relative contribution of each species to the whole plants respiration (i.e. exudation) is not known. Dijkstra et al. (2010) and Pausch et al. (2013) overcame this problem by calculating plant $\delta^{13}\text{C}$ based on the root proportion of each species harvested

at the end of the experiment, under the assumption that this proportion remained constant during the experiment. Given the difference in plant $\delta^{13}\text{C}$ observed in this study and in the studies of Dijkstra et al. (2010) and Pausch et al. (2013) (2.4‰ to 14‰ difference among species), the uncertainty of RPE estimates related to the estimation of a global plant isotopic composition could be especially important in plant species mixtures.

4.3. Air decarbonation coupled to injection of customizable-labeled CO_2 : an efficient but costly method of plant labeling

The technology of plant labeling based on the generation of CO_2 -free air with molecular sieves and subsequent injection of customizable labeled CO_2 allows stable plant labeling over time (**Fig. 2.3A**) (**C_RPE_1**). Moreover, the platform supplied with CO_2 from fossil fuel origin allowed us to reach a labeling intensity between 21.8 and 28.5‰ depending on plant species and CO_2 level (**Fig. 2.3A**). These labeling intensities are in line with previous results using a similar technology (28.4‰ and 30.5‰; Shahzad et al. 2012). Globally, the capacity of air production ($4\text{m}^3\text{min}^{-1}$) and labeling intensity offered by the here presented technology (air decarbonation + injection of CO_2 from fossil origin) are relatively strong compared to other systems (reaching a labeling intensity between 14‰ and 23‰; Cheng and Dijkstra, 2007; Pausch et al., 2013; Carrillo et al., 2014; Zhu et al., 2014). The main drawback of this technology is the running cost (at $\sim 36,000 \text{ € year}^{-1}$; details in **Sup. Mat. 1.3**).

4.4. Air distribution: a simple and efficient system

The regulator of pressure in the air tank combined to a valve was efficient to deliver a constant airflow to the air distribution system (**Fig. 2.4A**). Moreover, the “octopus-shaped” system distributed air homogeneously among mesocosms (**Fig. S3**). Hence, this relatively simple system of air distribution guaranteed: 1) a limited difference in temperature between mesocosms (**C_RPE_3**) (**Fig. S2B**), and 2) accurate estimates of airflow across the mesocosms. This accurate estimation is essential for quantifying CO_2 exchange of the plant-soil systems

(C_FLUX_2) (Fig 2.4A). The system of air distribution avoids using a complex network of sensors for continuous airflow measurement in each mesocosm.

4.5. Combining continuous measurements of CO₂ exchange and plant labeling requires a close surveillance of CO₂ concentrations in mesocosms

Continuous measurements of CO₂ exchange based on the difference between CO₂ entering and leaving the mesocosm allowed the detection of daily variation in NEP, as well as calculations of GPP and ER (C_FLUX_1) (Fig. 2.4B). Previous studies have showed diurnal patterns of NEP values in the same order of magnitude (Frank et al., 2006; Pumpanen et al., 2003). Our system of CO₂ exchange measurements was sensitive enough to detect the fixation of a small quantity of CO₂ in unplanted soil linked to the development of algae (Fig. 2.4B). However, this performance depends on an adjustment of airflow to the plants' photosynthetic activity and a close surveillance of CO₂ concentration in mesocosms. The adjustment of airflow is constrained by a trade-off between (1) minimizing airflow in order to detect a change in CO₂ concentration due to photosynthesis or respiration (C_FLUX_1) and (2) maximizing airflow in order to limit greenhouse effects (GC) and the depletion of CO₂ concentrations in mesocosms. The depletion of CO₂ concentration may alter the quality of plant labeling by modifying the ¹³C isotopic fractionation during photosynthesis (C_RPE_1) (Park and Epstein, 1960).

4.6. The multiple measures to control the environmental conditions partly met their technical challenges

The multiple measures (listed in the subsection 2.3 Monitoring and management of environmental conditions) set up to limit greenhouse effects in the mesocosms were efficient since we observed a slight overall cooling of 0.67 °C of mesocosm air compared to ambient air. Moreover, the experimental platform allows the cultivation of plants under natural light on a larger soil surface than before (Shahzad et al., 2012; Zhu and Cheng, 2012; Carrillo et al., 2014; Pausch et al., 2016) and with an entirely-reconstituted soil column. Therefore, estimates of RPE

and its contribution to plant-soil CO₂ fluxes were obtained in semi-natural environmental conditions (**GC**).

Several measures were set up to limit the difference in soil temperature and moisture between planted and unplanted treatments. The soil moisture was maintained within the fixed range of soil water potential between field capacity and -8×10^5 Pa and in average close to the optimal conditions for aerobic microbial activity. Small differences in soil moisture were observed between planted and unplanted treatments, but soil moisture was not a limiting factor for soil respiration (**Sup. Mat. 2.1**). In contrast, the warming observed in unplanted compared to planted treatments (+0.74 °C on average) could increase unplanted soil respiration since temperature had a significant positive effect on soil respiration (**Sup. Mat. 2.1**). Given that RPE is calculated as the difference in SOC-derived respiration between planted and unplanted soil (Eq. 7), the RPE could be underestimated. In order to quantify this underestimation, we re-analyzed the data corresponding to the measurement of April 2017 (**Table 2.1**). Using an Arrhenius equation (**Sup. Mat. 2.2**), the unplanted soil respiration was corrected to fit with the temperature of planted treatments. This temperature-normalized respiration was then used to calculate a new RPE. Results showed that the unplanted soil warming increased soil respiration by 16.2 - 21.2% and decreased RPE estimates by 11.7 - 14.6% depending on treatments (**Sup. Mat. 2.3**). Consequently, we recommend for a precise estimation of RPE to correct the respiration data with soil temperature.

4.7. Further improvements

The coupling of RPE measurements with CO₂ flux measurements was made with a time lag of two days. During these two days, the GPP might have changed due to meteorological fluctuations modifying root exudations, plant-soil respiration and RPE. Indeed, GPP responds to light intensity in seconds and the reduction of plant-soil respiration and RPE following a reduction of photosynthesis can occur within 24 hours (Shahzad et al., 2012). Overall, the effect

of the time lag on our results is likely limited since the dark and night respirations measured with the two interval days were well correlated (**Fig. 2.5**). Nevertheless, a simultaneous measurement of RPE and CO₂ fluxes can lead to more accurate estimates. Moreover, the measurement of RPE was time-consuming due to replacement of chambers, gas sampling and analysis. This time-constraint strongly limited the frequency of the RPE measurements (bi-monthly to monthly). All these limits could be levered if the RPE is daily measured by using 1) the nighttime to stop photosynthesis and 2) an isotopic analyzer coupled to the differential CO₂ concentration analyzers in order to analyze the CO₂ concentration and delta ¹³C of air across mesocosms. To improve RPE estimates, the unplanted soil should be covered to protect soil from sunbeams preventing soil warming and algae development.

Despite the technology set up to ensure a high labeling intensity, the uncertainty of RPE estimates remains elevated (26.8%) due to the source of ¹³CO₂ used (fossil fuel origin). Depending on studied factors and expected effect on RPE, the accuracy of the RPE estimates must be improved by reaching higher plant labeling intensities. The combustion of methane might be an interesting source of ¹³C labeled CO₂ since there are numerous sources of methane with delta ¹³C varying between -55 to -70‰ corresponding to a labeling intensity of 47 to 62‰ (Sakata et al., 1997; Lopez et al., 2017). Finally, future studies could use **Fig. 2.3B** to perform an *a priori* power analysis on planned experiments to determine the intensity of isotopic labeling necessary to accurately address specific research questions.

Acknowledgment

The study has been funded by the l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, Projet Basil) and Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, Call BioDiversa, Basil). We thank R. Falcimagne, D. Colosse, A. Salcedo, V. Guillot, E. Viallard, P. Pichon and S. Revaillet for technical help with the setup of the experimental platform.

Declaration of interest

None.

Author contribution

The experiment was designed by CC, SF, GA and FK. The setup of the experimental platform was done by CC, SF, GA and RF. CC and GA performed analysis. CC, SF, GA and FK worked together on the paper's skeleton. CC and SF wrote the initial draft, all the authors contributed to improve the manuscript.

References

- Baldocchi, D.D., Hincks, B.B., Meyers, T.P., 1998. Measuring biosphere-atmosphere exchanges of biologically related gases with micrometeorological methods. *Ecology* 69, 1331–1340. doi:10.2307/1941631
- Balesdent, J., Girardin, C., Mariotti, A., 1993. Site-related $\delta^{13}\text{C}$ of tree leaves and soil organic matter in a temperate forest. *Ecology* 74, 1713–1721. doi:10.2307/1939930
- Carrillo, Y., Dijkstra, F.A., Pendall, E., LeCain, D., Tucker, C., 2014. Plant rhizosphere influence on microbial C metabolism: the role of elevated CO₂, N availability and root stoichiometry. *Biogeochemistry* 117, 229–240. doi:10.1007/s10533-014-9954-5
- Chen, J., Luo, Y., Xia, J., Jiang, L., Zhou, X., Lu, M., Liang, J., Shi, Z., Shelton, S., Cao, J., 2015. Stronger warming effects on microbial abundances in colder regions. *Scientific Reports* 5, 18032. doi:10.1038/srep18032
- Cheng, W., 1996. Measurement of rhizosphere respiration and organic matter decomposition using natural ^{13}C . *Plant and Soil* 183, 263–268. doi:10.1007/BF00011441
- Cheng, W., Dijkstra, F.A., 2007. Theoretical proof and empirical confirmation of a continuous labeling method using naturally ^{13}C -depleted carbon dioxide. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 401–407. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00387.x
- Cheng, W., Johnson, D.W., Fu, S., 2003. Rhizosphere effects on decomposition: controls of plant species, phenology, and fertilization. *Soil Science Society of America Journal* 67, 10.

Cheng, W., Parton, W.J., Gonzalez-Meler, M.A., Phillips, R., Asao, S., McNickle, G.G., Brzostek, E., Jastrow, J.D., 2014. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. *New Phytologist* 201, 31–44. doi:10.1111/nph.12440

Ciais, P., Bala, S., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, R., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le quéré, C., Myneri, R., Piao, S., Thornton, P., 2013. Carbon and other biogeochemical cycles., in: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Dijkstra, F., Cheng, W., Johnson, D., 2006. Plant biomass influences rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition in two differently managed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2519–2526. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.020

Dijkstra, F.A., Cheng, W., 2007. Interactions between soil and tree roots accelerate long-term soil carbon decomposition. *Ecology Letters* 10, 1046–1053. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01095.x

Dijkstra, F.A., Morgan, J.A., Blumenthal, D., Follett, R.F., 2010. Water limitation and plant inter-specific competition reduce rhizosphere-induced C decomposition and plant N uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1073–1082. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.026

Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280. doi:10.1038/nature06275

Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8

Frank, A.B., Liebig, M.A., Tanaka, D.L., 2006. Management effects on soil CO₂ efflux in northern semiarid grassland and cropland. *Soil and Tillage Research* 89, 78–85. doi:10.1016/j.still.2005.06.009

Heimann, M., Reichstein, M., 2008. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* 451, 289–292. doi:10.1038/nature06591

Huo, C., Luo, Y., Cheng, W., 2017. Rhizosphere priming effect: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 78–84. doi:10.1016/j.soilbio.2017.04.003

Jensen, B., 1993. Rhizodeposition by ¹⁴CO₂-pulse-labelled spring barley grown in small field plots on sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1553–1559. doi:10.1016/0038-0717(93)90010-9

Keith, H., Oades, J.M., Martin, J.K., 1986. Input of carbon to soil from wheat plants. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 445–449. doi:10.1016/0038-0717(86)90051-9

Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396. doi:https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<382::AID-JPLN382>3.0.CO;2-#

Kuzyakov, Y., 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 425–448. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.020

Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. doi:10.1016/S0038-0717(01)00117-1

Kuzyakov, Y.V., 2001. Tracer studies of carbon translocation by plants from the atmosphere into the soil (a review). *Eurasian Soil Science* 34, 28–42.

Lal, R., 2016. Beyond COP 21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71, 20A-25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A

Liljeroth, E., Kuikman, P., Veen, J.A.V., 1994. Carbon translocation to the rhizosphere of maize and wheat and influence on the turnover of native soil organic matter at different soil nitrogen levels. *Plant and Soil* 161, 233–240. doi:10.1007/BF00046394

Lloyd, J., Taylor, J.A., 1994. On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* 8, 315–323. doi:10.2307/2389824

Lopez, M., Sherwood, O.A., Dlugokencky, E.J., Kessler, R., Giroux, L., Worthy, D.E.J., 2017. Isotopic signatures of anthropogenic CH₄ sources in Alberta, Canada. *Atmospheric Environment* 164, 280–288. doi:10.1016/j.atmosenv.2017.06.021

Luyssaert, S., Reichstein, M., Schulze, E.-D., Janssens, I.A., Law, B.E., Papale, D., Dragoni, D., Goulden, M.L., Granier, A., Kutsch, W.L., Linder, S., Matteucci, G., Moors, E., Munger,

J.W., Pilegaard, K., Saunders, M., Falge, E.M., 2009. Toward a consistency cross-check of eddy covariance flux-based and biometric estimates of ecosystem carbon balance: Consistency cross-check for CO₂ balance. *Global Biogeochemical Cycles* 23, n/a-n/a. doi:10.1029/2008GB003377

Madsen, R., Xu, L., Mcdermitt, D., 2010. Considerations for making chamber-based soil CO₂ flux measurements. Presented at the 19th world congress of soil science, soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia, p. 5.

Marshall, J.D., Brooks, J.R., Lajtha, K., 2007. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants, in: Michener, R., Lajtha, K. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 22–60. doi:10.1002/9780470691854.ch2

Mary, B., Mariotti, A., Morel, J.L., 1992. Use of ¹³C variations at natural abundance for studying the biodegradation of root mucilage, roots and glucose in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1065–1072. doi:10.1016/0038-0717(92)90037-X

Moinet, G.Y.K., Cieraad, E., Rogers, G.N.D., Hunt, J.E., Millard, P., Turnbull, M.H., Whitehead, D., 2016. Addition of nitrogen fertiliser increases net ecosystem carbon dioxide uptake and the loss of soil organic carbon in grassland growing in mesocosms. *Geoderma* 266, 75–83. doi:10.1016/j.geoderma.2015.12.004

Park, R., Epstein, S., 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 21, 110–126. doi:10.1016/S0016-7037(60)80006-3

Pausch, J., Loeppmann, S., Kühnel, A., Forbush, K., Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2016. Rhizosphere priming of barley with and without root hairs. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 74–82. doi:10.1016/j.soilbio.2016.05.009

Pausch, J., Zhu, B., Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2013. Plant inter-species effects on rhizosphere priming of soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 91–99. doi:10.1016/j.soilbio.2012.08.029

Peterson, B.J., Fry, B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 293–320.

Pumpanen, J., Hannu, I., PERÄMÄKi, M., Hari, P., 2003. Seasonal patterns of soil CO₂ efflux and soil air CO₂ concentration in a Scots pine forest: comparison of two chamber techniques. *Global Change Biology* 9, 371–382. doi:10.1046/j.1365-2486.2003.00588.x

R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

Reichstein, M., Falge, E., Baldocchi, D., Papale, D., Aubinet, M., Berbigier, P., Bernhofer, C., Buchmann, N., Gilmanov, T., Granier, A., Grünwald, T., Havránková, K., Ilvesniemi, H., Janous, D., Knohl, A., Laurila, T., Lohila, A., Loustau, D., Matteucci, G., Meyers, T., Miglietta, F., Ourcival, J.-M., Pumpanen, J., Rambal, S., Rotenberg, E., Sanz, M., Tenhunen, J., Seufert, G., Vaccari, F., Vesala, T., Yakir, D., Valentini, R., 2005. On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Global Change Biology* 11, 1424–1439. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.001002.x

Sakata, S., Sano, Y., Maekawa, T., Igari, S.-I., 1997. Hydrogen and carbon isotopic composition of methane as evidence for biogenic origin of natural gases from the Green Tuff Basin, Japan. *Organic Geochemistry* 26, 399–407. doi:10.1016/S0146-6380(97)00005-3

Schimel, J., Balser, T.C., Wallenstein, M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88, 1386–1394. doi:10.1890/06-0219

Schnyder, H., Schauffele, R., Lotscher, M., Gebbing, T., 2003. Disentangling CO₂ fluxes: direct measurements of mesocosm-scale natural abundance ¹³CO₂/¹²CO₂ gas exchange, ¹³C discrimination, and labelling of CO₂ exchange flux components in controlled environments. *Plant, Cell and Environment* 26, 1863–1874. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.01102.x

Shahzad, T., 2012. Role of plant rhizosphere across multiple species, grassland management and temperature on microbial communities and long term soil organic matter dynamics. Paris, AgroParisTech.

Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C., Fontaine, S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 146–155. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.023

Shahzad, T., Chenu, C., Repinçay, C., Mougin, C., Ollier, J.-L., Fontaine, S., 2012. Plant clipping decelerates the mineralization of recalcitrant soil organic matter under multiple grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 73–80. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.014

Werth, M., Kuzyakov, Y., 2010. ^{13}C fractionation at the root–microorganisms–soil interface: A review and outlook for partitioning studies. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1372–1384. doi:10.1016/j.soilbio.2010.04.009

Zhu, B., Cheng, W., 2011. ^{13}C isotope fractionation during rhizosphere respiration of C_3 and C_4 plants. *Plant and Soil* 342, 277–287. doi:10.1007/s11104-010-0691-9

Zhu, B., Cheng, W., 2012. Nodulated soybean enhances rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition more than non-nodulated soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 56–65. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.016

Zhu, B., Gutknecht, J.L.M., Herman, D.J., Keck, D.C., Firestone, M.K., Cheng, W., 2014. Rhizosphere priming effects on soil carbon and nitrogen mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 76, 183–192. doi:10.1016/j.soilbio.2014.04.033

Supplementary materials for “A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems”

Supplementary materials 1:

1- Description of the ‘octopus’ shape of the air distribution system

In order to ensure a homogeneous air distribution, different shape of air distribution systems were tested (‘line’, ‘tree’ and ‘octopus’). The ‘Line’ system resulted in heterogeneous air distribution with higher airflows at the extremities whereas the ‘tree’ systems required an amount of space that was not available (data not shown). The ‘octopus’ design resulted in a homogeneous distribution in a very restrained space (**Fig. 2.2A**). The octopus-shaped system consisted of a principal pipe bringing air in a first octopus, which distributed the air in five pipes (octopus ‘arm’) (**Fig. 2.2A, B**). Each of these five pipes supplied a secondary octopus redistributing the air in eight mesocosms (**Fig. 2.2AB**). Airflow arrived in the top of the chamber (Ø 32 mm) and left at the bottom of the chamber through two outputs (Ø 25 mm) (**Fig. 2.2C**). By directing the airflow thus, the plant shoots were exposed to freshly labeled CO₂, whereas the outlet at the bottom prevented the mixing of unlabeled soil CO₂ throughout the chamber. The whole air distribution system was built with PVC rigid and flexible tubes ensuring flexibility, needed when switching the chambers for the dark-respiration and RPE measurements (**Fig. 2.2B**). In order to ensure air-tightness, the pipes were adhesively joined except at one point close to the mesocosm where a PVC screw union was inserted to permit removal of the transparent chamber (**Fig. 2.2B**).

2- Description of the specific measures set up to limit greenhouse effect of the mesocosms

Specific measures listed below were set up in order to limit temperature increase due to a greenhouse effect of the mesocosms. By default, the air production system reduced the temperature of the produced air relative to atmospheric air (heat released during air compression was removed by a radiator and air expansion later in the process decreased the air temperature).

The air distribution system was buried or covered by reflective insulation material. The belowground part of the mesocosms was buried in the ground in order to use its temperature buffering capacity. A plant cover was established around the mesocosms and irrigated during summer in order to refresh the local environment by evapotranspiration.

3- The running cost of labeling system

This technology has a large air production capacity ($4 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$) compared to the ones based on CO_2 trapping with soda lime ($0.0554 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$) (Cheng and Dijkstra, 2007). The main drawback of this technology is probably its running costs estimated at $\sim 36,000 \text{ € year}^{-1}$, without taking into account salary costs for maintenance. The expenses were in order of importance: electricity (17,000 €) the maintenance of the system (8,100 €), molecular sieves (zeolithe, 6,500 €) and ^{13}C depleted CO_2 including the CO_2 and rental of bottles (4,400€). Therefore, the main expenses are related to the decarbonation of atmospheric air. We underline that these costs are also related to the number and size of mesocosms, which were exceptionally high in this study.

Supplementary materials 2:

1- Effect of soil temperature and moisture on bare soil respiration

In order to assess the impact of soil warming and drying of unplanted treatment in comparison to planted treatments, we tested the effect of temperature and moisture on bare soil respiration during the RPE measurements using a mixed linear model. To this end, soil moisture and temperature recorded during the 24 hours of bare soil incubations were averaged for each replicate and measurement date (Total of eight RPE measurements). Bare soil respirations were coupled with corresponding soil moisture and temperature. Because the relation between soil respiration and temperature was exponential, we log-transformed the respiration data before

their use in the linear model. The results of the linear model (Table 1) showed that soil respiration was significantly affected by soil temperature but not by soil moisture.

Table 1: Results of the linear model in order to assess the effect on bare soil temperature and moisture on bare soil respiration.

Linear model	Intercept		Soil temperature		Soil moisture	
	estimate	p-value	estimate	p-value	estimate	p-value
Log(soil_respiration)~ Temp_Soil+ Moisure_Soil	-0.09	0.89	0.12	<10 ⁻⁵	0.04	0.08

2- Description of the temperature response of bare soil respiration using an Arrhenius equation

The temperature response of bare soil respiration was fitted with an Arrhenius equation (Eq.1) and thermodynamic parameters were determined. The Arrhenius equation was log-transformed before fitting respiration data. (Eq.2) (Fig.1).

$$Resp(T) = a \times \exp \frac{Eo}{RT} \quad (\text{Eq.1})$$

$$\ln(Resp(T)) = \ln(a) - \frac{Eo}{RT} \quad (\text{Eq.2})$$

where $Resp(T)$ was the bare soil respiration at a given soil temperature T (g C-CO₂ m² day⁻¹); Eo was the activation energy of the respiration reaction (J mole⁻¹); R was the gas constant (8.31 J K⁻¹ mole⁻¹); and a is the pre-exponential constant (g C-CO₂ m² day⁻¹).

The model was fitted using the lme function (nlme package) in R. The obtained thermodynamics parameters were: $a = 1.4 \times 10^{14}$ (g C-CO₂ m² day⁻¹), $Eo = 8.1$ (kJ mole⁻¹).

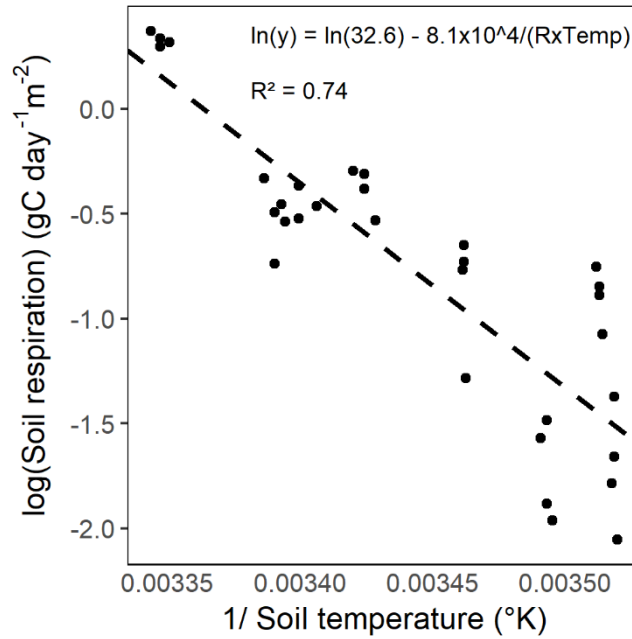


Figure 1: Relationship between the log of bare soil respiration and 1/bare soil temperature

3- Correction of bare soil respiration and rhizosphere priming effect to account for the bare soil warming

As explained in the main manuscript, the temperature was significantly higher in the unplanted compared to planted treatments. The warming observed in unplanted compared to planted treatments (+0.74 °C on average) could increase bare soil respiration since temperature had a significant positive effect on soil respiration (Fig. 1). Given that RPE is calculated as the difference in soil respiration between planted and unplanted treatments, the RPE could be underestimated.

In order to quantify the effect of bare soil warming on soil respiration and RPE estimate, we re-analyzed the data corresponding to the measurement of April 2017 (Tab. 1 of the main text). For this date, the soil temperature was $15.1 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ for the unplanted treatment while the soil temperatures of the planted treatments were 13.6 ± 0.5 and $13.1 \pm 0.001^{\circ}\text{C}$ for the grass under ambient (GN-C-) and elevated CO_2 (GN-C+), respectively. In order to make comparable unplanted and planted treatments, we calculated two new bare soil respiration normalized with

the two temperatures of planted treatments. The new bare soil respiration was calculated with following equations:

$$\frac{Resp(T_{planted})}{Resp(T_{unplanted})} = \frac{a \times \exp^{-\frac{Eo}{RT_{planted}}}}{a \times \exp^{-\frac{Eo}{RT_{unplanted}}}} \quad (Eq. 4)$$

After rearrangements of equations, we obtained:

$$Resp(T_{planted}) = Resp(T_{unplanted}) \times \exp^{\frac{Eo}{R} \times \left(\frac{1}{T_{unplanted}} - \frac{1}{T_{planted}} \right)} \quad (Eq. 6)$$

where $Resp(T_{planted}, gC\ m^{-2}\ 24h^{-1})$ was the new bare soil respiration calculated with the soil temperature of planted treatment ($T_{planted}, ^\circ K$), $Resp(T_{unplanted}, gC\ m^{-2}\ 24h^{-1})$ was the bare soil respiration measured at the temperature of unplanted treatment ($T_{unplanted}, ^\circ K$). The value of parameters a and Eo were obtained with the fitting of bare soil respiration with soil temperature (Fig. 1)

Results showed that the higher soil temperature in unplanted compared to planted treatments contributed to 16.2-21.2% increase in soil respiration (Tab.2). The new bare soil respirations (temperature-normalized) were used to calculate new RPE values. Comparison of RPE values before and after temperature normalization showed that RPE was 11.7-14.6% underestimated if the difference of temperature between unplanted and planted treatments was not considered.

Table 2: Measured and temperature-normalized bare soil respiration. Two normalized bare soil respiration were calculated with the two distinct temperatures measured for two planted treatments: ryegrass cultivated under ambient and elevated CO₂ (GN-C- and GN-C+).

Bare soil Replicates	Measured bare soil respiration gC m ⁻² d ⁻¹	Temperature- normalized bare soil respiration GN-C- gC m ⁻² d ⁻¹	% change	Temperature- normalized bare soil respiration GN-C+ gC m ⁻² d ⁻¹	% change
1	0.297	0.249	16.2	0.234	21.2
2	0.258	0.216		0.203	
3	0.281	0.236		0.222	
4	0.256	0.214		0.202	

Table3: Value of RPE before and after temperature normalization of bare soil respiration with the temperature of the planted treatment. Two planted treatments were considered: ryegrass cultivated under ambient and elevated CO₂ (GN-C- and GN-C+).

Treatments	Replicates	Measured RPE gC m ⁻² d ⁻¹	Temperature- normalized RPE gC m ⁻² d ⁻¹	% change
GN-C-	1	0.435	0.479	11.7
	2	0.473	0.518	
	3	0.252	0.296	
	4	0.451	0.496	
GN-C+	1	0.330	0.388	14.6
	2	0.375	0.433	
	3	0.453	0.511	
	4	0.468	0.526	

Supplementary tables and figures for “A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems”

Table S1. Presentation of the 10 treatments set up in the experimental platform including two levels of fertilization (low or high), two levels of atmospheric CO₂ concentration (ambient or elevated) and three plants species in intercropping or in monoculture.

Treatments : common names	Atmospheric CO ₂ concentration (ppm)	N fertilization (kg N ha ⁻¹)	Plant treatments
GN-C-	400	40	grass
GN-C+	700	40	grass
GLN-C+	700	40	grass + legumes
GLN-C-	400	40	grass + legumes
GLN+C-	400	200	grass + legumes
WN-C-	400	40	wheat
WN+C-	400	200	wheat
WGLN-C-	400	40	grass + legumes + wheat
WGLN+C-	400	200	grass + legumes + wheat
UNPLANTED SOIL	400	0	none
grass = English ryegrass (<i>Lolium perenne</i>)			
legumes = white clover (<i>Trifolium repens</i>)			
Wheat = spring wheat (<i>Triticum aestivum</i> var. <i>lennox</i>)			

Table S2. Difference of temperature between mesocosm air and ambient air across months, n=5. Nighttime is defined by photosynthetic active radiation (PAR) = 0 and daytime is defined by PAR > 0. Mean values are coupled with standard error (SE).

Month	Difference of temperature between mesocosm air and ambient air (°C)					
	<u>Overall</u>		<u>Night</u>		<u>Day</u>	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE
2017-01	-0.50 ± 0.007		-1.22 ± 0.005		0.56 ± 0.013	
2017-02	-0.64 ± 0.010		-1.80 ± 0.006		0.77 ± 0.014	
2017-03	-0.37 ± 0.010		-1.91 ± 0.006		1.05 ± 0.013	
2017-04	-0.12 ± 0.013		-2.22 ± 0.008		1.35 ± 0.016	
2017-05	-0.62 ± 0.012		-2.47 ± 0.007		0.28 ± 0.014	
2017-06	-1.22 ± 0.010		-3.05 ± 0.005		-0.38 ± 0.011	
2017-07	-1.23 ± 0.010		-2.99 ± 0.005		-0.33 ± 0.012	
Average	-0.67 ± 0.010		-2.24 ± 0.006		0.47 ± 0.013	

Table S3. Soil temperature and moisture for each treatment averaged for the measurement period (November 2016 to July 2017). Mean values are coupled with standard error (SE).

Traitements	Soil temperature (°C)		Soil moisture (%)	
	<u>Overall</u>		<u>Overall</u>	
	mean	SE	mean	SE
GLN-C-	15.39 ±	0.02	26.90 ±	0.01
GLN-C+	15.35 ±	0.02	28.29 ±	0.02
GLN+C-	14.93 ±	0.19	28.26 ±	0.01
GN-C-	15.50 ±	0.02	29.00 ±	0.01
GN-C+	15.47 ±	0.02	34.18 ±	0.01
WGLN-C-	15.33 ±	0.20	25.63 ±	0.01
WGLN+C-	14.89 ±	0.02	27.51 ±	0.01
WN-C-	15.50 ±	0.02	28.75 ±	0.01
WN+C-	15.92 ±	0.02	28.91 ±	0.01
Unplanted_soil	16.11 ±	0.02	26.42 ±	0.01
Average	15.44 ±	0.12	28.05 ±	0.90

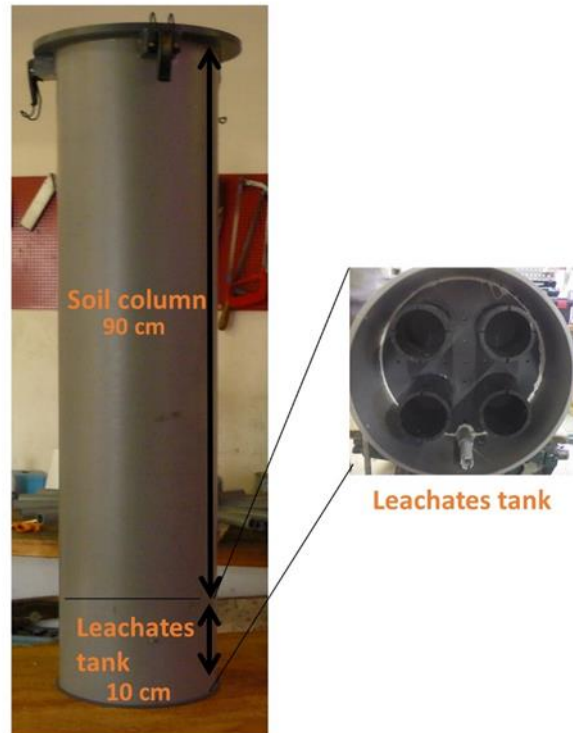


Figure S1. Presentation of the belowground part of the mesocosms. It was divided in two part: the first 90cm contained the soil column and the last 10cm were dedicated to collect the leachates in a tank. The two parts were separated by a pierced plate covered with a mesh to avoid roots penetration in the tank.

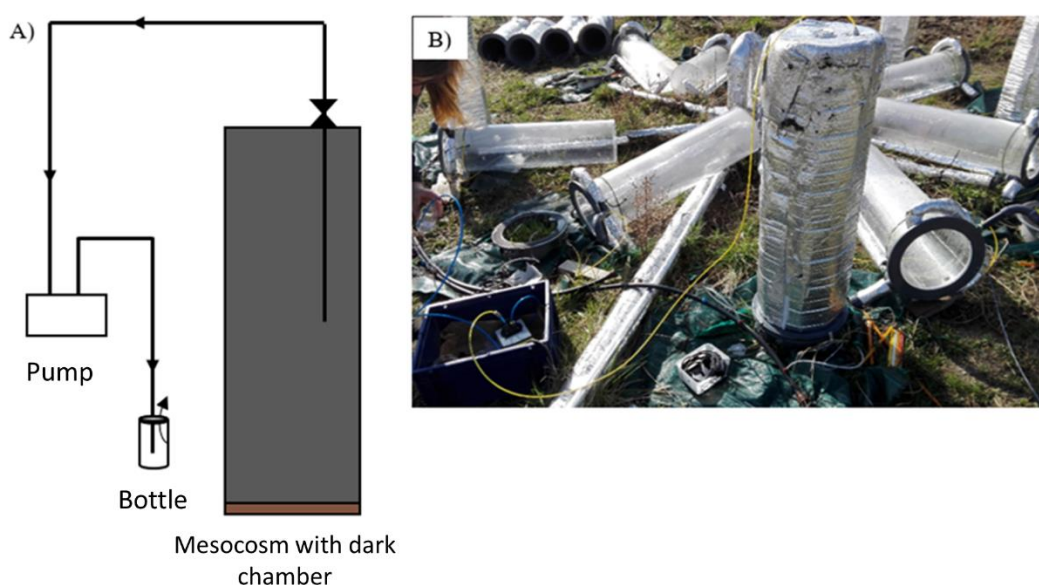


Figure S2. Presentation of the method of ecosystem respired- CO_2 sampling after 24 hours of ecosystem incubation with dark chambers. (A) Schema and (B) photograph of the sampling. The dark chambers were fixed on the mesocosm stopping photosynthesis activity during 24 hours. After this dark period, a valve was opened and a pipe was inserted to sample the accumulated gas with a pump. The air is flushed in a glass bottle (120 millimeters) during 1'30 minutes equivalent to ten-fold air renewal in the bottle (in order to avoid contamination), with an airflow of 1L min^{-1} .

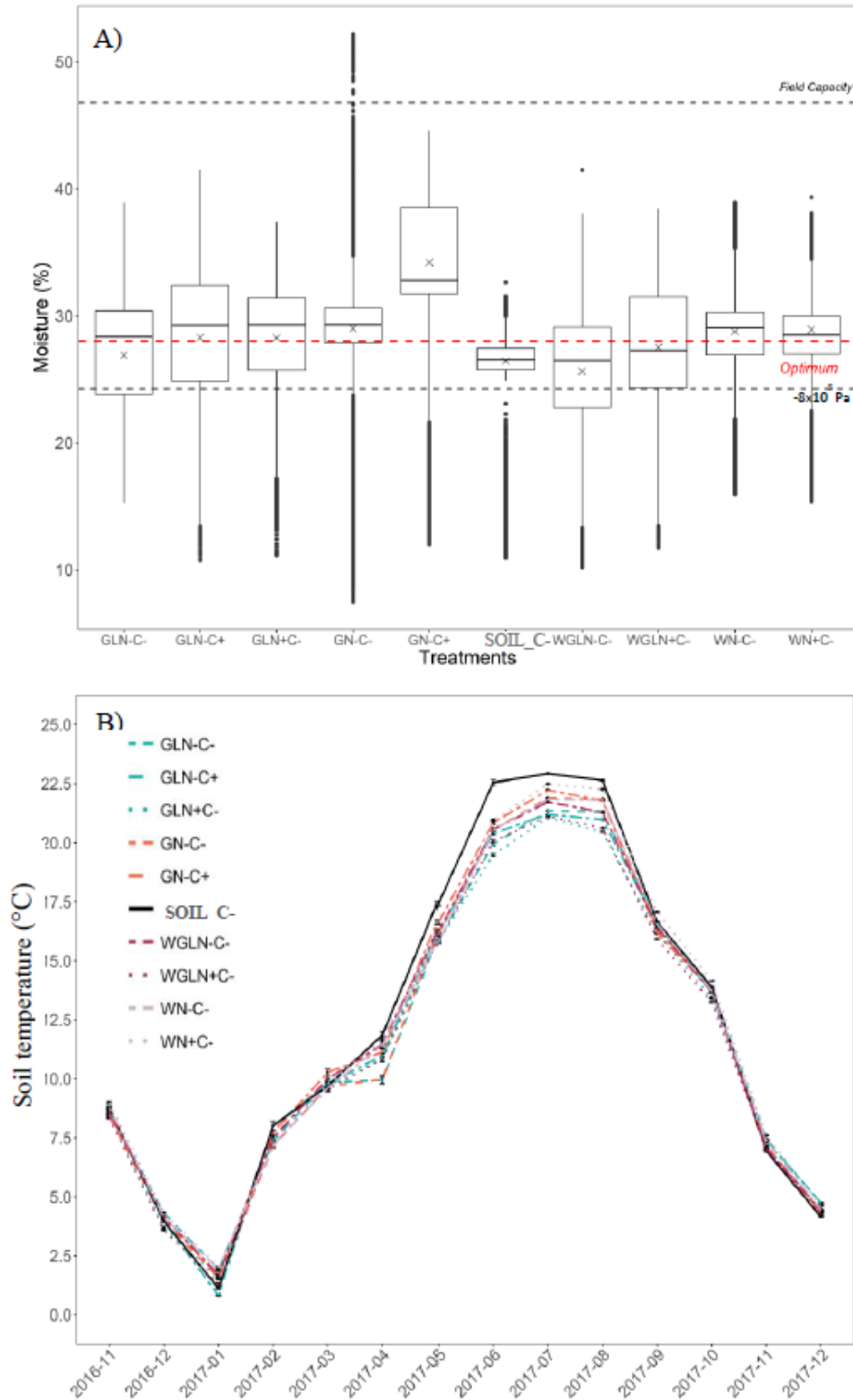


Figure S3. (A) Soil moisture for each treatment across the measurement period (November 2016 to July 2017) expressed in volumetric moisture, $n=2$. Soil moisture of 28% was the optimum targeted corresponding to 60% of field capacity (red dotted line). Soil moisture

variation was accepted as long as the soil water potential stayed between field capacity and -8×10^5 Pa, represented in black dotted lines; (B) Evolution of soil temperature averaged by month across time for each treatment, $n=2$. Errors bars represent standard error of means.

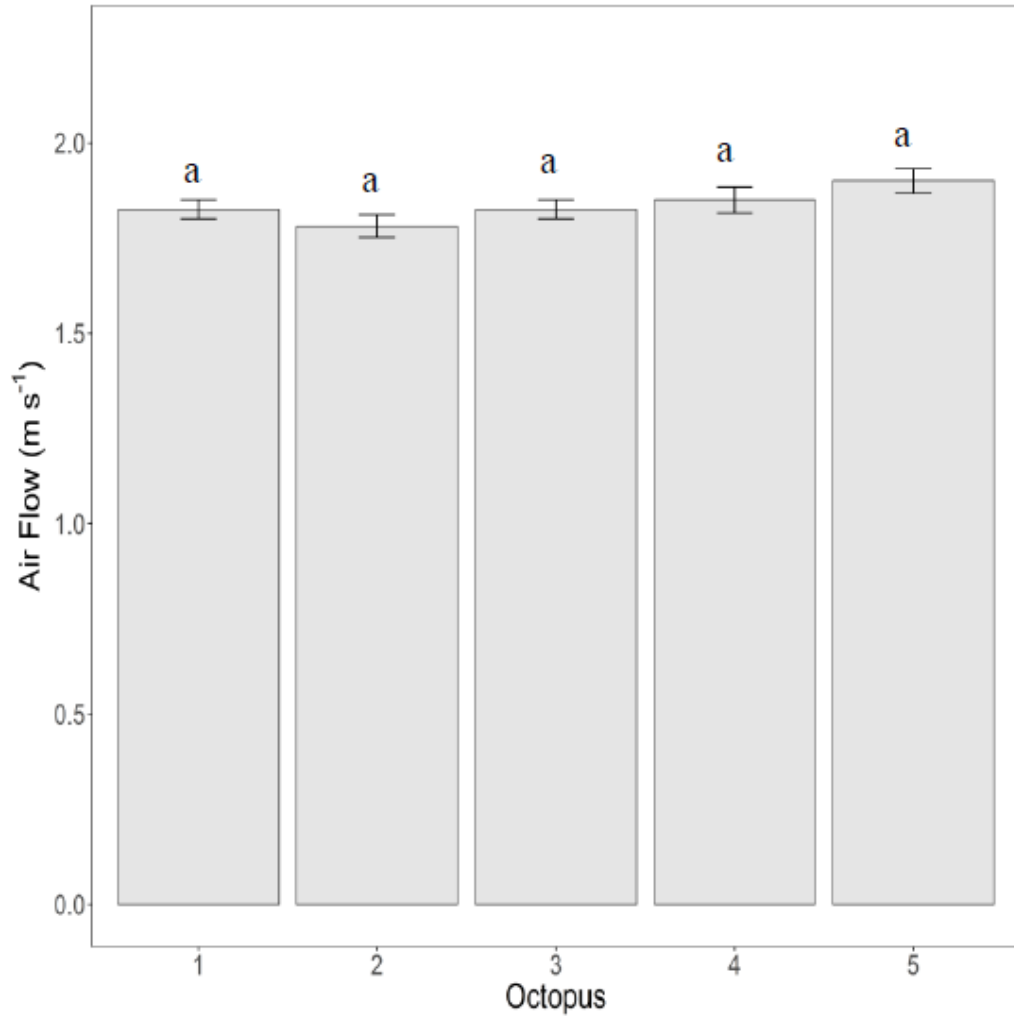


Figure S4. Airflow across the five octopuses. Errors bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between octopus (one-way ANOVA following by Tukey's *posthoc* test, * $P > 0.05$).

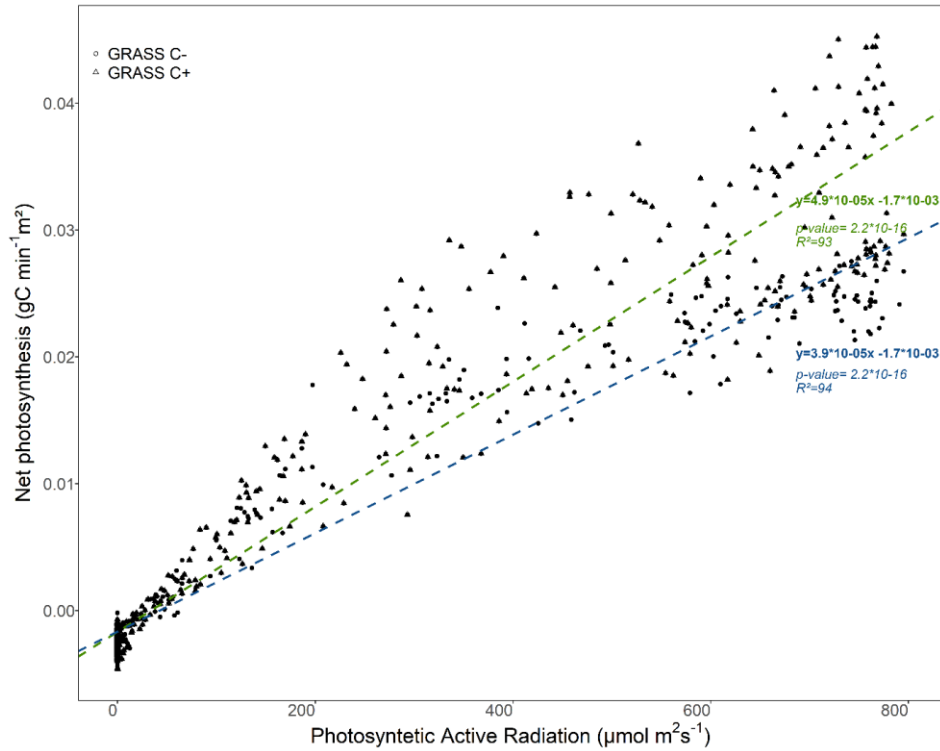


Figure S5. Net photosynthesis over two days (2017-02-18 and 2017-02-19) plotted against photosynthetic active radiation (PAR) for two treatments: ryegrass under ambient and elevated CO_2 , $N = 1248$. Green dotted line corresponds to the linear regression between net photosynthesis and PAR for the ryegrass under elevated CO_2 . Blue dotted line corresponds to the linear regression between net photosynthesis and PAR for the ryegrass under ambient CO_2 .

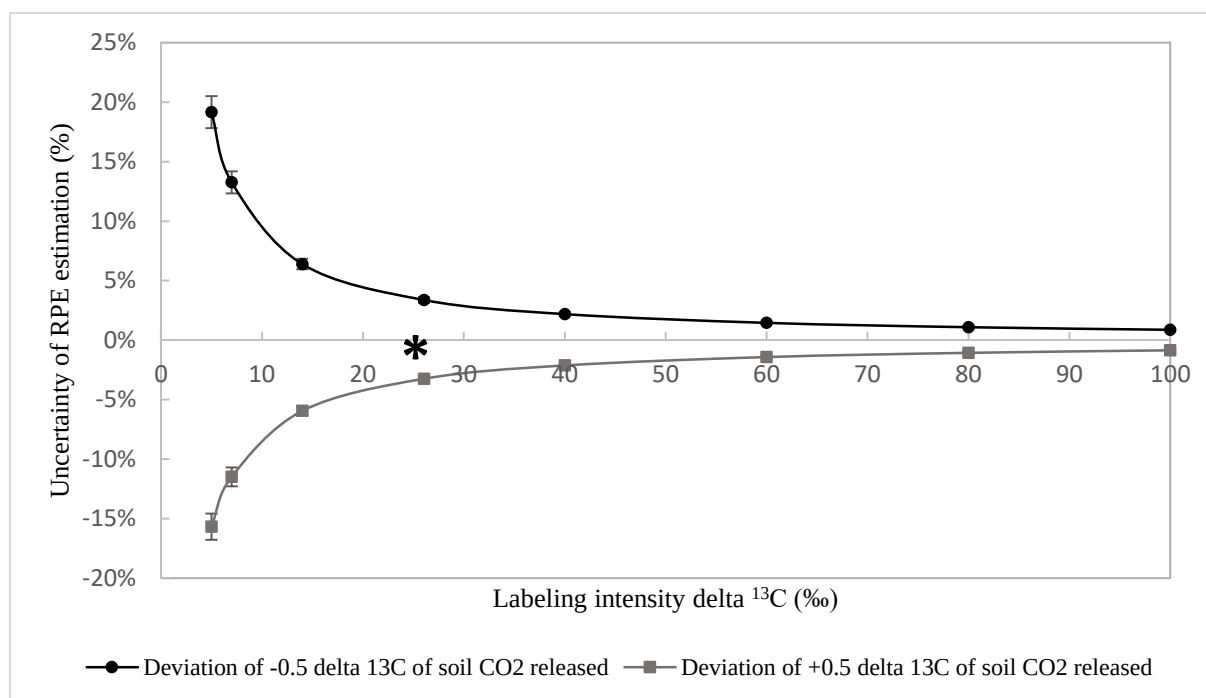


Figure S6. Uncertainty of rhizosphere priming effect (RPE) estimation related to 1‰ change (+0.5‰ and -0.5‰) in $\delta^{13}\text{C}$ of soil-derived CO_2 at multiple labeling intensity. The change of RPE value induced by the isotopic deviation was calculated as $((\text{RPE}_{\text{new}} - \text{RPE}_{\text{initial}}) / \text{RPE}_{\text{initial}})$ where $\text{RPE}_{\text{initial}}$ and RPE_{new} are the values of RPE before and after the $\delta^{13}\text{C}$ change (+0.5‰ or -0.5‰). The uncertainty of RPE estimate corresponded to the addition of two RPE changes consecutive to +0.5‰ and -0.5‰. The labelling intensity is the difference in $\delta^{13}\text{C}$ between labelled plant material and soil organic C. Uncertainty analysis was made on results from the treatment “grass monoculture (ryegrass) under ambient CO_2 concentration” measured the 12th April 2017. The asterisk represents the labeling intensity obtained in this experiment (26 ‰). The uncertainties of RPE estimation for the labeling intensities 5‰, 7‰, 14‰, 40‰, 60‰, 80‰ and 100‰ were obtained by modeling (see Methods).

Chapitre 3 : Prédire le « rhizosphere priming effect » : comparaison de proxys regroupant différents traitements expérimentaux



Predicting the rhizosphere priming effect: comparison of proxies under different experimental treatments

Camille Cros^a, Sébastien Fontaine^a, Frida Keuper^b, Ludovic Henneron^{a,c}, Robert Falcimagne^a, Raphael Martin^a, Gaël Alvarez^a

Article soumis dans « Scientific reports » (en revue par les pairs)

^aUCA, INRA, VetAgro Sup, UMR Ecosystème Prairial, 5, Chemin de Beaulieu, 63000, Clermont-Ferrand, France

^bINRA, UR AgroImpact, 180 rue Pierre-Gilles de Gennes, 02000, Barenton-Bugny, France

^cDepartment of Forest Ecology and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden

Email addresses: CC camille.cros.sci@gmail.com, SF sebastien.fontaine@inra.fr, FK frida.keuper@inra.fr, LH ludovic.henneron@hotmail.com, RF robert.facimagne@inra.fr, RM raphael.martin@inra.fr, GA gael.alvarez@inra.fr

*Author for correspondence

Camille Cros, UCA, INRA, VetAgro Sup, UMR Ecosystème Prairial, 5, Chemin de Beaulieu, 63000, Clermont-Ferrand, France

Email: camille.cros.sci@gmail.com

Keywords:

Rhizosphere priming effect; ecosystem CO₂ fluxes; aboveground photosynthetic activity; modelling

Highlights

- Rhizosphere priming was linearly correlated with plant photosynthesis and biomass
- Relationships were robust to various ecosystems, nitrogen input and CO₂ levels
- We provided equations to estimate priming in temperate grasslands and wheat crops

Abstract

Plant activity changes the rate of soil organic carbon mineralization by supplying fresh carbon to soil decomposers (“rhizosphere priming effect; RPE). Measuring the RPE requires carbon isotopic labeling of plants in order to partition soil- from plant-respiration, which is not feasible at the ecosystem scale. Scaling up the quantification of the RPE to ecosystem scale thus requires an alternative approach such as the use of equations based on easily measurable or available proxies. We compared gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER) and aboveground plant biomass (AGB) as proxies of the RPE in nine contrasted treatments including different plant species in monoculture or mixture and levels of CO₂ and N fertilization. We show significant positive linear relationships between the RPE and GPP, ER and AGB and no significant treatment effect on these relationships. We propose that the RPE can be predicted in wheat crop and grassland with equations: $RPE = (2.03 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}) \cdot GPP - 1.57 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$ and $RPE = (8.03 \cdot 10^{-4} \pm 7.6 \cdot 10^{-5}) \cdot AGB + 9.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.05$ ($R^2 = 0.61$ and 0.58 , respectively).

1. Introduction

Increasing the ecosystem fixation of CO₂ and its incorporation in soils as organic compounds has been proposed to mitigate rising atmospheric CO₂ and the associated climate change (Lal, 2016; Chabbi et al., 2017). However, the effect of plant carbon input in soil on soil carbon (SOC) stock is not obvious and can be positive, null or negative (Campbell et al., 1991; Fontaine et al., 2004, 2011; Kuzyakov, 2010; Perveen et al., 2014). The soil C balance has two components: 1) the fraction of newly incorporated C that is microbially transformed and stored in soil and 2) the decomposition of pre-existent SOC. The latter component is greatly determined by the rhizosphere priming effect (RPE): the stimulation of microbial mineralization of SOC induced by energy rich substrates (rhizodeposition and litter) from living plant roots (Liljeroth et al., 1994; Kuzyakov, 2002; Lu et al., 2018). Consequently, quantification of the RPE at the ecosystem or global scale is crucial for predicting the response of soil C stock to increasing C input in soil.

The quantification of the RPE is technologically complicated (Kuzyakov, 2006) due to the need for separation of plant- and soil-respiration. Consequently, the RPE quantification is restricted to planted pot experiments with isotopic labeling infrastructure or lab incubations mimicking plant rhizodeposition with isotopically labeled substrates. Scaling up the quantification of the RPE to the ecosystem or global scale thus requires an alternative approach such as the use of easily measurable or available proxies. The RPE can be a joint effect of different variables such as plant activity and phenology and soil properties (Kuzyakov, 2002; Cheng et al., 2014). Studies manipulating light availability showed that the RPE decreases with shadow, suggesting that plant photosynthetic activity is an important driver of the RPE (Kuzyakov and Cheng, 2001, 2004). This is further supported by studies, which correlate the RPE with either total plant biomass, aboveground or root biomass. More specifically, of these three parameters, aboveground biomass appeared to be the best predictor of the RPE (Dijkstra

et al., 2006; Zhu et al., 2014; Shahzad et al., 2015; Huo et al., 2017). These findings position gross primary production (GPP) and plant aboveground biomass (AGB) as good candidates for RPE proxies. The aim of this study is to compare potential RPE proxies related to photosynthetic activity (GPP and AGB), as well as ecosystem respiration (ER) as an easily measurable variable accounting for the activity of the whole plant-soil system. Moreover, we aim to provide widely applicable proxies by including seasonal variation (measurements during one year) and contrasting experimental treatments in our experimental design.

2. Methods

We set-up an experimental platform combining continuous CO₂ exchange measurements and plant labeling with ¹³C depleted CO₂ from fossil fuel origin in 40 independent plant-soil mesocosms over one year (Cros et al., 2019). The mesocosms consisted of a buried belowground part and a transparent aboveground chamber (90 cm height, Ø 25 cm; **Fig. S1**). Nine planted treatments including three plant species (*Trifolium repens*, *Lolium perenne*, *Triticum aestivum* var *lennox*), two atmospheric CO₂ concentrations and two levels of nitrogen application were managed (**Table 3.1**) as well as a bare soil control treatment (n = 4). Natural conditions of light and temperature were preserved and soil moisture was maintained around 60% of field capacity.

Table 3. 1 : Experimental design and treatment codes used in the experimental platform, including three plant species, two levels of N fertilization and CO₂ atmospheric concentration. G (grass) stands for English ryegrass, L (legume) for white clover, W for wheat, N- for low nitrogen fertilizer (40 kg N ha⁻¹ year⁻¹), N+ for high nitrogen fertilizer (200 kg N ha⁻¹ year⁻¹), C- for ambient atmospheric CO₂ concentration (400ppm) and C+ for elevated atmospheric CO₂ concentration (700ppm). An unplanted control treatment was also conducted without N fertilization and under ambient atmospheric CO₂ concentration.

Species	CO ₂ atmospheric concentration (ppm) and nitrogen fertilization (kg N ha ⁻¹ year ⁻¹) treatments		
	N=40; C=400	N=40; C=700	N=200; C=400
<i>Lolium perenne</i>	GN-C-	GN-C+	x
<i>Lolium perenne</i> + <i>Trifolium repens</i> (grassland)	GLN-C-	GLN-C+	GLN+C-
<i>Triticum aestivum</i> + grassland	WGLN-C-	x	WGLN+C-
<i>Triticum aestivum</i>	WN-C-	x	WN+C-

We measured the RPE bimonthly to monthly by source partitioning using isotopic signatures in combination with 24-hour dark incubations to separate plant- and soil respiration. The GPP and ER were estimated after partitioning the net ecosystem productivity measured 2.5 times per hour (Reichstein et al., 2005). The AGB was determined by nine harvests, weighted and analyzed for ¹³C abundance (**Table S1**). In order to construct the relationships between RPE and GPP, ER and AGB, data of explanatory variables were selected at the closest of RPE measurement dates (**Table S2**). RPE measurements were associated with GPP and ER measured two days before the beginning of the RPE measurements because the platform was stopped the preceding evening for preparation of dark incubations. We coupled the RPE with

GPP and ER eight times over the year. The coupling of the RPE with AGB was obtained for the three available periods where the RPE measurements preceded a biomass harvest. The AGB data selection only included the biomass of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* excluding *Triticum aestivum*, which was not harvested regularly. Further details on the experimental platform and calculations are described in **Supplementary material** and in Cros et al. (2019).

In order to test the relevance of the potential RPE proxies, we built repeated measures mixed models with GPP, ER or AGB as fixed factor and the mesocosm as random factor to prevent residuals dependency. The residuals dependency was rejected because of no temporal autocorrelation on the residuals (R, package nlme). Moreover, a model considering soil temperature as additive effect was used to take into account a possible soil temperature effect on RPE (Kuzyakov et al., 2007; Zhu and Cheng, 2011). Finally, we tested the effect of the treatments on model residuals in order to ensure that each proxy used accounts for the RPE variability induced by the treatments. The requirements for linear model analysis were checked and all statistical analyses were performed in R (R Core Team, 2013, R version 3.4.3).

3. Results & Discussion

The RPE was significantly correlated with GPP, ER and AGB (* $P < 0.05$) (**Fig. 3.1**). The GPP, ER and AGB explained 61%, 36% and 58% of the variance (R squared) respectively (**Fig. 3.1**, **Table 3.2**) indicating that GPP and AGB were better predictors of RPE than ER. The relationship between RPE and AGB confirms the correlations observed by Huo et al. (2017) and Dijkstra et al. (2006) supporting the relevance of AGB as a proxy (**Fig. 3.1C**). The significant relationship between RPE and GPP shows that photosynthesis is indeed a strong driver of the RPE as suggested by studies manipulating photosynthesis through indirect methods such as clipping and shading (Craine et al., 1999; Kuzyakov and Cheng, 2001, 2004; Shahzad et al., 2012). As far as we are aware, our study provides the first direct relationship between RPE and GPP and emphasizes the use of GPP as RPE proxy (**Fig. 3.1A**).

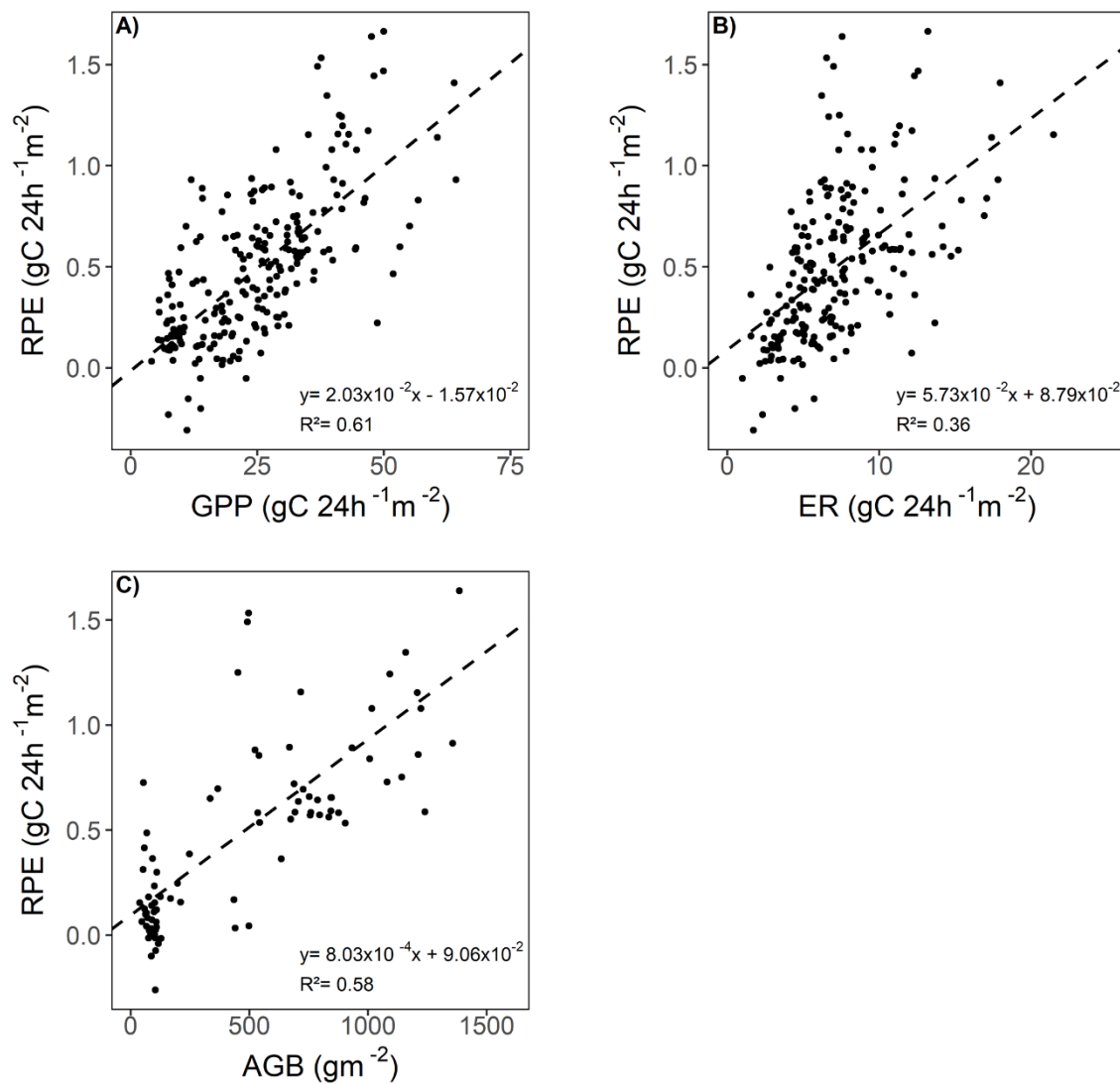


Figure 3. 1 : (A) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and gross primary production (GPP) for eight periods in 36 mesocosms, N=217; (B) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and ecosystem respiration (ER) for eight periods on 36 mesocosms, N=217; (C) Relationship between rhizosphere priming effect (RPE) and plant aboveground biomass (AGB) for three periods on 28 mesocosms, N=84. The slopes of the three linear regressions were significant (*P < 0.05).

Table 3. 2 : Results of mixed linear model to determine a relationship between the rhizosphere priming effect (RPE) and gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER) and plant aboveground biomass (AGB). GPP, ER and AGB (RPE proxies) were tested as fixed effects and mesocosms as random effect to erase the problem of pseudoreplicates allowed by repeated measurements on mesocosms. Soil temperature was tested as an additive fixed effect. Values of Akaike's information criterion (AIC) and R^2 are given for comparison. The black star (*) stands for significant difference between the simple model and the model taking into account temperature effect. Treatment effect was tested on the residuals of the simplest models in the case of GPP and biomass and on complex model in the case of ER. No significant effect of treatment was found.

RPE proxy	mixed linear model	FIXED EFFECT						RANDOM EFFECT		AIC	R^2
		Intercept		Slope-RPE proxy		Slope-soil temperature		Intercept	Residuals		
		estimate $\pm$ se	<i>p-value</i>	estimate $\pm$ se	<i>p-value</i>	estimate $\pm$ se	<i>p-value</i>	$\mathcal{N}(\mu, \sigma)$			
GPP	RPE ~ GPP	$-1.57 \times 10^{-2} \pm 0.04$	0.73	$2.03 \times 10^{-2} \pm 0.001$	$<10^{-5}$			$\mathcal{N}(0, 0.12)$	$\mathcal{N}(0, 0.06)$	38	0.61
	RPE ~ GPP + Temp_soil	$-4.71 \times 10^{-2} \pm 0.09$	0.59	$2.03 \times 10^{-2} \pm 0.001$	$<10^{-5}$	$1.88 \times 10^{-3} \pm 0.004$	0.68	$\mathcal{N}(0, 0.12)$	$\mathcal{N}(0, 0.06)$	40	0.61
RE	RPE ~ ER	$8.78 \times 10^{-2} \pm 0.05$	0.08	$5.73 \times 10^{-2} \pm 0.006$	$<10^{-5}$			$\mathcal{N}(0, 0.06)$	$\mathcal{N}(0, 0.09)$	111	0.36
	RPE ~ ER + Temp_soil	$4.27 \times 10^{-1} \pm 0.09$	1.6×10^{-3}	$6.69 \times 10^{-2} \pm 0.004$	$<10^{-5}$	$-2.56 \times 10^{-2} \pm 0.006$	2.7×10^{-3}	$\mathcal{N}(0, 0.07)$	$\mathcal{N}(0, 0.08)$	93	0.42
Aboveground biomass	RPE ~ A_biomass	$9.06 \times 10^{-2} \pm 0.05$	0.06	$8.03 \times 10^{-4} \pm 7.6 \times 10^{-5}$	$<10^{-5}$			$\mathcal{N}(0, 7.9 \times 10^{-6})$	$\mathcal{N}(0, 0.08)$	32	0.58
	RPE ~ A_biomass + Temp_soil	$2.09 \times 10^{-3} \pm 0.08$	0.98	$7.22 \times 10^{-4} \pm 9.8 \times 10^{-5}$	$<10^{-5}$	$1.02 \times 10^{-2} \pm 0.008$	0.2	$\mathcal{N}(0, 8.5 \times 10^{-6})$	$\mathcal{N}(0, 0.08)$	32	0.58

Our results linking instantaneous RPE to GPP measurements suggest that a large part of the RPE is instantaneously driven by aboveground photosynthetic activity. This close connection between GPP and RPE may be explained by the major contribution of exudates in the priming activity of soil microorganisms (Shahzad et al., 2015). A variation in photosynthetic activity rapidly alters the rate of plant exudation (12.5 hours) (Kuzuyakov and Gavrichkova, 2010) with consequences for the magnitude of the RPE within 24 hours (Shahzad et al., 2012). Other C inputs than exudates (i.e. litter) also induce RPE but with more inertia due to the complex processes involved (Wu et al., 1993; Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). This other origin of the RPE could contribute to the part of the RPE variance that is not explained by GPP.

All nine contrasting treatments (**Table 3.1**) representing factors reported as important drivers of RPE (plant identity and phenology, N fertilization, atmospheric CO₂ concentration) (Kuzuyakov, 2002; Fontaine et al., 2004; Cheng et al., 2014; Perveen et al., 2014; Huo et al., 2017) showed GPP and AGB as strong predictors of the RPE. As expected, these contrasting conditions provided wide ranges of RPE, GPP and AGB (**Fig. 3.1**). However, no significant treatment effect was observed on the residual variance of the models successively built with GPP and AGB (p-value = 0.31 and 0.36, respectively). Moreover, although the fluctuation of soil temperature throughout the seasons might have changed the RPE (Kuzuyakov et al., 2007) no significant temperature effect was found when it was considered as an additive effect in our models (**Table 3.2**). The robustness of our models to other RPE drivers than GPP and AGB suggests that the photosynthetic activity largely accounts for variation in the magnitude of the RPE induced by treatments and seasons.

The aim of this study was not to model the RPE mechanisms but to investigate proxies by using commonly measured variables in order to upscale the RPE quantification at the ecosystem or global scale. Our findings show that GPP and AGB are strong predictors of RPE for perennial grass, legumes and wheat crops allowing for RPE quantification with the following equations:

$RPE = (2.03 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}) \cdot GPP - 1.57 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$ and $RPE = (8.03 \cdot 10^{-4} \pm 7.6 \cdot 10^{-5}) \cdot AGB + 9.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.05$ (**Table 3.2**). Our equations provide easy estimates of the RPE by using direct measurements of AGB commonly recorded in field experiments, or GPP widely recorded in CO₂ eddy flux networks or modelled (Beer et al., 2010; Wu et al., 2010; Hashimoto et al., 2012). This study emphasizes the need to consider photosynthesis in RPE models. By embedding our equations in RPE models that could also account for soil properties and climate (Rasmussen et al., 2007; Perveen, 2014; Thurgood et al., 2014), the RPE of grasslands and wheat crops could be predicted at the global scale.

Acknowledgment

The study has been funded by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR, Projet Basil) and the “Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité” (FRB, Call BioDiversa, Basil). We thank H. Desmyttere, S. Revaillet, D. Colosse V. Guillot and E. Viallard for their technical support during the RPE measurements. We also thanks J. Pottier for his advice during the statistical analysis.

Declaration of interest

None.

Author contribution

The experiment was designed by CC, SF, GA and FK. The construction of the experimental platform was done by CC, SF, GA and RF. CC, LH, SF and GA collected the data. CC, GA and RM performed the analysis. CC led the writing of the manuscript. All authors contributed critically to the drafts.

References

- Beer, C., Reichstein, M., Tomelleri, E., Ciais, P., Jung, M., Carvalhais, N., Rödenbeck, C., Arain, M.A., Baldocchi, D., Bonan, G.B., Bondeau, A., Cescatti, A., Lasslop, G., Lindroth, A., Lomas, M., Luyssaert, S., Margolis, H., Oleson, K.W., Rouspard, O., Veenendaal, E., Viovy, N., Williams, C., Woodward, F.I., Papale, D., 2010. Terrestrial gross carbon dioxide uptake: global distribution and covariation with climate. *Science* 329, 834–838. doi:10.1126/science.1184984
- Campbell, C.A., Lafond, G.P., Zentner, R.P., Biederbeck, V.O., 1991. Influence of fertilizer and straw baling on soil organic matter in a thin black chernozem in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 443–446. doi:10.1016/0038-0717(91)90007-7
- Chabbi, A., Lehmann, J., Ciais, P., Loescher, H.W., Cotrufo, M.F., Don, A., SanClements, M., Schipper, L., Six, J., Smith, P., Rumpel, C., 2017. Aligning agriculture and climate policy. *Nature Climate Change* 7, 307–309. doi:10.1038/nclimate3286
- Cheng, W., Parton, W.J., Gonzalez-Meler, M.A., Phillips, R., Asao, S., McNickle, G.G., Brzostek, E., Jastrow, J.D., 2014. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. *New Phytologist* 201, 31–44. doi:10.1111/nph.12440
- Craine, J.M., Wedin, D.A., Chapin, F.S., 1999. Predominance of ecophysiological controls on soil CO₂ flux in a Minnesota grassland. *Plant and Soil* 207, 77–86. doi:10.1023/A:1004417419288
- Cros, C., Alvarez, G., Keuper, F., Fontaine, S., 2019. A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems. *Soil Biology and Biochemistry* 130, 12–22. doi:10.1016/j.soilbio.2018.11.022
- Dijkstra, F., Cheng, W., Johnson, D., 2006. Plant biomass influences rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition in two differently managed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2519–2526. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.020
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content: Carbon input in soil carbon sequestration. *Ecology Letters* 7, 314–320. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillo, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen

in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017

Hashimoto, H., Wang, W., Milesi, C., White, M.A., Ganguly, S., Gamo, M., Hirata, R., Myneni, R.B., Nemani, R.R., 2012. Exploring simple algorithms for estimating gross primary production in forested areas from satellite data. *Remote Sensing* 4, 303–326. doi:10.3390/rs4010303

Huo, C., Luo, Y., Cheng, W., 2017. Rhizosphere priming effect: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 78–84. doi:10.1016/j.soilbio.2017.04.003

Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396. doi:https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<382::AID-JPLN382>3.0.CO;2-#

Kuzyakov, Y., 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 425–448. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.020

Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371. doi:10.1016/j.soilbio.2010.04.003

Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. doi:10.1016/S0038-0717(01)00117-1

Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2004. Photosynthesis controls of CO₂ efflux from maize rhizosphere. *Plant and Soil* 263, 85–99. doi:10.1023/B:PLSO.0000047728.61591.fd

Kuzyakov, Y., Gavrichkova, O., 2010. REVIEW: Time lag between photosynthesis and carbon dioxide efflux from soil: a review of mechanisms and controls. *Global Change Biology* 16, 3386–3406. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02179.x

Kuzyakov, Y., Hill, P.W., Jones, D.L., 2007. Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. *Plant and Soil* 290, 293–305. doi:10.1007/s11104-006-9162-8

Lal, R., 2016. Beyond COP 21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71, 20A–25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A

Liljeroth, E., Kuikman, P., Veen, J.A.V., 1994. Carbon translocation to the rhizosphere of maize and wheat and influence on the turnover of native soil organic matter at different soil nitrogen levels. *Plant and Soil* 161, 233–240. doi:10.1007/BF00046394

Lu, J., Dijkstra, F.A., Wang, P., Cheng, W., 2018. Rhizosphere priming of grassland species under different water and nitrogen conditions: a mechanistic hypothesis of C-N interactions. *Plant and Soil* 429, 303–319. doi:10.1007/s11104-018-3699-1

Perveen, N., 2014. Intégration de l'écologie microbienne dans les modèles biogéochimiques : conséquences pour les prévisions du stockage du Carbone et la fertilité des sols. Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Perveen, N., Barot, S., Alvarez, G., Klumpp, K., Martin, R., Rapaport, A., Herfurth, D., Louault, F., Fontaine, S., 2014. Priming effect and microbial diversity in ecosystem functioning and response to global change: a modeling approach using the SYMPHONY model. *Global Change Biology* 20, 1174–1190. doi:10.1111/gcb.12493

R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

Rasmussen, C., Southard, R.J., Horwath, W.R., 2007. Soil mineralogy affects conifer forest soil carbon source utilization and microbial priming. *Soil Science Society of America Journal* 71, 1141–1150. doi:10.2136/sssaj2006.0375

Reichstein, M., Falge, E., Baldocchi, D., Papale, D., Aubinet, M., Berbigier, P., Bernhofer, C., Buchmann, N., Gilmanov, T., Granier, A., Grünwald, T., Havránková, K., Ilvesniemi, H., Janous, D., Knohl, A., Laurila, T., Lohila, A., Loustau, D., Matteucci, G., Meyers, T., Miglietta, F., Ourcival, J.-M., Pumpanen, J., Rambal, S., Rotenberg, E., Sanz, M., Tenhunen, J., Seufert, G., Vaccari, F., Vesala, T., Yakir, D., Valentini, R., 2005. On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Global Change Biology* 11, 1424–1439. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.001002.x

Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C., Fontaine, S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 146–155. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.023

Shahzad, T., Chenu, C., Repinçay, C., Mougin, C., Ollier, J.-L., Fontaine, S., 2012. Plant clipping decelerates the mineralization of recalcitrant soil organic matter under multiple grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 73–80. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.014

Thurgood, A., Singh, B., Jones, E., Barbour, M.M., 2014. Temperature sensitivity of soil and root respiration in contrasting soils. *Plant and Soil* 382, 253–267. doi:10.1007/s11104-014-2159-9

Wu, C., Niu, Z., Gao, S., 2010. Gross primary production estimation from MODIS data with vegetation index and photosynthetically active radiation in maize. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 115, 1–11. doi:10.1029/2009JD013023

Wu, J., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1993. Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1435–1441. doi:10.1016/0038-0717(93)90058-J

Zhu, B., Cheng, W., 2011. Rhizosphere priming effect increases the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition: RPE enhances Q10 of SOM decomposition. *Global Change Biology* 17, 2172–2183. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02354.x

Zhu, B., Gutknecht, J.L.M., Herman, D.J., Keck, D.C., Firestone, M.K., Cheng, W., 2014. Rhizosphere priming effects on soil carbon and nitrogen mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 76, 183–192. doi:10.1016/j.soilbio.2014.04.033

Supplementary materials for “Predicting the rhizosphere priming effect: comparison of proxies under different experimental treatments”

Continuous CO₂ exchange was quantified by comparing CO₂ concentration of the air entering and leaving the mesocosms. With these data, we calculated net ecosystem productivity (NEP) using the airflow crossing the mesocosm and the ideal gas equation. Then, NEP was separated into GPP and ER by using the partitioning method of Reichstein et al. (2005). The GPP and ER recorded at each time interval was integrated over the day length and was expressed for 24 hours (g C d⁻¹ m⁻²).

The rhizosphere priming effect (RPE) was measured with a method adapted from Shahzad et al. (2012) using 24-hour plant-soil dark-incubation. We used mass balance equations to separate soil-derived CO₂ and plant-derived CO₂. Then, we calculated RPE by using the difference between soil respiration in planted pots and in bare soil control (g C d⁻¹ m⁻²). Because the ¹³C abundance of the three plant species was different, we used the proportion of aboveground biomass of each species to determine the overall ¹³C abundance in plant species mixture treatments, assuming that plant-derived respiration and biomass are proportional. Moreover, given that RPE is calculated as the difference in soil respiration between planted and unplanted treatments, the difference of soil temperature observed in bare and planted soil affected the RPE estimates. Consequently, we temperature normalized the bare soil respiration with the planted soil temperature by using an Arrhenius equation fitting the temperature response of bare soil respiration. Then we estimated a temperature-normalized RPE.

The methodological differences between the RPE measurements and the continuous CO₂ fluxes implied that during RPE measurements, GPP and ER were not recorded for two days (**Table S2**). However, we showed that the comparison of RPE with GPP and ER measured with a time lag of two days before RPE measurements is valid in this experiment in Cros et al. (2019).

The same variables measured (night ecosystem respiration and respiration under dark-incubation) by the two methods gave similar results.

For detailed information about the experimental platform, the experimental design and the calculations see Cros et al. (2019). *A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant soil systems.*

Supplementary tables and figure for “Predicting the rhizosphere priming effect: comparison of proxies under different experimental treatments”

Table S1: Dates of the biomass harvests for the different treatments. ‘Grassland’ includes all treatments containing *Lolium perenne* and *Trifolium repens* (English ryegrass: treatments GN-C-, GN-C+; English ryegrass intercrop with white clover (grassland): GLN-C-, GLN+C-, GLN-C+), and ‘Wheat’ includes all treatments containing *Triticum aestivum* (Common wheat: WN-C-, WN+C-). For the combined treatments ‘Grassland’ + ‘Wheat’ (WGLN-C-, WGLN-C+), *Lolium perenne* and *Trifolium repens* were harvested at the same time as conventional ‘Grassland’ and *Triticum aestivum* was harvested at the same time as conventional ‘Wheat’.

Species	Date of aboveground harvest								
	2016-11-16	2016-12-16	2017-02-09	2017-02-28	2017-05-12	2017-07-05	2017-07-06	2017-09-15	2017-11-24
<i>Lolium perenne</i>	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>Lolium perenne</i> + <i>Trifolium repens</i> (grassland)	X	X	X	X	X	X		X	X
Grassland in intercrop with <i>Triticum aestivum</i>	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>Triticum aestivum</i> in intercrop with grassland							X		
<i>Triticum aestivum</i>							X		

Table S2: List of measurement dates for the variables rhizosphere priming effect (RPE), gross primary production (GPP), ecosystem respiration (ER) and plant aboveground biomass. Plant aboveground biomass measurements coincided with harvest dates (Supplementary Table 1).

<u>Periods of RPE coupling</u>		
RPE (gC 24h ⁻¹ m ⁻²)	GPP, ER (gC 24h ⁻¹ m ⁻²)	Mowing (ryegrass and clover) (g m ⁻²)
2017-08-02	x	2017-02-09
2017-03-14	2017-03-12	x
2017-04-11	2017-04-09	x
2017-04-25	2017-04-23	x
2017-05-11	2017-05-09	2017-05-12
2017-05-23	2017-05-21	x
2017-07-12	2017-07-10	x
2017-08-02	2017-07-31	x
2017-08-31	2017-08-29	2017-09-15
2017-10-12	2017-10-10	x



Figure S.1: Overview of the entire experimental platform

Chapitre 4: Les plantes pérennes favorisent la synchronisation entre la demande de la plante en azote et l'offre du sol en azote y compris en association avec le blé



Perennial species promote synchronization between plant nitrogen demand and soil nitrogen offer even in wheat intercrop

Camille Cros, Gael Alvarez, Sandrine Revaillo, Vincent Allard, Helene Desmyterre, Ludovic Henneron, Frida Keuper, Sebastien Fontaine

Article non soumis

1. Introduction

Nitrogen (N) is an essential nutrient for plant growth and its availability is limiting in soil, explaining the intensive use of N fertilizer to increase annual crop yield face to the rising of human population (Vitousek and Howarth, 1991; Vitousek et al., 1997; Ciais et al., 2013). However, the increasing use of N fertilizer is less and less efficient since the increase in plant production does not follow N fertilization (Tilman et al., 2002; Hinsinger et al., 2011). At global scale, only about 38% to 50% of the N input is recovered by crops, leading to N losses in the environment (Smil, 1999; Gardner and Drinkwater, 2009). These losses cause serious environmental problems: eutrophication of aquatic ecosystem, pollution of groundwater and emission of N_2O , which is a strong greenhouse gas (Smil, 1999; IPCC, 2014; Steffen et al., 2015).

In undisturbed ecosystems (forest, permanent grassland), N can be acquired by plants through the N symbiotic fixation by legumes, but the main source of N comes from the mineralization of soil organic matter (SOM) by microorganisms (Söderlund and Svensson, 1976; Vitousek and Howarth, 1991). The availability of N for plant from SOM depends on microbial activities that have different responses to environmental factors in comparison to plants. Consequently, Jaeger et al. (1999) suggested that, under temperate climate, the peak of microbial activities (autumn) is not synchronized with the peak of plant N demand (spring). Nevertheless, undisturbed ecosystems show high primary production (equivalent or higher than cultivated soils) despite the absence of fertilization, meaning that plants find the nutrients they require to grow (Myers et al., 1994; Crews and Peoples, 2005; Schulze et al., 2009; Crews et al., 2016). Moreover, the loss of nitrogen through leaching or denitrification is typically very low representing some % of the total amount of nitrogen exchanged between soil and plants (Benoit, 2007). These observations strongly suggest the existence of processes synchronizing the soil offer to plant demand in the economy of nutrients in undisturbed ecosystems.

It has been suggested that the synchrony between availability of N mineral and plant requirement can be help by the bank mechanism (Fontaine and Barot, 2005; Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). The bank mechanism is based on the modulation of microbial activities through two microbial groups specialized in the destruction or the building of SOM according to the concentration of N in the soil solution. A scarcity of mineral N in the rhizosphere due to a high N uptake by plant induces the destruction of SOM leading to a release of mineral N in the soil solution (N mineralization), which is available for plant growth. In contrast, high availability of mineral N in the soil solution due to low plant uptake leads to a sequestration of N in SOM (N immobilization). Consequently, the bank mechanism suggests that the N mineralization-immobilization rotation of soil adjusts to plant demand (plant N uptake) that fluctuates with environmental factors (e.g. seasonal variation of light).

According to the bank mechanism, the destruction of SOM involves the rhizosphere priming effect (RPE) (Fontaine et al., 2011). The RPE is defined by a change of SOM decomposition due to the presence of living roots supplying soil microorganisms with energy-rich compounds including rhizodeposits (exudates, mucilage, cell debris (Liljeroth et al., 1994; Kuzyakov, 2002; Shahzad et al., 2015). Consequently, rhizodeposits are essential for the destruction of SOM; suggesting that their availabilities in the soil solution have a key role in the bank mechanism.

In annual crop systems, microbial activities controlling the soil offer of nutrients are often disconnected from plant N demand (Crews and Peoples, 2005; Bodson and Vandenberghe, 2013; Crews et al., 2016). Consequently, in spring, when the plant N demand is high, microbial activities do not provide enough soluble nutrients making essential the fractionated use of fertilizer across the plant-growing season. In contrast, when the plant N demand is low (autumn, winter) mineral N in excess in soil solution is lost. The origin of this plant-soil desynchronization is poorly understood and can be due to different agricultural practices, which have an effect on microbial communities: tillage, pesticides, exportation of large amount of

carbon and nutrients and an absence of permanent cover (Lynch and Panting, 1980; Follett and Schimel, 1989; Perucci et al., 2000). In this study, we focused on the impact of the absence of permanent cover containing perennial species on the functioning of plant-soil systems.

Perennial species importantly contribute to the functioning of many ecosystems by promoting microbial activities (Culman et al., 2010; Crews et al., 2016; Duchene et al., 2017). They maintain a photosynthetic activity throughout the year leading to (1) continuous mineral N interception (Vertès and Decau, 1992); (2) continuous soil C input through rhizodeposits to soil microorganisms. The allocation of C to belowground part (roots and rhizodeposits) is 1.5 to 4 fold higher with perennial species than annual species (Glover et al., 2010; Pausch and Kuzyakov, 2018). As a result, the microbial biomass and mineralization-immobilization N fluxes are increased by a factor of three under perennial plant species compared to annuals (Lynch and Panting, 1980; Recous et al., 1996; Culman et al., 2010). Consequently, a better understanding of the microbial regulations in place in permanent cover containing perennial species could help to conceive agroecological systems allowing the restoration of the plant-soil synchronization in cropping systems.

The aim of this study was to test whether soil offer adjusts to plant demand (bank mechanism) in three models of land use: grassland, wheat monocrop and grassland-wheat intercrop. The land use treatment was crossed with two levels of N fertilization (40 and 200 kg N ha⁻¹ year⁻¹). We hypothesized that 1) the presence of perennial species in grassland harbors the bank mechanism contributing to a plant-soil synchronization, 2) wheat monocrop characterized by annual species does not harbor the bank mechanisms and 3) perennial species present into the grassland-wheat intercrop restore the bank mechanism. The adjustment of soil N offer to plant N demand was investigated by correlating soil N fluxes to photosynthetic activity of plant cover. In order to characterize the soil offer, the mineralization-immobilization turnover (MIT) was measured at two key seasons (spring and winter). The delta between gross

N mineralization and immobilization (delta MIT) has been calculated to estimate the soil offer. Soil offer decreases when delta MIT decreases. The RPE was also measured over the year as an indicator of SOM destruction. Plant N demand was characterized by measuring gross primary production (GPP). The consequences of the regulations set up by the plant-soil systems on ecosystem services (production and N leaching) were also investigated after one year of experiment.

2. Materials & Methods

2.1. Experiment presentation and soil sampling

The experimental platform combined continuous CO₂ exchange measurements and plant labeling with ¹³C depleted CO₂ from fossil fuel origin in 28 independent plant-soil mesocosms over one year. The mesocosms consisted of a buried belowground part (100 cm height, Ø 25 cm) and two aboveground chambers (90 cm height, Ø 25 cm). A transparent aboveground chamber poly-methyl methacrylate (PMMA) was used, ensuring ambient light conditions in the mesocosms. The transparent chamber was fixed to the belowground pot with clips permitting its removal in order to replace it by a dark chamber (opaque PVC) for RPE measurements. A perforate plate covered by a mesh preventing root penetration was placed at 90 cm depth in the belowground part, building a tank (10 cm high) collecting leachates. Further details on the experimental platform are described in Cros et al. (2019).

In order to avoid any perturbation of plant-soil CO₂ fluxes due to soil sampling, a second experimental device was set up dedicated to destructives measurements of the plant-soil system, allowing root biomass, microbial biomass and mineralization-immobilization turnover measurements. It consisted of a greenhouse supplying by ambient air and containing 96 pots (100 deep cm, Ø 10 cm). These pots were set up in the same time and at the same place (Clermont-Ferrand, 45°46'28"N 3°08'32.6"E) than the mesocosms and the management (fertilization, aboveground biomass harvests) was the same.

The soil used in this study was a drained Cambisol sampled from an upland grassland in central France (Theix, 45° 43' N, 03° 01' E). The five centimeters corresponding to the root mat were removed and the soil from three distinct layers was sampled (5-20cm, 20-50cm, 50-90cm). The fresh soil of the three layers was separately sieved at one cm in order to remove biggest stones. Then the soil was transferred in the mesocosms by reconstituting the natural layering of the sampled soil column (5-20cm, 20-50cm, 50-90cm, respectively). Soil properties are presented in the **table 4.1**. Soil moisture was measured with sensors (Decagon ECH₂O 5TM and ECHO 5, Pullman, USA) inserted at 15 depth and was maintained at about 60% of water field capacity in surface.

Table 4. 1: Soil properties of the three soil layers. Means are presented with standard errors.

Soil layers	pH	Soil organic carbon (g kg ⁻¹ soil)	Mineral N (mg N kg ⁻¹)
H1 (5-20cm)	6.29 ± 0.14	30.28 ± 0.32	17.70 ± 5.41
H2 (20-50 cm)	6.63 ± 0.04	25.27 ± 0.51	7.85 ± 0.58
H3 (50-90cm)	6.68 ± 0.09	17.62 ± 0.21	9.25 ± 0.89

2.2. Plant sowing and land use management

Seven treatments with four replicates including three land use models and one bare soil control were conducted. The land use models corresponded to three plant assemblages and three plant species: grassland (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*), wheat in monocrop (*Triticum aestivum* var. *lennox*) and an agroecological system where wheat was introduced in a grassland named “grassland-wheat intercrop”. The three plant assemblages were submitted to two level of N fertilization (40 kg N ha⁻¹ year⁻¹ and 200 kg N ha⁻¹ year⁻¹) (**Table 4.2**). *Lolium perenne*

and *Trifolium repens* were sown in September 2016 at a density of 15 kg ha⁻¹ and 2 kg ha⁻¹, respectively. In order to ensure the establishment of wheat in intercrop, the wheat has been transplanted in mesocosms in February 2017 at three leaves stage and with a density of 300 plants m⁻². All planted pots were fertilized with phosphorus (60 kg P₂O₅ ha⁻¹) and potassium (200 kg K₂O ha⁻¹) in March 2017. The N inputs (NH₄-NO₃ solution) were fractioned in two times for the grassland and the wheat monoculture and three times for the agroecological system according to physiological stages (Supplementary Tables and Figure, **Table S1**). The control soils were not fertilized.

Table 4. 2 : Experimental design and treatment codes used in this study, including three plant species and two levels of N fertilization. G (grass) stands for English ryegrass, L (legume) for white clover, W for wheat, N- for low nitrogen fertilizer (40 kg N ha⁻¹ year⁻¹), N+ for high nitrogen fertilizer (200 kg N ha⁻¹ year⁻¹). An unplanted control treatment was also conducted without N fertilization.

Land use models	Nitrogen fertilization (kg N ha ⁻¹ year ⁻¹)	
	40	200
Grassland (<i>Lolium perenne</i> + <i>Trifolium repens</i>)	GLN-	GLN+
Agroecological system (<i>Triticum aestivum</i> + grassland)	WGLN-	WGLN+
Conventional wheat crop (<i>Triticum aestivum</i>)	WN-	WN+

Plant aboveground biomass was harvested several times depending on the management of each land use (**Table S2**). More precisely, grassland species were cut nine times over the year and the wheat was harvested once. The first four harvests were pooled in order to reach a sufficient amount of plant material for analysis. In order to obtain the annual aboveground yield of each land use, the total biomass of each harvest were summed and converted in ton hectare ($\text{t DM ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$). The forage, straw and grain compartments were analyzed separately. For each harvest, aboveground plant material was ground and analyzed using an elemental analyzer (EA; Carlo Erba, Rodana, Italy) in order to determine the plant C and N content.

2.3. Determination of gross primary production using CO₂ fluxes measurements

Continuous CO₂-exchange was quantified by comparing the CO₂ concentration of the air entering and leaving the mesocosms at a frequency of measurements of 2 hour⁻¹ (differential CO₂ concentration). Simultaneously, air temperature and photosynthetic active radiation (PAR) were measured at a frequency of 12 hour⁻¹.

Net ecosystem productivity (NEP) was calculated by: (1) converting the differential CO₂ concentrations in a flux of CO₂ using the airflow crossing the mesocosm ($\text{m}^3 \text{ mn}^{-1}$); (2) converting this flux of CO₂ in mole mn^{-1} using the ideal gas equation; (3) converting this flux in $\text{g C min}^{-1} \text{ m}^{-2}$ by using the molar mass of carbon. In order to distinguish the NEP into gross primary production (GPP) and ecosystem respiration (ER), the method of partitioning proposed by Reichstein et al. (2005) was adapted to our dataset. This partitioning is based on the regression of nighttime respiration with temperature to estimate the ecosystem respiration according to Lloyd and Taylor (1994) equations. NEP and GPP measured at each time interval were integrated by day ($\text{g C day}^{-1} \text{ m}^{-2}$). More details on the CO₂ exchange measurements and calculations are available in Cros et al. (2019).

2.4. Measurements of rhizosphere priming effect and plant C input in soil using ^{13}C isotopic labeling.

2.4.1. The rhizosphere priming effect

The RPE of the plant-soil system were measured bimonthly or monthly using an adapted version of the incubation method developed by Shahzad et al. (2012) presented in details in Cros et al. (2019). For this purpose, the transparent chambers were replaced by dark PVC chambers and left in place for an incubation of 24 hours. The absence of light stopped the photosynthesis preventing re-assimilation of soil-derived CO_2 by plants, thus permitting RPE estimation. At the beginning and after 24 hours of incubation, gas samples from each chamber were pumped and stored in an airtight glass bottle (120 mL) for CO_2 analysis. The CO_2 concentration in gas sample was determined by gas chromatography (Gas Chromatograph Clarus 480, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Using the gas chromatograph, methane and N_2O content of gas samples were also measured in order to check that their concentration was low to avoid any perturbation of delta ^{13}C analysis. The ^{13}C isotopic composition of CO_2 was measured with a CRDS Analyzer for Isotopic CO_2 (Picarro, Santa Clara, CA, USA) coupled to the small sample isotope module (SSIM). The change in CO_2 concentrations within 24 hours was transformed in quantity of C- CO_2 released by the plant-soil system by using the ideal gas equation and volume, temperature and pressure of chambers. These calculations allowed quantifying the total released C- CO_2 of the plant-soil system (R_t , g C d $^{-1}$ m $^{-2}$). Using the classical isotope mass balance equations, the soil-derived CO_2 -C (R_s , g C d $^{-1}$ m $^{-2}$) was separated from plant-derived CO_2 -C (R_p , g C d $^{-1}$ m $^{-2}$).

$$R_s + R_p = R_t \quad (1)$$

$$R_s \times A_s^{13} + R_p \times A_p^{13} = R_t \times A_t^{13} \quad (2)$$

where A_s^{13} is the ^{13}C abundance of soil-derived carbon, A_p^{13} is the ^{13}C abundance of plant C, A_t^{13} is the ^{13}C abundance of total CO_2 released from the plant-soil system. We used the ^{13}C

abundance of aboveground plant biomass for A_p^{13} and the ^{13}C abundance of soil organic carbon at the beginning of the experiment for A_s^{13} . To this end, plant biomass corresponding to the five harvests (see section II.2) and initial soil were analyzed with an elemental analyzer (EA; Carlo Erba, Rodana, Italy) coupled to an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; Elementar, Langenselbold, Hesse, Germany), after material drying (60°C for 24h) and grinding.

Equations 4 and 5 were solved to calculate R_s as follows:

$$R_s = R_t \times (A_t^{13} - A_p^{13}) / (A_s^{13} - A_p^{13}) \quad (3)$$

The rhizosphere priming effect (RPE, $\text{g C d}^{-1} \text{ m}^{-2}$) was calculated as:

$$\text{RPE} = R_s - R_{\text{control}} \quad (4)$$

where R_{control} is the CO_2 released by the unplanted control soil ($\text{g C d}^{-1} \text{ m}^{-2}$).

2.4.2. The new plant-originated soil organic carbon

The new plant-originated soil organic carbon (SOC_{new}) corresponding to the incorporation of fresh C from plant into the soil (rhizodeposits and plant litter) was estimated at the end of the experiments by sampling one soil core by mesocosm at a depth of 0-10cm. The soil and root sampled in the cores were grounded and analyzed to determine the C content and the $\delta^{13}\text{C}$ by using an elemental analyzer (EA; Carlo Erba, Rodana, Italy) coupled to an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; Elementar, Langenselbold, Hesse, Germany). The plant C input into the soil was estimated using the following equation:

$$\text{SOC}_{\text{new}} = \text{SOC}_{\text{end}} \times \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{start}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{end}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{start}} - \delta^{13}\text{C}_p} \quad (5)$$

where SOC_{end} and $\delta^{13}\text{C}_{\text{end}}$ are respectively the SOC concentration and $\delta^{13}\text{C}$ at the end of the experiment, $\delta^{13}\text{C}_{\text{start}}$ is the $\delta^{13}\text{C}$ of SOC at the start of the experiment and $\delta^{13}\text{C}_p$ is the $\delta^{13}\text{C}$ of plant biomass.

2.5. Microbial biomass and mineralization-immobilization turnover

The following soil measurements were done on pots dedicated to destructive measurements in May and November 2017. The soil of the first layer (5 – 20 cm) was sampled and sieved at 2mm.

2.5.1. Microbial biomass

Microbial biomass was measured in May and November by using a modified version (Fontaine et al., 2011) of the fumigation-extraction method proposed by Vance et al. (1987). Briefly, 5 g of soil was extracted with 20 mL of 30 mM K₂SO₄ after 1 hour shaking. Another 5 g of soil sample was fumigated with alcohol free chloroform under vacuum conditions in a glass desiccator for 24 hours. Chloroform was removed from the soil by ventilation and soils were extracted with 20 mL of 30mM K₂SO₄. Samples were analyzed for C content. Microbial biomass (MB) was calculated with the following equation:

$$MB = \frac{1}{k} \times (C_f - C_{fn}) \quad (6)$$

Where C_f and C_{fn} were the C content obtained from extraction of fumigated and non-fumigated soil samples, respectively; k is the extraction yield of microbial biomass (k=16% Fontaine et al., 2004).

2.5.2. Mineralization-immobilization turnover

Mineralization immobilization turnover (MIT) was determined using the ¹⁵N pool dilution technique (Davidson et al., 1991; Recous et al., 1995; Mary et al., 1998).

Soil incubation: The labeled NH₄-NO₃ solution was added with a spray on 30g of dried soil to reach 30mg N-NH₄ kg⁻¹ (28.8 N-NH₄ kg⁻¹ of unlabeled N as NH₄Cl and 1.2 N-NH₄ kg⁻¹ of labeled ¹⁵N as ¹⁵NH₄Cl of 99atom% ¹⁵N) and 13.3mg N-NO₃ kg⁻¹ (as KNO₃) on 30g of dried soil. The volume of the added labeled solution was the same (3mL) irrespective of treatments because the soil moisture was fixed at a water potential of -10kPa by soil drying or water

addition. Soil was mixed to homogenize the labeled solution in the soil. Then, soil was transferred into closed glass bottle for incubations at 21°C for 2 hours and 26 hours, which represented the start (t0) and the end of incubation (t1), respectively. This resulted in a total incubation of 24hours.

Inorganic N and ^{15}N determination: Soil inorganic N content (N-NH_4^+ and N-NO_3^-) was measured before and after the addition of labeled N at t0 and t1. Inorganic N content was extracted in tubes with KCl 2M (62.5 mL of solution in 25g of dried soil). Tubes were shaken during 30 minutes at 300 rpm and then centrifuged at $3000 \text{ rev min}^{-1}$ for 5 min. Extracts were filtered (0.45 mm) and analyzed. For the ^{15}N measurements, NH_4^+ and NO_3^- were separated by distillation with MgO and Dewarda's alloy. To this purpose, the excess of KCl extraction solution was transferred into closed bottle diffusion traps in the presence of either MgO or Dewarda's alloy and NH_4^+ and NO_3^- were collected using acidified filter paper disks. Inorganic ^{15}N was measured using an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; EA; Carlo Erba, Rodana, Italy).

Organic N and ^{15}N determination: In order to eliminate more than 99% of KCl, successive water washing of the tubes containing the soil used for KCl extractions was done. Soils were dried at 60°C for 24h and grounded. Organic N and its isotopic composition were determined using an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS; EA; Carlo Erba, Rodana, Italy).

Calculation of N fluxes: We determined gross N mineralization (m) ($\text{mg N kg soil}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) and immobilization (i) rate ($\text{mg N kg soil}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) by using the following equations (Davidson et al., 1991; Mary et al., 1998):

$$m = \frac{M_0 - M_1}{t} \times \frac{\log\left(\frac{H_0 \times M_1}{H_1 \times M_0}\right)}{\log\left(\frac{M_0}{M_1}\right)} \quad (7)$$

Where M0 was the initial (t0) $^{14+15}\text{NH}_4$ pool (mg N kg⁻¹ dry soil), M1 was the post incubation (t1) $^{14+15}\text{NH}_4$ pool (mg N kg⁻¹ dry soil), H0 was the initial (t0) $^{15}\text{NH}_4$ pool (mg N kg⁻¹ dry soil), H1 was the post incubation (24h) $^{15}\text{NH}_4$ pool (mg N kg⁻¹ dry soil) and t was the time of soil incubation (1 day, 24 hours). The gross N immobilization rate was calculated by using a constant rate called k and the difference of organic ^{15}N content between initial and post incubation content (mg N kg⁻¹ dry soil) called $V_{t=1}$.

$$i = \frac{V_{t=1}}{\frac{H_0}{M_0} \times \left(\frac{1-e^{-k}}{k} \right)} \quad (8)$$

$$k = -\ln \left(\frac{H_1 \times M_0}{H_0 \times M_1} \right) \quad (9)$$

In order to assess the soil offer, we calculated the difference between gross N mineralization and immobilization (ΔMIT).

$$\Delta \text{MIT} = m - i \quad (10)$$

2.6. Leaching measurements

The N leachates were collected in each mesocosm, first in winter 2017 and several times between March 2018 and April 2018 after stimulating two leaching events leading to a total drainage of 242 mm in average. The volume of collected water was measured and the content of NH_4^+ and NO_3^- was determined using a segmented flow colorimetric analyzer (AA3, 1 canal, Bran+Luebbe, Norderstedt, Germany). In order to determine N leaching, the drained volume of water was multiplied by the concentration of NH_4^+ and NO_3^- (Eq. 11). In our study, N leaching is expressed in kg of N- NO_3 ha⁻¹ because the concentration of NH_4^+ was null.

$$\text{N leaching} = \text{Volume} \times [\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-] \quad (11)$$

2.7. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test the effect of treatments on production yield (aboveground biomass and N content), N leaching, root biomass, new plant-

originated SOC, microbial C biomass, gross N mineralization and immobilization and mineral N availability. Then, Tukey's *posthoc* tests were performed to determine the difference between treatments. The difference between dates (May and November) was test for each treatment with pairwise test of Student or Wilcoxon Mann Whitney. The requirements for linear model analysis were checked and log transformations were done if necessary. Relationships (1) between the rhizosphere priming effect (RPE) and the gross primary production (GPP) for seven RPE measurements and (2) between the delta MIT and GPP for the two MIT measurements (May and November) were tested using Spearman correlations. Linear mixed models were used to draw regression lines for the relationships. Statistical analysis were done using a significance level of $P < 0.05$ (*) and were performed in R (R Core Team, 2013, R version 3.4.3).

3. Results

3.1. Provisioning and regulating ecosystem services

Total aboveground production was significantly higher in grassland and grassland-wheat intercrop under high level of N fertilization (N+) in comparison with wheat monocrop (**Table 4.3**) (* $P < 0.05$). The grassland-wheat intercrop and grassland production under low level of fertilization were not significantly different from both grassland N+, grassland-wheat intercrop N+, and wheat monocrop N+ and N-. N fertilization tended to increase total aboveground production but the effect was not significant.

N yield in harvested aboveground biomass was significantly higher in grassland and grassland-wheat intercrop than in wheat monocrop. N fertilization had no effect on N yield (**Table 4.3**) (* $P < 0.05$).

Forage production was negatively affected by the presence of wheat under high level of fertilization but not when the fertilization was low (**Table 4.3**) (* $P < 0.05$). The wheat straw

and grain yield were significantly higher in wheat monocrop compared to grassland-wheat intercrop. In wheat monocrop, N fertilization had no effect on wheat yield whereas it had significantly increased the yield in intercropping (**Table 4.3**) (*P < 0.05). For example, the grain yield was 2.3 fold and 6.2 fold higher in wheat monocrop N- and N+ compared to intercrop N- and N+.

N leaching had the same order of magnitude in wheat monocrop and bare soil (**Table 4.3, Fig. S1**) (*P < 0.05). N leaching was in average 29 and 80 fold higher in wheat monocrop compared to grassland-wheat intercrop and grassland, respectively (**Table 4.3**) (*P < 0.05). No effect of N fertilization was observed on N leaching.

Table 4. 3 : Provisioning and regulating services. Provisioning services include the production of total biomass ($\text{t ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$), forage, straw and grain and nitrogen yield ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$). The regulating service was the nitrogen leaching ($\text{N-NO}_3 \text{ kg}^{-1} \text{ ha}^{-1}$). Means are presented with standard errors. Letters indicate significant differences between treatments (one-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, $*P < 0.05$).

Species	<i>Lolium perenne</i> + <i>Trifolium repens</i> (grassland)				<i>Triticum aestivum</i> + grassland		<i>Triticum aestivum</i>	
	kg N $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	40	200		40	200	40	200
N fertilization treatments								
Dry matter Yield								
Total	t DM $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	ab 28.29 ± 1.59	a 34.13 ± 1.44		ab 28.65 ± 0.92	a 33.21 ± 1.01	b 25.64 ± 1.51	b 26.18 ± 1.41
Forage	t DM $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	b 28.29 ± 1.60	a 34.13 ± 1.44		bc 25.38 ± 0.91	c 23.18 ± 0.53	x	x
Straw	t DM $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	x	x		c 1.78 ± 0.25	b 5.18 ± 0.48	a 15.14 ± 0.64	a 15.71 ± 0.50
Grain	q $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	x	x		c 14.85 ± 2.17	b 48.45 ± 3.09	a 92.48 ± 10.76	a 116.09 ± 4.35
Nitrogen Yield								
Total	kg N $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	a 663.86 ± 58.30	a 652.58 ± 31.61		a 729.81 ± 26.13	a 655.58 ± 27.03	b 274.36 ± 39.99	b 314.01 ± 25.47
Forage	kg N $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	a 663.86 ± 58.30	a 652.58 ± 31.61		a 702.65 ± 27.16	a 552.75 ± 20.61	x	x
Straw	kg N $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	x	x		c 8.93 ± 1.36	b 26.15 ± 2.79	a 90.64 ± 6.45	a 94.77 ± 8.35
Grain	kg N $\text{ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$	x	x		c 18.35 ± 2.52	b 76.70 ± 5.10	a 183.78 ± 21.98	a 234.39 ± 43.89
Regulation services								
Nitrogen leaching	N-NO ₃ $\text{kg}^{-1} \text{ ha}^{-1}$	a 0.48 ± 0.15	a 0.43 ± 0.16		a 1.17 ± 0.51	a 1.78 ± 0.72	b 32.52 ± 4.49	b 47.57 ± 3.88

3.2. Ecosystem functioning

3.2.1. Gross primary production

Large variations of GPP were observed over the year depending on temperature, cuts and plant cycle vegetation (**Fig. 4.1**). GPP was always significantly different from zero for grassland and grassland-wheat intercrop throughout the year, whereas GPP was null in wheat monocrop from November 2016 to March 2017 and from July 2017 to November 2017 (end of the experiment). In grassland and grassland-wheat intercrop, GPP rapidly increased from March 2017 to May 2017 when GPP suddenly decreased following a cut. The same pattern was observed for these treatments from May to July and July to October (**Fig. 4.1**). In wheat monocrop, GPP rapidly increased from the end of March 2017 to the end of May 2017, when a plateau is reached until June. From the beginning of June, GPP rapidly decreased until be null in July (**Fig. 4.1**). The wheat was harvested the 6th of July 2017. Fertilization had a positive effect on GPP for grassland and grassland-wheat intercrop from April to July 2017. From July 2017 to November 2017, the positive effect of fertilization was observed only for grassland-wheat intercrop. In contrast, no effect of fertilization was observed in wheat monocrop (**Fig. 4.1**).

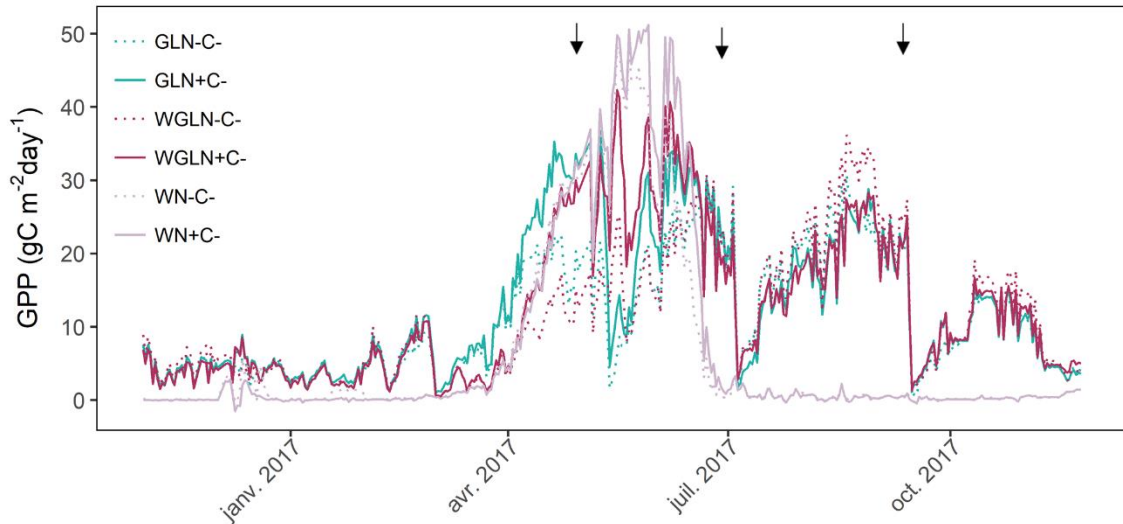


Figure 4. 1 : Dynamic of gross primary production (GPP) from the 1th November 2016 to the 24th November 2017 for the different treatments. Purple lines stand for wheat monocrop, red lines represent the grassland-wheat intercrop and the green lines correspond to the grassland. Solid lines represent the high N fertilization treatments whereas the dotted lines stand for low N fertilization. Arrows stand for plant cuts. For treatment codes, see Table 4.2.

3.2.2. Rhizosphere priming effect

Overall, the variation of RPE followed the dynamic of GPP except for wheat monocrop from 12th May to 23th May 2017 where the RPE decreased while the GPP was maintained (**Fig. 4.2**). Fertilization had a positive effect on RPE for grassland-wheat intercrop from April to July 2017 (Wilcoxon Mann Whitney, * $P < 0.05$). Fertilization had a positive effect on RPE for grassland only the 12th May 2017. In contrast, no effect of fertilization was observed in wheat monocrop.

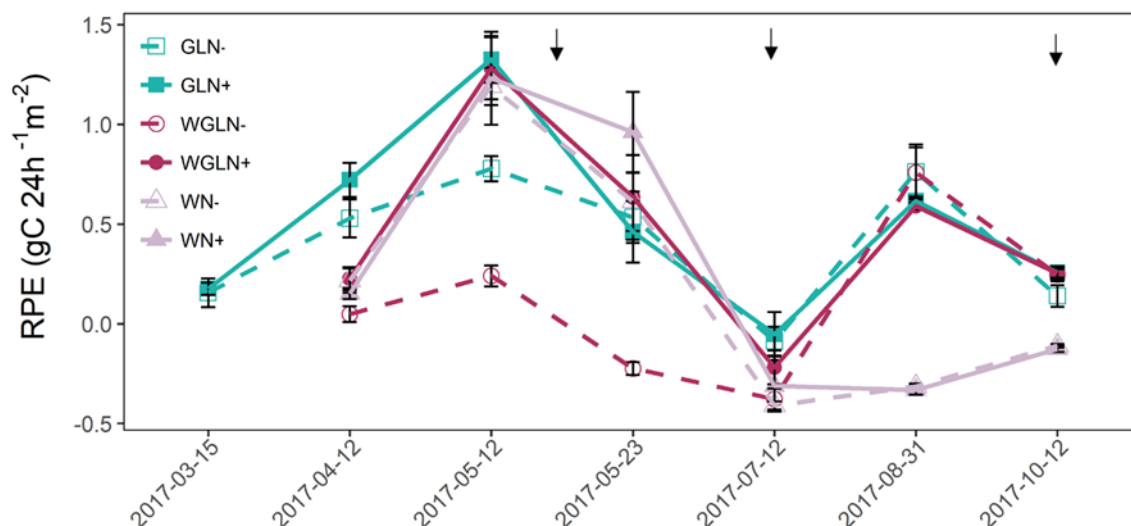


Figure 4. 2: Evolution of rhizosphere priming effect (RPE) over the growing season period for each treatment. Purple lines stand for monocrop wheat treatments, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland treatments. Dotted lines represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Arrows stand for plant cuts. Error bars represent standard error of means. Arrows indicate aboveground biomass harvests. For treatment codes, see Table 4.2.

3.2.3. Belowground biomass and new plant-originated soil organic carbon

In May, root biomass was significantly higher in grassland than in grassland-wheat intercrop and wheat monocrop (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.3A**). At this date, a positive effect of the fertilization on root biomass was observed in grassland-wheat intercrop. From May to November, root biomass significantly increased in grassland and grassland-wheat intercrop and significantly decreased in wheat monocrop (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.3A**). In November, the root biomass of grassland and grassland-wheat intercrop were 11.8 and 7.6 fold higher than wheat monocrop, respectively (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.3A**). No effect of fertilization was observed at this date.

Overall, the new plant-originated SOC was significantly higher in grassland and grassland-wheat intercrop compared to wheat monoculture (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.3B**). The N fertilization tended to increase the new plant-originated SOC. This increase was significant only for grassland-wheat intercrop (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.3B**).

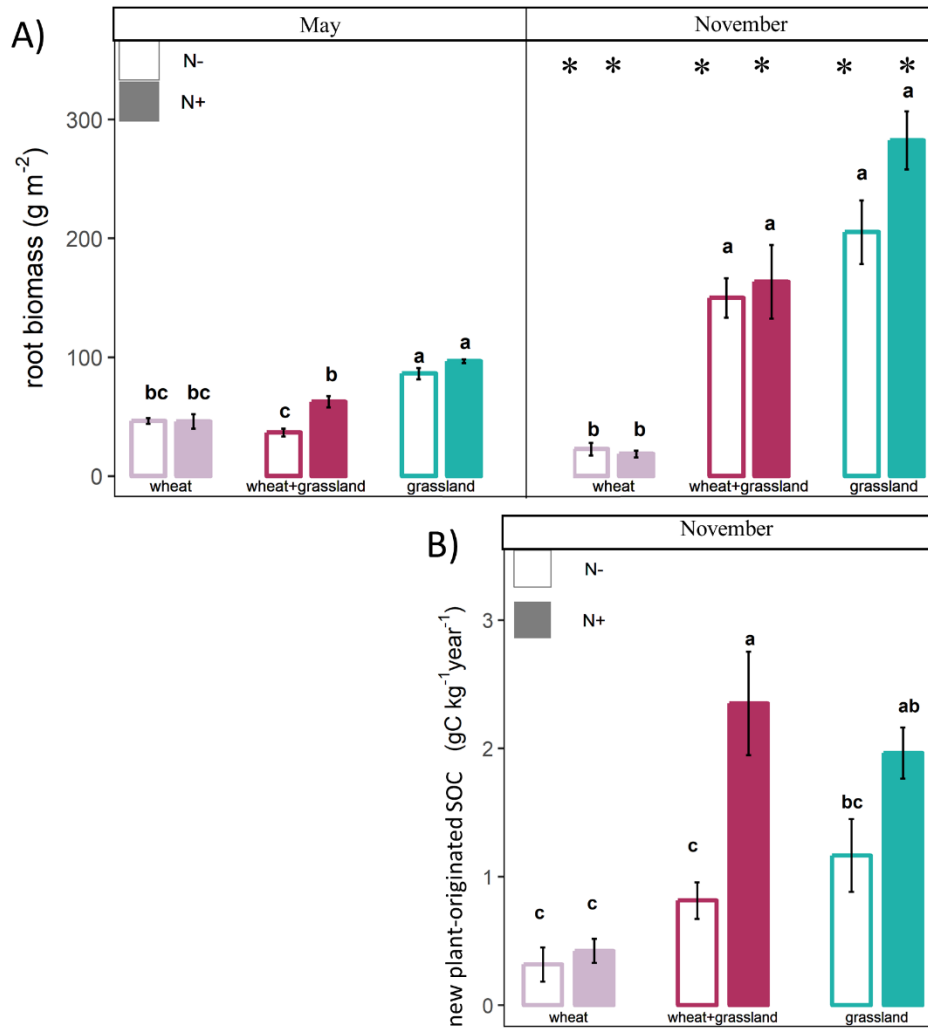


Figure 4. 3: (A) Root biomass measured in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment; and (B) new plant-originated soil organic carbon (SOC) for the 0-10cm depth layer across treatments measured in November 2017. Purple bars stand for monocrop wheat treatments, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland treatments. Filled bars represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Error bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between treatments (one-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, * $P < 0.05$).

3.2.4. Microbial carbon biomass

No difference in microbial C was observed between treatments in May. In November, the microbial C was higher in grassland and in grassland-wheat intercrop compared to bare soil. No effect of N fertilization was observed. (**Fig. S2**) (* $P < 0.05$).

3.2.5. Mineralization-immobilization turnover

Overall, the gross N mineralization was higher in the presence of plants, even if the difference was not always significant (**Fig. 4.4A**). Fertilization and land use had no significant effect on gross N mineralization (**Fig. 4.4A**) (* $P < 0.05$). The gross N mineralization significantly increased from May to November in the grassland and grassland-wheat intercrop (**Fig. 4.4A**) (* $P < 0.05$).

In May, the gross N immobilization was significantly higher in grassland than in bare soil and wheat monocrop (**Fig. 4.4B**) (* $P < 0.05$). The grassland-wheat intercrop treatments were intermediate and not significantly different from the other treatments, except grassland under low level of fertilization. The gross N immobilization increased from May to November for grassland and grassland-wheat intercrop (**Fig. 4.4B**) (* $P < 0.05$). In November, the gross N immobilization was significantly higher in grassland and grassland-wheat intercrop than in bare soil and wheat monocrop (**Fig. 4.4B**) (* $P < 0.05$). Moreover, N fertilization had no significant effect on gross N immobilization irrespective of measurement dates (**Fig. 4.4B**) (* $P < 0.05$).

The delta MIT was negative irrespective of treatments and measurement dates (**Fig. 4.4C**). In May, delta MIT was not different between treatments except for grassland N- which was lower than wheat monocrop and grassland-wheat intercrop N- (**Fig. 4.4C**) (* $P < 0.05$). Delta MIT significantly decreased from May to November in grassland and grassland-wheat intercrop (**Fig. 4.4C**) (* $P < 0.05$). In November, delta MIT were lower in grassland and grassland-wheat intercrop than in bare soil and wheat monocrop. These difference were significant only for

grassland and grassland-wheat intercrop N+ (**Fig. 4.4C**) (*P < 0.05). Moreover, N fertilization had no significant effect on delta MIT.

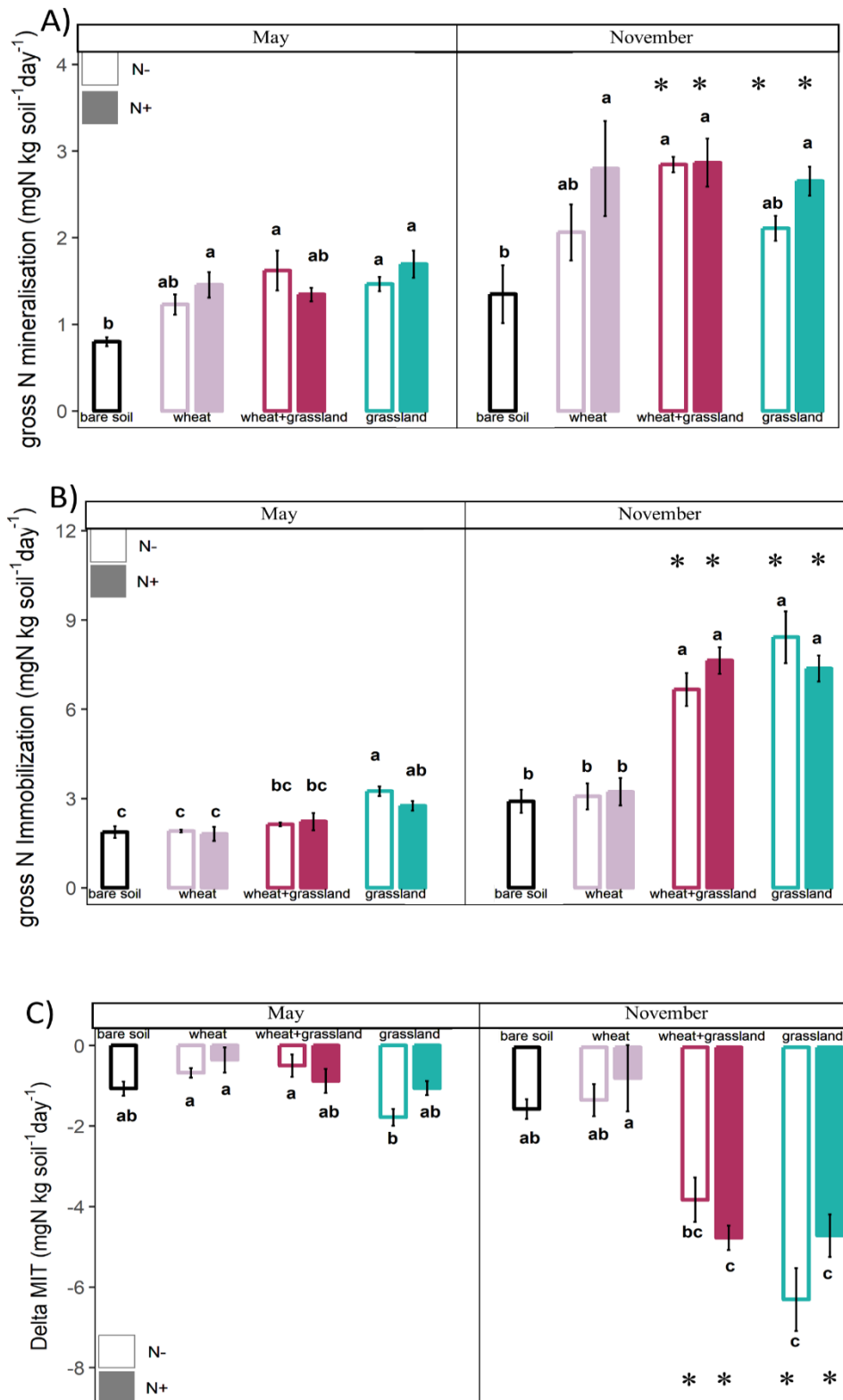


Figure 4. 4 : (A) Gross nitrogen (N) mineralization, (B) immobilization and (C) delta of gross N mineralization and immobilization measured in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment. Purple bars stand for monocrop wheat treatments, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland treatments. Filled bars represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Error bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between treatments for each date (one-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, * $P < 0.05$) and stars represent significant difference between dates for each treatment (pairwise student test, * $P < 0.05$).

3.2.6. Mineral nitrogen in soil solution

In overall, mineral N content in the soil solution of wheat monocrop was significantly higher compare to the grassland and grassland-wheat intercrop. The soil mineral N content was not different between wheat monocrop and bare soil except for the wheat N- in May (**Fig. 4.5**) (* $P < 0.05$). From May to November, mineral N content in the soil solution increased for bare soil and wheat monoculture whereas it decreased for grassland under low fertilization level (**Fig. 4.5**) (* $P < 0.05$). The N fertilization had no significant effect on N mineral content in the soil solution for grassland and grassland-wheat intercrop. The N fertilization had a significant positive effect on N mineral content for wheat monocrop only in May.

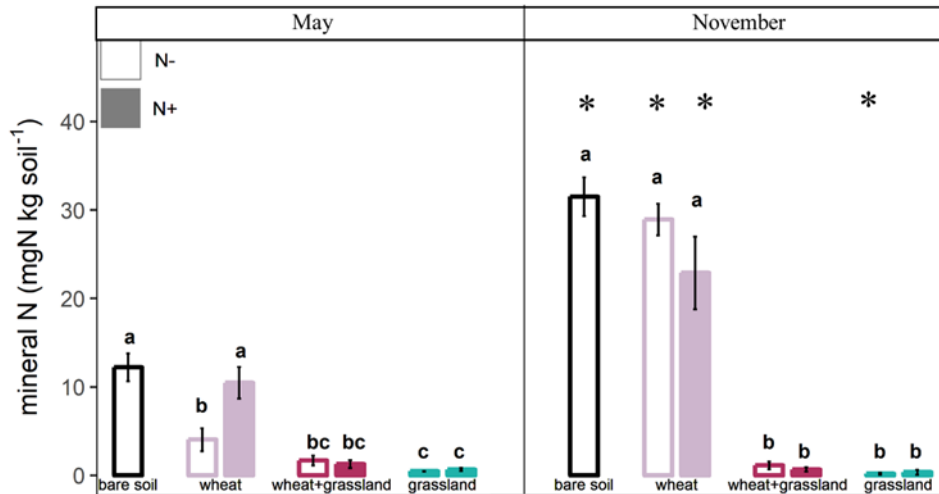


Figure 4. 5 : Mineral nitrogen (N) in soil solution in May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment. Purple bars stand for monocrop wheat treatments, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland treatments. Filled bars represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Error bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between treatments for each date (one-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, *P<0.05) and stars represent significant difference between dates for each treatment (pairwise student test, *P<0.05).

3.2.7. Link between belowground and aboveground activities

An overall significant positive relationship was observed between RPE and GPP ($R^2 = 0.71$, *P<0.05) (**Fig. 4.6**). This relationship between RPE and GPP was observed for each land use ($R^2 = 0.73$, 0.81 and 0.79 for grassland, grassland-wheat intercrop and wheat monocrop, respectively, *P<0.05).

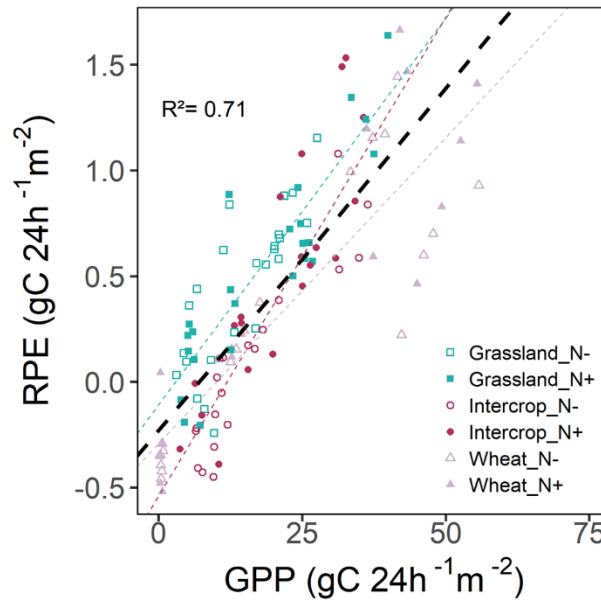


Figure 4. 6 : Relationships between the rhizosphere priming effect (RPE) and the gross primary production (GPP) for seven RPE measurements across land uses. Purple triangles stand for wheat monocrop, red circles represent the grassland-wheat intercrop and the green squares correspond to the grassland. Filled shapes represent the high N fertilization treatments whereas empty shapes stand for low N fertilization. Dotted lines represented linear regressions between the two variables.

The delta MIT was positively correlated to the GPP for grassland and grassland-wheat intercrop with a coefficient of correlation of 0.88 and 0.85, respectively (* $P < 0.05$) (**Fig. 4.7**). In contrast, no relationship between delta MIT and GPP was found for the wheat monocrop ($R^2 = 0.21$, * $P > 0.05$) (**Fig. 4.7**).

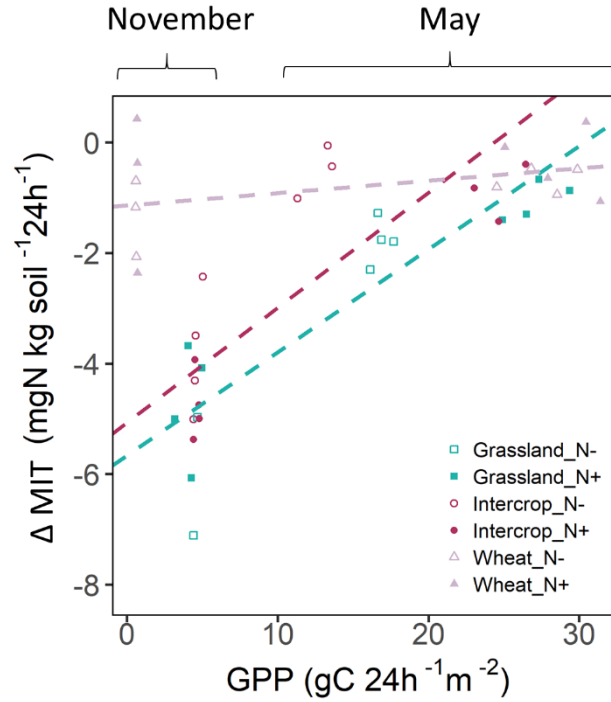


Figure 4. 7 : Relationships between the delta MIT (gross N mineralization minus gross N immobilization) and GPP for the two measurements (May and November) across the land uses. Purple triangles stand for monocrop wheat treatments, red circles represent the grassland-wheat intercrop and the green squares correspond to the grassland treatments. Filled shapes represent the high N fertilization treatments whereas empty shapes stand for low N fertilization. Dotted lines represented linear regressions between the two variables.

4. Discussion

4.1. Demonstration of the existence of the bank mechanism in grassland

The close positive relationships between both RPE and GPP and delta MIT and GPP (**Fig. 4.6** and **4.7**) are the main findings of our study, supporting the idea of an adjustment between soil offer and plant demand in grassland. Previous studies already pointed the close connection between RPE and GPP by manipulating photosynthetic activity (plant cutting, shadow) or by measuring the plant biomass and suggested such a positive relationship (Kuziyakov and Cheng, 2001; Dijkstra et al., 2006; Shahzad et al., 2012; Huo et al., 2017).

However, the soil offer cannot boil down to the measurement of RPE because the priming effect subsequent to fresh C input does not necessarily translate in release of mineral N (Fontaine et al., 2011). Indeed, the supply of fresh C can also stimulate the immobilization of mineral N by the N-limited microbial populations (Fontaine et al., 2003) while the N released through RPE is firstly incorporated by decomposers before being released due to microbial turnover or excretion. A better characterization of soil offer can be obtained by measuring the N mineralization-immobilization fluxes and calculating the delta MIT. As far as we know, no other experimental study has analyzed the relationship between delta MIT and GPP.

The variations of delta MIT for the two dates (**Fig. 4.7**) highlight the adjustment of soil N offer to plant N demand in grassland across the seasons. More specifically, spring (May) corresponded to high photosynthetic activity (**Fig. 4.1**) and probably to high plant N uptake. Simultaneously soil N fluxes were characterized by the highest potential of soil offer (highest delta MIT) and the highest SOM destruction (RPE) reached during the experiment (**Fig. 4.2, 4.4, 4.7**). The reduction of photosynthetic activity in autumn (November) (**Fig. 4.1**) is followed by a decrease in delta MIT and RPE, thereby promoting the N immobilization and SOM formation (**Fig. 4.2, 4.4, 4.7**). Through these findings measured in the mesocosm plant experiment, we provide new evidences for the existence of the bank mechanism proposed by Fontaine and Barot (2005) and developed in SYMPHONY model (Perveen et al., 2014).

The bank mechanism predicts that N fertilization should favor N immobilization rate instead of N mineralization rate in order to sequester the N exceed in SOM (Fontaine and Barot, 2005; Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). In our study, no effect of N fertilization was observed on the mineralization immobilization turnover (**Fig. 4.4**). This absence of effect of fertilization could be explained by a stimulation of plant growth (**Table 4.3, Fig. 4.1**) and thus an increase of plant N uptake leading to an exhaustion of mineral N in the soil solution (**Fig. 4.5**) in high level of fertilization.

4.2. Perennial species have a key role in the bank mechanism

The adjustment of soil N offer to plant demand across the season was observed for grassland but not for wheat monocrop where the delta MIT was constant irrespective of the measurement dates (**Fig. 4.7**). Moreover, the association of perennial species of the grassland with wheat intercrop allowed to restore the adjustment of soil offer to plant demand (**Fig. 4.7**). These findings strongly suggest that the presence of perennial species is essential to the bank mechanism.

Grassland produced higher root biomass than wheat irrespective of measurement dates (**Fig. 4.2A**). According to the literature, the perennial species of grassland allocate much more biomass to belowground part than annual crops with about 65% and 20% of the total biomass for grassland and annual crop, respectively (Saugier et al., 2001; Zhang et al., 2017; Sun et al., 2018). Consistently, the new plant originated-SOC was higher in grassland than wheat monocrop after one year of implantation (**Fig. 4.3B**). Moreover, plant C inputs (rhizodeposits) into the soil are continuously released due to continuous photosynthesis (**Fig. 4.1**) maintaining microorganism activities and their regulation. In contrast, in wheat monocrop, the microorganisms are fueled with plant C only from March to July corresponding to the wheat life cycle (**Fig. 4.1**). This period is associated to high N plant uptake favoring the microorganisms specialized in the destruction of SOM according to bank mechanism hypothesis (Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). In autumn, in wheat monocrop, the microorganisms are not fueled and the alternation of microorganism communities might not happened, explaining the absence of adjustment of soil N offer to plant N demand over the year.

4.3. The functioning of the different land use allows for variable ecosystem services

The presence of perennial species prevents N leaching in comparison to annual crop. As expected, N leaching in grassland was close to zero (**Table 4.3**) which is in line with other studies estimating null or low N leaching if the N fertilization does not exceed 200-

300 kg N ha⁻¹ year⁻¹ (Benoit, 2007; Ledgard et al., 2011). In contrast, N leaching in wheat monocrop corresponded to about 20% of N input through fertilization (**Table 4.3**) as predicted by Smil (1999), which is not surprising considering the well documented subject (Recous et al., 1996; Tilman et al., 2002; Billen et al., 2013). In grassland-wheat intercrop, N leaching is similar to grassland (**Table 4.3**) meaning that the presence of perennial species closes N cycle avoiding losses.

Grassland produced significantly higher biomass and N yield than wheat monocrop irrespective of N fertilization levels (**Table 4.3**). In grassland-wheat intercrop, total yield was intermediate between the grassland and wheat monocrop. However, grain yield is largely decreased, even more in low level of N fertilization (**Table 4.3**). These findings highlight the poor competitive ability of the wheat for mineral N resource compared to perennial species. Nevertheless, our findings show that the N fertilization can be a mean to manage the crops/perennial species competition.

4.4. Limits of the study

Plant biomass production was extremely high compared to field conditions (Brisson et al., 2010; Herfurth et al., 2015): 6.6 t DM ha⁻¹ year⁻¹ vs 31.21 t DM ha⁻¹ year⁻¹ for grassland and 7 t DM ha⁻¹ year⁻¹ vs 25.91 t DM ha⁻¹ year⁻¹ for wheat. The plant growth conditions of our experiment could explain a high stimulation of photosynthetic activity. First, we worked on a disturbed sieved soil that released large amount of mineral nutrients during the first months of the experiment. Secondly, we worked on mesocosms, which led to a border effect promoting plant light exposition. Thirdly, we irrigated our mesocosms in order to maintain a soil moisture of about 60% of field capacity preventing water deficit. The yield of the following years would be more realistic.

4.5. Implications for designing agroecological systems

An important finding of this study is the restoration of the adjustment of soil offer to plant demand through the association of wheat with perennial species, signifying that perennial species are crucial for a plant-soil synchronization. Consequently, the grain production with perennial cereal or with annual cereal-perennial species intercrop would solve the environmental problems related to cereal production (*i.e.* soil degradation, eutrophication).

The grassland-wheat intercrop induced a strong reduction of wheat yield in comparison to wheat monocrop due to competition between wheat and associate species. Nevertheless, this decrease of production is compensated by the production of forage, which could add value to farming systems. However, we cannot conclude about the direct feasibility of this agroecosystems in field since (1) the plant-soil system was not at the equilibrium; (2) the irrigation system is not realistic of field conditions; (3) the wheat has been transplanted in mesocosms and we cannot insure the success of grain germination on an installed plant cover. Further investigations are required to assess the agronomic feasibility and the economic pertinence of the annual cereal-perennial species intercrop. Concerning the competition between cereal and the associated perennial species, there is a room of improvements by studying plant traits and interactions. Further studies could use the rules of species assemblage of natural ecosystems to find the species mixture warranting the stability of the perennial cover and success of grain production.

References

Benoit, M., 2007. Prairies et qualité des eaux : mesures parcellaires, assolement, et observatoires des pratiques. *Fourrages* (189), 33-50. (2007).

Billen, G., Garnier, J., Lassaletta, L., 2013. The nitrogen cascade from agricultural soils to the sea: modelling nitrogen transfers at regional watershed and global scales. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 368, 20130123. doi:10.1098/rstb.2013.0123

Bodson, B., Vandenberghe, C., 2013. Gestion durable de l'azote au-delà de la seule problématique « nitrate ». *Biotechnologie, Agronomie, Society et Environnement* 4.

Brisson, N., Gate, P., Gouache, D., Charmet, G., Oury, F.-X., Huard, F., 2010. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119, 201–212. doi:10.1016/j.fcr.2010.07.012

Ciais, P., Bala, S., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, R., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le quéré, C., Myneri, R., Piao, S., Thornton, P., 2013. Carbon and other biogeochemical cycles., in: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Crews, T.E., Blesh, J., Culman, S.W., Hayes, R.C., Jensen, E.S., Mack, M.C., Peoples, M.B., Schipanski, M.E., 2016. Going where no grains have gone before: From early to mid-succession. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 223, 223–238. doi:10.1016/j.agee.2016.03.012

Crews, T.E., Peoples, M.B., 2005. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? A review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72, 101–120. doi:10.1007/s10705-004-6480-1

Cros, C., Alvarez, G., Keuper, F., Fontaine, S., 2019. A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems. *Soil Biology and Biochemistry* 130, 12–22. doi:10.1016/j.soilbio.2018.11.022

Culman, S.W., DuPont, S.T., Glover, J.D., Buckley, D.H., Fick, G.W., Ferris, H., Crews, T.E., 2010. Long-term impacts of high-input annual cropping and unfertilized perennial grass

production on soil properties and belowground food webs in Kansas, USA. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Special section Harvested perennial grasslands: Ecological models for farming's perennial future 137, 13–24. doi:10.1016/j.agee.2009.11.008

Davidson, E.A., Hart, S.C., Shanks, C.A., Firestone, M.K., 1991. Measuring gross nitrogen mineralization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Journal of Soil Science* 42, 335–349. doi:10.1111/j.1365-2389.1991.tb00413.x

Dijkstra, F., Cheng, W., Johnson, D., 2006. Plant biomass influences rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition in two differently managed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2519–2526. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.020

Duchene, O., Vian, J.-F., Celette, F., 2017. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240, 148–161. doi:10.1016/j.agee.2017.02.019

Follett, R.F., Schimel, D.S., 1989. Effect of Tillage Practices on Microbial Biomass Dynamics. *Soil Science Society of America Journal* 53, 1091–1096. doi:10.2136/sssaj1989.03615995005300040018x

Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content: Carbon input in soil carbon sequestration. *Ecology Letters* 7, 314–320. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x

Fontaine, S., Barot, S., 2005. Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation: Modelling long-term SOM dynamics. *Ecology Letters* 8, 1075–1087. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00813.x

Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillet, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017

Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8

Gardner, J.B., Drinkwater, L.E., 2009. The fate of nitrogen in grain cropping systems: a meta-analysis of 15N field experiments. *Ecological Applications* 19, 2167–2184. doi:10.1890/08-1122.1

Glover, Culman, S.W., DuPont, S.T., Whitney Broussard, Young, L., Mangan, M.E., Mai, J.G., Crews, T.E., DeHaan, L.R., Buckley, D.H., Ferris, H., Turner, R.E., Reynolds, H.L., Wyse, D.L., 2010. Harvested perennial grasslands provide ecological benchmarks for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment, Special section Harvested perennial grasslands: Ecological models for farming's perennial future* 137, 3–12. doi:10.1016/j.agee.2009.11.001

Herfurth, D., Vassal, V., Louault, F., Alvarez, G., Julien, P., Picon-Cochard, C., Bosio, I., Carrère, P., 2015. How does soil particulate organic carbon respond to grazing intensity in permanent grasslands? *Plant and Soil* 394, 239–255. doi:10.1007/s11104-015-2528-z

Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology* 156, 1078–1086. doi:10.1104/pp.111.175331

Huo, C., Luo, Y., Cheng, W., 2017. Rhizosphere priming effect: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 78–84. doi:10.1016/j.soilbio.2017.04.003

IPCC, 2014. Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. Geneva, Switzerland.

Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C., Schmidt, S.K., 1999. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* 80, 1883–1891. doi:10.1890/0012-9658(1999)080[1883:SPONBP]2.0.CO;2

Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396. doi:https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<382::AID-JPLN382>3.0.CO;2-#

Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. doi:10.1016/S0038-0717(01)00117-1

Ledgard, S.F., Luo, J., Monaghan, R.M., 2011. Managing mineral N leaching in grassland systems., in: Lemaire, G., Hodgson, J., Chabbi, A. (Eds.), *Grassland Productivity and Ecosystem Services*. CABI, Wallingford, pp. 83–91. doi:10.1079/9781845938093.0083

Liljeroth, E., Kuikman, P., Veen, J.A.V., 1994. Carbon translocation to the rhizosphere of maize and wheat and influence on the turnover of native soil organic matter at different soil nitrogen levels. *Plant and Soil* 161, 233–240. doi:10.1007/BF00046394

Lloyd, J., Taylor, J.A., 1994. On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* 8, 315–323. doi:10.2307/2389824

Lynch, J.M., Panting, L.M., 1980. Variations in the size of the soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 12, 547–550. doi:10.1016/0038-0717(80)90033-4

Mary, B., Recous, S., Robin, D., 1998. A model for calculating nitrogen fluxes in soil using ¹⁵N tracing. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1963–1979. doi:10.1016/S0038-0717(98)00068-6

Myers, R.J.K., Palm, C.A., Cuevas, E., Gunatilleke, I.U.N., Brossard, M., 1994. The synchronisation of nutrient mineralisation and plant nutrient demand, in: Woomer, P.L., Swift, M.J. (Eds.), *The Biological Management of Tropical Soil Fertility*. J. Wiley, Chichester, pp. 81–116.

Pausch, J., Kuzyakov, Y., 2018. Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24, 1–12. doi:10.1111/gcb.13850

Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.A., Mazzatura, A., Casucci, C., 2000. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils* 32, 17–23. doi:10.1007/s003740000207

Perveen, N., Barot, S., Alvarez, G., Klumpp, K., Martin, R., Rapaport, A., Herfurth, D., Louault, F., Fontaine, S., 2014. Priming effect and microbial diversity in ecosystem functioning and response to global change: a modeling approach using the SYMPHONY model. *Global Change Biology* 20, 1174–1190. doi:10.1111/gcb.12493

R Core Team, 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria.

Recous, S., Loiseau, P., Machet, J., Mary, B., 1996. Transformations et devenir de l'azote de l'engrais sous cultures annuelles et sous prairies, in: *Maitrise de l'azote Dans Les Agrosystèmes*. Editions Quae, pp. 105–120.

Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529–1538. doi:10.1016/0038-0717(95)00096-W

Reichstein, M., Falge, E., Baldocchi, D., Papale, D., Aubinet, M., Berbigier, P., Bernhofer, C., Buchmann, N., Gilmanov, T., Granier, A., Grünwald, T., Havránková, K., Ilvesniemi, H., Janous, D., Knohl, A., Laurila, T., Lohila, A., Loustau, D., Matteucci, G., Meyers, T., Miglietta, F., Ourcival, J.-M., Pumpanen, J., Rambal, S., Rotenberg, E., Sanz, M., Tenhunen, J., Seufert, G., Vaccari, F., Vesala, T., Yakir, D., Valentini, R., 2005. On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Global Change Biology* 11, 1424–1439. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.001002.x

Saugier, B., Roy, J., Mooney, H.A., 2001. 23 - Estimations of Global Terrestrial Productivity: Converging toward a Single Number?, in: Roy, J., Saugier, B., Mooney, H.A. (Eds.), *Terrestrial Global Productivity, Physiological Ecology*. Academic Press, San Diego, pp. 543–557. doi:10.1016/B978-012505290-0/50024-7

Schulze, E.D., Luyssaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I.A., Soussana, J.F., Smith, P., Grace, J., Levin, I., Thiruchittampalam, B., Heimann, M., Dolman, A.J., Valentini, R., Bousquet, P., Peylin, P., Peters, W., Rödenbeck, C., Etiope, G., Vuichard, N., Wattenbach, M., Nabuurs, G.J., Poussi, Z., Nieschulze, J., Gash, J.H., the CarboEurope Team, 2009. Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nature Geoscience* 2, 842–850. doi:10.1038/ngeo686

Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C., Fontaine, S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 146–155. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.023

Shahzad, T., Chenu, C., Repinçay, C., Mougin, C., Ollier, J.-L., Fontaine, S., 2012. Plant clipping decelerates the mineralization of recalcitrant soil organic matter under multiple grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 73–80. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.014

Smil, V., 1999. Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13, 647–662. doi:10.1029/1999GB900015

Söderlund, R., Svensson, B.H., 1976. The Global Nitrogen Cycle. *Ecological Bulletins* 23–73.

Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B., Sorlin, S., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855–1259855. doi:10.1126/science.1259855

Sun, Z., Chen, Q., Han, X., Bol, R., Qu, B., Meng, F., 2018. Allocation of photosynthesized carbon in an intensively farmed winter wheat–soil system as revealed by ^{14}C pulse labelling. *Scientific Reports* 8, 3160. doi:10.1038/s41598-018-21547-y

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. doi:10.1038/nature01014

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703–707. doi:10.1016/0038-0717(87)90052-6

Vertès, F., Decau, M.L., 1992. Suivis d’azote minéral dans les sols: risque de lessivage de nitrate selon le couvert végétal. *Fourrages* 11–28.

Vitousek, P.M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Tilman, G.D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle : Causes and consequences. *Ecological Society of America, Issues in Ecology* 1–16.

Vitousek, P.M., Howarth, R.W., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115. doi:10.1007/BF00002772

Zhang, F., Quan, Q., Song, B., Sun, J., Chen, Y., Zhou, Q., Niu, S., 2017. Net primary productivity and its partitioning in response to precipitation gradient in an alpine meadow. *Scientific Reports* 7, 15193. doi:10.1038/s41598-017-15580-6

Supplementary tables and figures for “Perennial species promote synchronization between plant nitrogen demand and soil nitrogen offer even in wheat intercrop”

Table S1: Fractionation of N fertilization according to treatments. . G (grass) stands for English ryegrass, L (legume) for white clover, W for wheat, N- for low nitrogen fertilizer (40 kg N ha⁻¹ year⁻¹), N+ for high nitrogen fertilizer (200 kg N ha⁻¹ year⁻¹), C- for ambient atmospheric CO₂ concentration (400ppm) and C+ for elevated atmospheric CO₂ concentration (700ppm). An unplanted control treatment was also conducted without N fertilization and under ambient atmospheric CO₂ concentration.

		end of winter: vegetation recovery	after the first mowing	tillering stage	sheaf1 cm	bolting stage
Treatments	Fertilization level	03_2017	05_2017	03_2017	04_2017	05_2017
GN-C+	40 kg N ha ⁻¹	40	0			
GLN-C+	40 kg N ha ⁻¹	40	0			
GN-C-	40 kg N ha ⁻¹	40	0			
GLN-C-	40 kg N ha ⁻¹	40	0			
GLN+C-	200 kg N ha ⁻¹	133	67			
WN+C-	200 kg N ha ⁻¹			0	120	80
WN-C-	40 kg N ha ⁻¹			0	40	0
WGLN+C-	200 kg N ha ⁻¹			40	90	70
WGLN-C-	40 kg N ha ⁻¹			20	20	0

Table S2: Dates of the biomass harvests for the different treatments. ‘Grassland’ includes all treatments containing *Lolium perenne* and *Trifolium repens* (English ryegrass: treatments GN-C-, GN-C+; English ryegrass intercrop with white clover (grassland): GLN-C-, GLN+C-, GLN-C+), and ‘Wheat’ includes all treatments containing *Triticum aestivum* (Common wheat: WN-C-, WN+C-). For the combined treatments ‘Grassland’ + ‘Wheat’ (WGLN-C-, WGLN+C-), *Lolium perenne* and *Trifolium repens* were harvested at the same time as conventional ‘Grassland’ and *Triticum aestivum* was harvested at the same time as conventional ‘Wheat’.

Species	Date of aboveground harvest								
	2016-11-16	2016-12-16	2017-02-09	2017-02-28	2017-05-12	2017-07-05	2017-07-06	2017-09-15	2017-11-24
<i>Lolium perenne</i> + <i>Trifolium repens</i> (grassland)	X	X	X	X	X	X		X	X
Grassland in intercrop with <i>Triticum aestivum</i>	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>Triticum aestivum</i> in intercrop with grassland							X		
<i>Triticum aestivum</i>							X		

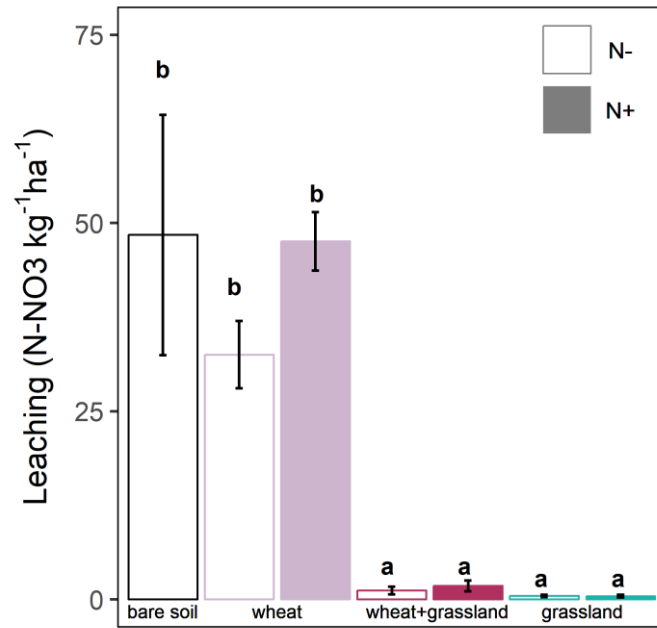


Figure S1: Nitrogen leaching measured in the different treatments. Purple bars stand for wheat monocrop, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland. Filled bars represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Error bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between treatments (one-way ANOVA following by Tukey's *posthoc* test, * $P < 0.05$).

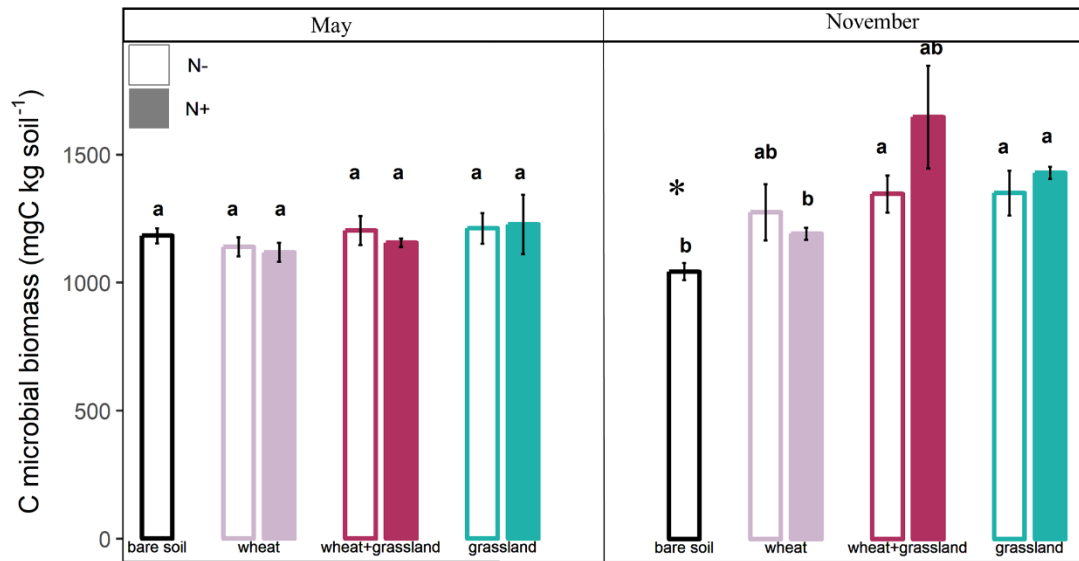


Figure S2: Microbial carbon biomass of the different treatments in May and in November 2017. Purple bars stand for wheat monocrop, red bars represent the grassland-wheat intercrop and the green bars correspond to the grassland. Filled bars represent the high N fertilization treatments whereas empty bars stand for low N fertilization. Error bars represent standard error of means. Letters indicate significant differences between treatments (one-way ANOVA following by Tukey's posthoc test, *P<0.05).

Chapitre 5: Discussion générale et perspectives

1. « Rhizosphere priming effect » et flux de carbone

(1) Est-il possible de mesurer simultanément le « rhizosphere priming effect » et les flux de carbone dans des systèmes sol-plantes ?

Nous avons mis en place une plateforme expérimentale contenant 40 mésocosmes et couplant un dispositif de marquage des plantes au ^{13}C à des mesures des échanges continus de CO_2 . Cela a permis la quantification régulière du RPE au cours du temps, tout en assurant la mesure continue de la productivité nette de l'écosystème (NEP) à une fréquence minimum de 30 minutes. Ce couplage des mesures de RPE et de NEP a nécessité de surmonter de nombreux défis techniques.

La mesure des échanges continus de CO_2 des systèmes sol-plantes de chaque traitement a pu être réalisée grâce à la mise en place de mésocosmes individuels clos et d'un multiplexeur. Plus précisément, les échanges de CO_2 ont été quantifiés en comparant la concentration en CO_2 de l'air entrant et sortant de chaque mésocosme. Le point de mesure d'entrée était commun. L'air était prélevé individuellement en sortie de chaque mésocosme et amené vers un multiplexeur qui injectait successivement l'air collecté, à un intervalle de 2 minutes, aux trois analyseurs sur lesquels sont répartis l'ensemble des mésocosmes. Les analyseurs ont ainsi mesuré le différentiel de la concentration en CO_2 entre les deux points de mesure (entrée et sortie).

Le dispositif de marquage était basé sur la génération d'un air dépourvu de CO_2 (CO_2 résiduel max = 20 ppm) puis d'une injection de $^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ appauvri d'origine fossile. La composition isotopique de l'air produit est stable tant que le CO_2 résiduel ne dépasse pas 20 ppm (Shahzad, 2012; Shahzad et al., 2012). De plus, l'air produit doit être homogènement distribué dans chaque mésocosme pour assurer une stabilité de marquage des plantes. Dans ce but, nous avons conçu un système de distribution de l'air en forme de « pieuvre » permettant l'alimentation homogène des mésocosmes au travers d'une répartition équilibrée de l'air entre les différents bras de chaque pieuvre (**Chapitre 2 : Fig. 2.1 et 2.2**). La distribution homogène

de l'air conférerait un avantage supplémentaire, puisque la quantification du débit d'air traversant les mésocosmes en était facilitée au travers de la réalisation de mesures ponctuelles de la vitesse d'air en sortie d'une partie seulement des mésocosmes. Cela a permis d'éviter la quantification individuelle et continue du débit d'air en sortie de chaque mésocosme, qui aurait conduit à des coûts supplémentaires de main d'œuvre et de matériels.

Afin d'avoir un marquage isotopique stable des plantes, le débit traversant les mésocosmes doit être élevé pour permettre une exposition à de l'air marqué en continu, évitant la déplétion de CO₂ dans l'enceinte sous l'effet de la fixation par les plantes ainsi que toute assimilation de CO₂ non marqué provenant de la respiration du sol. Cependant, si le débit traversant les mésocosmes est trop grand, la détection des échanges de CO₂ n'est pas possible. Pour assurer ce compromis, nous avons ajusté le débit d'air dans les mésocosmes en fonction des saisons grâce à l'établissement d'un seuil de fixation de CO₂ de 70 ppm, laissant une concentration de 330 ppm minimum dans les mésocosmes. L'activité photosynthétique étant différente en fonction des traitements, les ajustements ont été effectués en se basant sur le traitement ayant l'activité photosynthétique la plus grande. Cela a eu des répercussions sur la qualité des mesures des échanges de CO₂ dans les traitements ayant une faible activité photosynthétique, en particulier dans les sols nus. En effet, la détection des échanges de CO₂ des sols nus n'a pas pu être réalisée en été, lorsque le débit ajusté était très fort, impliquant l'impossibilité de quantifier le bilan annuel de C des sols nus. Pour les traitements plantés à faible activité photosynthétique, les échanges de CO₂ ont pu être détectés tout au long de l'année en journée, mais la respiration nocturne de l'écosystème, parfois très faible, était à la limite de la détection. Ces résultats suggèrent que le suivi des échanges de CO₂ de traitements très contrastés n'est pas optimal sur la plateforme expérimentale.

Afin de mesurer le RPE, nous avons amélioré la méthode d'incubation en absence de lumière proposée par (Shahzad et al., 2012). Les incubations du système sol-plantes ont en effet pu être

réalisées *in situ* sur la plateforme expérimentale, grâce à la possibilité de démonter les chambres transparentes des mésocosmes et de les remplacer par des chambres opaques. Cette amélioration technique était cruciale pour garantir la possibilité d'étudier le RPE sur des mésocosmes de grande taille, plus représentatifs d'un écosystème naturel.

Enfin, le dernier défi technique que nous avons relevé était de maintenir les conditions environnementales de lumière et de température proches de l'extérieur. L'ensemble des choix techniques réalisés dans ce sens (isolants thermiques, enfouissement des pots et des tuyaux d'alimentation, couverture végétale environnante, arrosage de la plateforme) ont permis de limiter l'augmentation de la température par effet de serre dans les mésocosmes, puisque nous observons globalement un refroidissement de 0.67°C.

Bien que l'ensemble de ces défis techniques aient été relevés, la mesure rigoureusement simultanée du RPE et des flux de C n'était pas possible. En effet, lors des incubations du système sol-plantes, les débits d'air dans les mésocosmes étaient stoppés, empêchant les mesures des échanges continus de CO₂ pendant 48 heures. Toutefois, la forte relation positive observée entre respiration de nuit de l'écosystème lors de l'incubation et celle mesurée lors des échanges continus 48 heures avant (**Chapitre 2 : Fig. 2.5, R² = 0.67**) montre que le couplage entre RPE et flux de C est possible. La méthode de couplage de ces deux mesures pourrait être améliorée en mesurant le RPE toutes les nuits simultanément aux échanges de CO₂ au travers du couplage des analyseurs de différentiel de CO₂ avec un analyseur isotopique.

(2) Quelle est la contribution du « rhizosphere priming effect » dans les flux de carbone ?

Nos résultats préliminaires de contribution du RPE dans les flux de C présentés dans le chapitre 2 (**Tab. 2.1**) montrent que le RPE représente entre 0.92% à 1.66% du C fixé par photosynthèse (GPP) pour une graminée lors de deux dates de mesures (fin d'hiver, printemps).

Cette contribution peut paraître *a priori* faible. Cependant il serait intéressant de la comparer au flux de C entrant dans la MOS afin d'évaluer l'importance du RPE dans les bilans de C. Pour ce faire, nous avons effectué des calculs préliminaires en nous basant uniquement sur des entrées de C au travers des rhizodépôts et en négligeant l'apport de C par litière. En prairie, environ 11% du C fixé par photosynthèse est libéré dans le sol sous forme de rhizodépôts (Pausch and Kuzyakov, 2018). Nous avons émis l'hypothèse que 100% des rhizodépôts sont utilisés par les microorganismes et nous avons considéré qu'environ 80% du C utilisé par les microorganismes est libéré sous forme de respiration (Fontaine et al., 2011). La part de C provenant des rhizodépôts alimentant la MOS (20% restant) représenterait environ 2.2% du C fixé par photosynthèse. Ainsi la contribution du RPE oscillant entre 0.92% à 1.66% du C fixé pour le raygrass seul pourrait représenter entre 41.8% à 75.4% du C entrant dans la MOS via les rhizodépôts. Ces résultats suggèrent que le RPE joue un rôle prépondérant dans les bilans de C et qu'il a un rôle déterminant dans le stockage ou le déstockage de C dans le sol. La nécessité d'intégrer le RPE dans les modèles étudiant les bilans de C semble ainsi évidente, mais elle n'est actuellement que trop peu mise en œuvre (Perveen et al., 2014; Guenet et al., 2018). En effet, les mesures de RPE sont impossibles au champ ou dans les écosystèmes car cela nécessiterait la présence d'un marquage et d'une enceinte close pour les incubations des systèmes sol-plantes ; ce qui limite leur intégration dans les bilans de C à l'échelle de l'écosystème et *à fortiori* à l'échelle globale.

En ce sens, nous avons fourni les premières équations permettant la prédiction du RPE à partir de la biomasse aérienne ou de la GPP, variables facilement mesurables à l'échelle de l'écosystème. Ces équations étaient robustes à divers assemblages d'espèces sous des niveaux de fertilisation C et N contrastés (**Chapitre3 : Fig. 3.1**). D'autres facteurs peuvent intervenir dans la variation du RPE tels que l'humidité, la température et les propriétés du sol (*i.e.* teneur en C organique, minéraux) (Cheng et al., 2014; Thurgood et al., 2014). Nos équations de proxys

du RPE pourraient être intégrées dans des modèles prenant en compte ces autres facteurs afin de prédire le RPE depuis l'écosystème jusqu'à l'échelle globale.

2. Le mécanisme de banque et la synchronisation sol-plantes

(1) Démonstration de l'existence du mécanisme de banque en prairie

Dans les chapitres 3 et 4 et dans les fiches synthétiques, nous avons mis en évidence une relation linéaire entre RPE et GPP. D'autres études sur le RPE avaient déjà suggéré l'existence d'une dépendance du RPE à la photosynthèse (Kuzyakov and Cheng, 2001a; Dijkstra et al., 2006; Shahzad et al., 2012; Huo et al., 2017) et l'avaient parfois mis en lien avec l'ajustement de l'offre du sol à la demande de la plante (Shahzad, 2012). Cependant l'offre du sol en nutriments pour la plante ne peut pas se limiter à la seule mesure du RPE car elle ne correspond qu'à un flux sortant de la MOS, mettant à disposition les nutriments contenus dans la MOS pour tous les organismes (plantes et microorganismes). La disponibilité des nutriments pour la croissance de la plante doit aussi tenir compte de l'assimilation des nutriments de la solution du sol par les microorganismes (immobilisation) qui alimente la MOS (flux entrant). C'est pourquoi la différence entre la minéralisation et l'immobilisation brute de l'N (delta MIT) renseigne plus précisément sur l'offre du sol. Ainsi nous avons mis en relation le delta MIT et la GPP et avons trouvé une forte corrélation en prairie (**Chapitre 4 : fig. 4.7, Fiche synthétique n°1 : Fig. 4 et n°2 Fig. 7**).

Au travers de ces deux corrélations, nous avons mis en évidence un ajustement de l'offre du sol au besoin de la plante en nutriments au cours des saisons, suggérant que le mécanisme de banque existe en prairie. En effet, nous avons observé une mise à disposition de l'N (fort RPE et delta MIT élevé) au printemps lorsque la demande de la plante en N était forte (forte GPP). Au contraire, à l'automne, lorsque la demande de la plante était faible (faible GPP), nous avons observé un arrêt de la destruction de la MOS (faible RPE) et la favorisation d'une mise en

réserve de l'N (faible delta MIT) (**Chapitre 4 : fig. 4.6, 4.7, Fiche synthétique n°1 : Fig. 4 et n°2 Fig. 7**).

Le mécanisme de banque testé au travers du modèle SYMPHONY prévoit que l'apport d'N par fertilisation devrait favoriser l'immobilisation des nutriments afin de séquestrer l'N minéral en excès dans la solution du sol (Perveen et al., 2014). Nos résultats montrent que l'apport de fertilisant a stimulé l'activité photosynthétique de la plante (forte GPP) et par conséquent sa demande en N. Cela a entraîné un prélèvement rapide de l'N apporté puisque la concentration en N minéral dans la solution du sol était nulle (**Chapitre 4 : Fig. 4.6**). Par conséquent, l'offre du sol a augmenté en réponse à une forte demande (**Fiche synthétique n°1, Fig. 4**). Ces résultats soulignent la complexité d'analyser l'effet combiné d'un facteur observé dans un système sol-plantes où plusieurs acteurs interagissent : les plantes et les microorganismes. Afin de démêler cet effet combiné de l'N agissant à la fois sur la GPP et sur le delta MIT, nos estimations de delta MIT montrent qu'à niveau égal de GPP, la fertilisation a un effet négatif sur le delta MIT (**Fiche synthétique n°1, Fig. 4C**).

L'ensemble de ces nouveaux résultats constitue autant de preuves soutenant l'existence du mécanisme de banque en prairie, acquises au travers de mesures directes sur des systèmes sol-plantes. Cependant, pour conforter le modèle microbien proposé pour expliquer le mécanisme de banque, des investigations restent à mener, en particulier sur les interactions entre les deux groupes fonctionnels microbiens présumés responsables. En effet, le mécanisme de banque prévoit l'alternance au cours de l'année de deux communautés microbiennes aux stratégies d'acquisition des ressources différentes : MOS-destructeurs (stratégie-K) dominants lorsque l'N minéral est peu disponible dans la solution du sol et MOS-constructeurs (stratégie-r) dominants lorsque l'N minéral est abondant dans la solution du sol (Fontaine et al., 2003). Certaines études apportent cependant des éléments de réponse en faveur de leur existence et de leur alternance (Fontaine et al., 2011; Shahzad et al., 2012). Ces études se basent sur l'utilisation

de marqueurs moléculaires : PLFA (phospholipid fatty acid) consistant en l'extraction d'acide gras des microorganismes et en leur analyse. Par exemple, Shahzad et al. (2012) travaillant sur des pots plantés, montrent que le RPE est intimement lié à la présence de champignons saprophytes dont l'abondance diminue lorsque la disponibilité en N augmente dans la solution du sol. Ces champignons saprophytes feraient donc partie des MOS-destructeurs.

(2) Le mécanisme de banque peut-il expliquer la synchronisation sol-plantes en prairie ?

Au travers de la démonstration de l'ajustement de l'offre du sol à la demande de la plante en nutriments au cours des saisons, le mécanisme de banque pourrait offrir les nutriments provenant des MOS à la plante pour sa croissance ou bien les séquestrer pour la prochaine période de croissance. Ainsi le mécanisme de banque pourrait expliquer la synchronisation sol-plantes des écosystèmes naturels ou peu perturbés conduisant à leur faible dépendance à la fertilisation azotée et à une absence de lixiviation de l'N. Cependant, d'autres mécanismes semblent être en place et pourraient également participer à cette synchronisation.

Par exemple, la translocation des nutriments des parties aériennes vers les parties souterraines durant l'hiver pourrait être un mécanisme important mis en place par les plantes pour stocker des nutriments (Hayes, 1985; Chapin et al., 1990; Crews et al., 2016). Ainsi, au printemps, lorsque la croissance de la végétation redémarre, les nutriments stockés dans les parties souterraines seraient réalloués vers les parties aériennes.

D'autres microorganismes que ceux impliqués dans le mécanisme de banque pourraient jouer un rôle dans la synchronisation entre la demande de la plante en nutriments et l'offre du sol. Par exemple, les symbioses mycorhiziennes permettent des échanges directs entre racines et champignons de telle sorte que la plante alimente les champignons en C fixé par photosynthèse tandis que les champignons alimentent la plante en eau et en nutriments (Jeffery

et al., 2013). Ainsi, le développement et l'activité de ces champignons constituant l'offre du sol est dépendante de l'activité photosynthétique et par conséquent de la demande de la plante.

Un autre exemple peut être celui des microorganismes symbiotiques fixateurs de N_2 atmosphérique, tels que ceux du genre *Rhizobium*, vivant en association avec les légumineuses. Les plantes alimentent les microorganismes en C tandis que les microorganismes offrent de l'N aux plantes. Plus l'activité photosynthétique est importante et plus la fixation de l'N atmosphérique est grande (Kirizii et al., 2007). Dans nos expérimentations sous CO_2 élevé, la fixation symbiotique a semblé jouer un rôle important dans l'acquisition de l'N de l'association graminée-légumineuse, puisque nous avons observé une activité photosynthétique bien plus forte qu'en CO_2 ambiant mais pas d'augmentation du potentiel d'offre du sol (**Fiche synthétique n°1 : Fig. 4**).

(3) La présence de plantes pérennes semble être déterminante dans le mécanisme de banque

Les différents modes d'occupation des terres ont eu des effets différents sur les activités des microorganismes. En effet, l'ajustement de l'offre du sol au besoin de la plante n'a pas été mis en évidence en monoculture de blé, alors que tous les autres assemblages contenant des espèces pérennes ont permis d'observer cet ajustement (**Chapitre 4 : fig. 4.7, Fiche synthétique n°1 : Fig. 4 et n°2 Fig. 7**). Cette observation montre l'importance des plantes pérennes dans le couple sol-plantes et dans la mise en place du mécanisme de banque. En présence de plantes pérennes, l'activité photosynthétique est continue (**Chapitre 4 : fig. 4.1, Fiche synthétique n°1 : Fig. 2 et n°2 Fig. 5**) permettant l'étalement tout au long de l'année des rhizodépôts dans le sol. Ces rhizodépôts alimentent ainsi en continu les communautés de microorganismes (constructeurs et destructeurs de MOS). Par conséquent, lorsque la disponibilité en N dans la rhizosphère est faible due à une demande importante de la plante, les microorganismes décomposeurs (MOS-destructeurs) pourraient acquérir l'énergie nécessaire à la destruction de la MOS au travers des rhizodépôts. Puis, lorsque la demande de la plante en N baisse à l'automne, la disponibilité en

N augmente et la présence de rhizodépôts pourrait permettre le remplacement des MOS-destructeurs par des MOS-constructeurs spécialisés dans la séquestration de l’N. À l’inverse, en monoculture annuelle, on pourrait imaginer que lorsque la concentration en N disponible augmente (faible demande), l’absence de rhizodépôts empêcherait le changement de communautés microbiennes ; ce qui expliquerait pourquoi à l’automne l’offre du sol en N est aussi forte qu’au printemps alors que la demande est nulle.

(4) La notion de fertilité n’est pas une caractéristique spécifique du sol mais du couple sol-plantes

Initialement, les couverts végétaux (raygrass anglais, raygrass anglais + trèfle blanc, raygrass anglais + trèfle blanc + blé et blé seul) ont été implantés dans un sol à la fertilité¹ identique puisque de même origine. Ainsi, la quantité de nutriments contenus dans la MOS et les communautés microbiennes étaient les mêmes pour tous les traitements, suggérant a priori que la fertilité du sol, au sens historique¹, était la même.

¹ Fertilité du sol: aptitude d’un sol à produire en quantités suffisantes l’ensemble des substances (eaux, nutriments minéraux) essentiels à la croissance des plantes et ceci pendant des générations (Chaussod, 1996).

Pour l'année 2017, le rendement en biomasse n'était pas différent entre les traitements, excepté pour le raygrass (**Fig. 5.1**). Dans notre étude, le raygrass ne s'est pas bien développé, probablement à cause d'une relative sensibilité à la chaleur. En effet, l'optimum de croissance du raygrass se situe aux alentours de 18°C (Dairy Soils and Fertiliser Manual Team, 2013). Les températures moyennes des mois d'été dans les mésocosmes étaient d'environ 23°C mais pouvaient atteindre jusqu'à 39.05°C. En 2018, alors que les productions de la prairie et de la culture agro-écologique sont restées les mêmes, le rendement du blé a diminué de plus d'un facteur 2. Ces résultats suggèrent que le blé en monoculture n'a pas eu accès à la même disponibilité des nutriments que l'année précédente, contrairement à la prairie et à la culture agro-écologique.

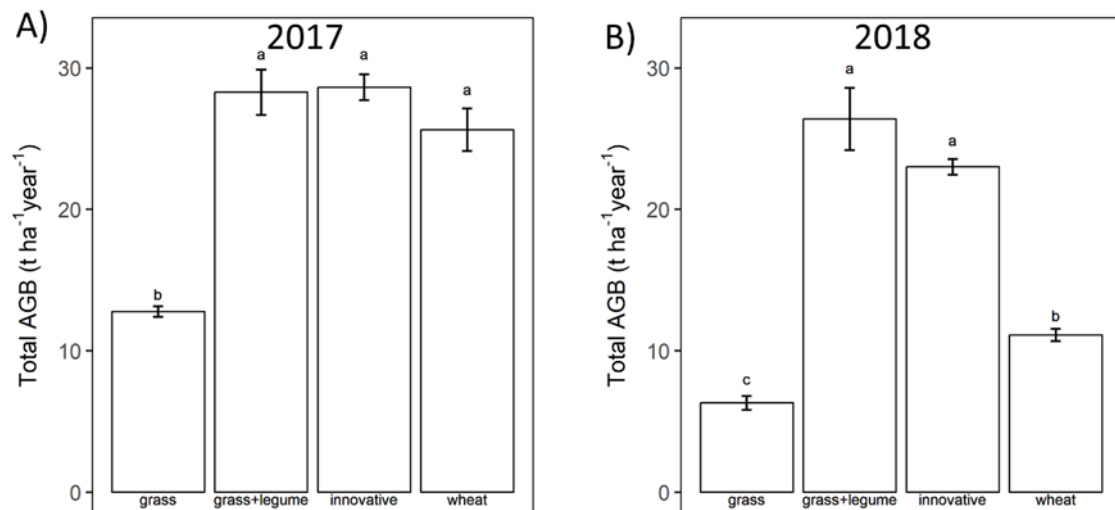


Figure 5. 1 : Évolution de la production moyenne de la biomasse aérienne (AGB) à faible apport de fertilisant ($40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) sur deux ans : (A) 2017 et (B) 2018. Le traitement « innovatif » correspond à l'association blé-raygrass anglais-trèfle blanc, « grass+legume » correspond à l'association raygrass anglais et trèfle blanc (prairie), « grass » correspond au raygrass anglais cultivé seul et « wheat » au blé cultivé seul. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Ces différences de production de l'année 2018 pourraient s'expliquer par une sollicitation différente du mécanisme de banque. Lors de la première année (2017), nous supposons que la production n'a pas été impactée par le mécanisme de banque car la perturbation initiale du sol (tamisage et homogénéisation) a conduit à une forte libération d'N dans la solution du sol via minéralisation. Or, l'absence d'immobilisation de l'N à l'automne 2017 en monoculture de blé a conduit à une perte importante d'N par lixiviation, autant de nutriments qui n'ont pas pu être recyclés lorsque la demande en nutriments était importante l'année suivante (2018). De plus, la faible durée séparant l'installation du blé de sa période de forte demande (2 mois au total au printemps 2018) a pu limiter son développement racinaire et par conséquent sa capacité à stimuler la minéralisation de l'N organique via le RPE. Au contraire, la présence d'une immobilisation des nutriments en automne 2017 pour la prairie et le système de culture innovant aurait pu conduire au recyclage de ces nutriments au printemps 2018, permettant de maintenir la production. De plus, l'enracinement permanent permet un meilleur entretien des pools microbiens responsables du fonctionnement de banque.

Ces résultats mettent en avant deux points essentiels : (1) Le type de plantes installées (pérennes vs annuelles) sur un même sol conditionne la capacité à produire du couple sol-plantes. La fertilité est donc une caractéristique du couple sol-plantes. (2) Le mécanisme de banque découlant des interactions entre les plantes et les microbes du sol est fondateur de cette fertilité.

3. Le mécanisme de banque et les changements globaux

(1) L'augmentation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère a-t-elle un effet sur les régulations rhizosphériques ?

La concentration élevée en CO₂ (700 ppm) dans les mésocosmes n'a eu un effet qu'à court-terme sur la biomasse du raygrass cultivé seul et sur les activités microbiennes associées (**Fiche synthétique n°2**). Durant les premiers mois, une augmentation de la GPP et de la biomasse a

été observée, en particulier celle des racines. La destruction des MOS (RPE) et la minéralisation brute de l'azote étaient favorisées. Cela signifie que les régulations microbiennes dans le sol se sont adaptées à la demande de la plante, supérieure en CO₂ élevé en comparaison au CO₂ ambiant (400 ppm). Cet effet s'est estompé dès le mois de mai, après la première coupe, puisque les GPP étaient similaires et largement diminuées par rapport à la période précédente. En parallèle, dès mai, la destruction des MOS (RPE) était inférieure en CO₂ élevé en comparaison au CO₂ ambiant, tandis qu'aucune différence dans le delta minéralisation-immobilisation n'était observée. Comme explicité dans la section précédente, nous pensons que le raygrass ne s'est pas très bien développé car il n'était pas dans des conditions de température optimales pour sa croissance.

En présence de trèfle blanc, la production de biomasse était largement supérieure en CO₂ élevée comparé au CO₂ ambiant. En fin d'été, la biomasse était essentiellement constituée de trèfle (92%) alors qu'à la première fauche en mai ce dernier ne représentait que 20% de la biomasse. Ceci suggère que les conditions de croissance étaient plus propice au trèfle qu'au raygrass car il est plus résistant à de fortes températures, sa température optimale de croissance se situant entre 23 et 28°C (Dairy Soils and Fertiliser Manual Team, 2013).

Alors que la production de l'association raygrass anglais-trèfle blanc était plus forte en CO₂ élevé, les régulations rhizosphériques (RPE et delta minéralisation- immobilisation) sont restées les mêmes, suggérant une utilisation accrue du N₂ atmosphérique comme source de N. On pourrait imaginer qu'au-delà d'une certaine demande de la plante en N, le mécanisme de banque serait saturé et/ou que son intensification conduirait à un coût énergétique supérieur à la fixation symbiotique de l'N.

(2) Le nouveau système de culture permet de restaurer les régulations rhizosphériques bouclant les cycles des nutriments tout en conservant la production

En monoculture de blé, l'offre du sol en nutriments en novembre était aussi grande que celle observée en mai alors que la demande en nutriments était nulle (absence de plante) (**Chapitre 4 : Fig. 4.6**). Cette désynchronisation offre-demande a conduit à un excès d'N dans le sol et à une lixiviation d'N importante (**Chapitre 4 : Fig. 4.7, Table 4.3**). Au contraire, sous l'association blé-prairie, le sol voit les flux d'immobilisation-minéralisation d'N s'ajuster selon les saisons et donc selon l'activité photosynthétique. Les conséquences sur les teneurs en N minéral dans la solution du sol au mois de novembre et sur la lixiviation d'N sont spectaculaires, puisque qu'elles sont divisées en moyenne par 25 et 27, respectivement. (**Chapitre 4 : Table 4.3**). La culture agro-écologique consistant à implanter du blé dans un couvert de plantes pérennes (prairie) a donc permis de restaurer l'ajustement de l'offre du sol au besoin de la plante au cours des saisons ainsi qu'un bouclage du cycle de l'N.

Le rendement total fournit par l'association blé-prairie en 2017 était intermédiaire entre la prairie et le blé et n'était pas significativement différent de l'un ou de l'autre (**Chapitre 4 : Table 4.3**). En fractionnant le rendement total de l'année 2017 des associations blé-prairie, nous avons observé que la présence de prairie dans l'association blé-prairie diminuait significativement le rendement en grain du blé en comparaison au blé seul (**Chapitre 4 : Table 4.3**). Cette diminution de la production de blé était d'autant plus forte que la fertilisation était faible. La présence de blé dans l'association blé-prairie diminuait le rendement de fourrage lorsque la fertilisation était élevée. La poursuite de l'essai sur l'année 2018 a mis en évidence que le rendement de l'association blé-prairie est resté équivalent à celui de la prairie mais qu'il est supérieur au blé en monoculture pour les niveaux de fertilisation correspondants (**Fig. 5.2**). En 2018, la production de grain de blé n'était pas impactée par la présence de prairie en association blé-prairie (**Table 5.1**). La fertilisation a augmenté significativement la production de grain de blé qu'il soit seul ou en association. La présence de blé dans l'association blé-prairie

a diminué le rendement de fourrage quels que soient les niveaux de fertilisation. La fertilisation n'a pas eu d'impact sur le rendement du fourrage en prairie et dans l'association blé-prairie.

L'évolution de ces rendements pourrait s'expliquer par la mise à l'équilibre progressive du système après la perturbation initiale (tamisage) et la mise en place du mécanisme de banque dans la fertilité du couple sol-plantes (cf. section « (4) *La notion de fertilité n'est pas une caractéristique spécifique du sol mais du couple sol-plantes* »).

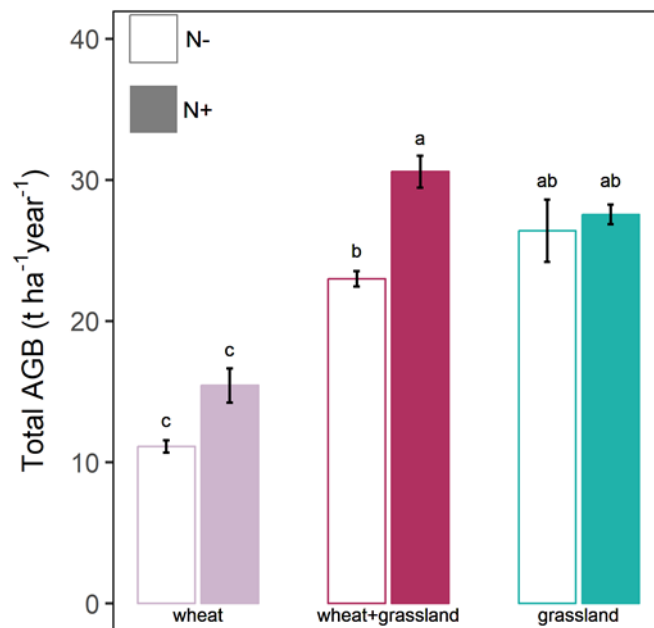


Figure 5. 2 : Rendements moyens aériens de la prairie (grassland), du blé (wheat) et de la culture agro-écologique blé-prairie (wheat+grassland) pour les deux niveaux de fertilisation azotée ($N^- = 40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et $N^+ = 200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) en 2018. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Après la mise à l'équilibre des systèmes sol-plantes, la production du blé n'était plus impactée par la présence de prairie alors que celle des prairies était diminuée en présence du blé. Ceci suggère que le blé était un meilleur compétiteur pour l'N que les espèces prairiales.

En association blé-prairie, le fait que la production de grain de blé ait tendance à être positivement impactée par la fertilisation azotée en comparaison au blé seul montre que la fertilisation azotée peut être un bon moyen pour promouvoir le rendement du blé.

Table 5. 1 : Rendement de la production aérienne (t MS ha⁻¹ an⁻¹) de la prairie, de l'association prairie-blé et du blé pour les deux niveaux de fertilisation azotée (N- = 40 kg N ha⁻¹ an⁻¹ et N+ = 200 kg N ha⁻¹ an⁻¹) pour l'année 2018. Les moyennes sont représentées et sont accompagnées des erreurs standards.

Assemblages		Prairie		Prairie + Blé		Blé	
Fertilisation azotée	kg N ha ⁻¹ an ⁻¹	40	200	40	200	40	200
Rendement année 2018							
Total	t DM ha ⁻¹ an ⁻¹	ab 26.40 (1.74)	ab 27.56 (0.70)	b 23.01 (0.55)	a 30.59 (1.13)	d 11.12 (0.44)	d 15.44 (1.20)
Fourrage	t DM ha ⁻¹ an ⁻¹	a 26.40 (1.74)	a 27.56 (0.70)	b 15.22 (0.85)	b 13.68 (0.97)	x	x
Paille + grain	t DM ha ⁻¹ an ⁻¹	x	x	c 7.79 (0.38)	a 16.91 (0.22)	b 11.12 (0.44)	a 15.44 (1.20)
Grain	quintaux DM ha ⁻¹ an ⁻¹	x	x	b 40.07 (2.20)	a 85.37 (2.83)	b 50.41 (2.20)	a 76.52 (5.65)

L'ensemble de ces résultats montrant une production totale de la culture agro-écologique supérieure (la deuxième année) ou égale (la première année) à la monoculture sont encourageants pour la conception de nouveaux systèmes de cultures agro-écologiques alliant production et bouclage du cycle de l'N grâce à la restauration des régulations rhizosphériques.

4. Perspectives

4.1. Poursuite des efforts méthodologiques pour quantifier les processus rhizosphériques et le mécanisme de banque

(1) Réduction des coûts de marquage des plantes au travers d'une décarbonatation naturelle de l'air

Le dispositif de marquage utilisé dans cette expérimentation était basé sur la décarbonatation de l'air ambiant puis l'injection de ^{13}C . Cette méthode était très coûteuse et consommatrice d'électricité : $\approx 36\,000\text{ €}$ par an (électricité, tamis moléculaire, entretien et location des bouteilles de gaz). Ce dispositif est également très fragile car exposé à de nombreux aléas : coupure d'électricité, panne de moteur, surchauffe du système pendant l'été, etc. La panne du système nécessite une intervention rapide afin d'enclencher le ventilateur de secours ou d'ouvrir les mésocosmes pour évacuer la chaleur accumulée. Ensuite, la réparation doit également se faire rapidement afin de maintenir le marquage des plantes.

Ce dispositif n'est donc pas accessible à tous les laboratoires de recherche alors qu'il permet d'obtenir les estimations de RPE les plus précises à l'heure actuelle (**Chapitre 2**). C'est pourquoi, nous avons imaginé une nouvelle méthode de décarbonatation de l'air ambiant beaucoup moins coûteuse et polluante, nécessitant l'utilisation de la photosynthèse afin de fixer le CO_2 contenu dans l'air. En effet, certaines espèces de plantes telles que la canne à sucre ou le maïs peuvent réduire la concentration en CO_2 de l'air jusqu'à environ 8 ppm (point d'équilibre) (Moss, 1962). Actuellement, le système de décarbonatation utilisé laisse une concentration de CO_2 résiduelle allant de 10 à 20 ppm. La mise en place d'une telle technique de décarbonatation permettrait une meilleure extraction du CO_2 à coût réduit puisque la maintenance des tamis moléculaires ne serait plus nécessaire et que la consommation électrique serait largement diminuée.

Cette décarbonatation naturelle consiste à utiliser un couloir végétal balayé par de l'air ambiant et à enlever le CO_2 grâce à la fixation de C par photosynthèse (**Fig. 5.3**). Une vérification de la bonne décarbonatation de l'air serait effectuée par analyse de la concentration en CO_2 en sortie du couloir végétal. L'injection de l'air marqué pourrait ensuite être réalisée à

la concentration en CO₂ désirée avant de distribuer l'air dans les mésocosmes ou dans la serre où l'on désire marquer les végétaux. Une nouvelle vérification de la concentration injectée aurait lieu (**Fig. 5.3**).

Nous avons réalisé des calculs préliminaires pour estimer la surface de sol nécessaire pour décarbonater le volume d'air qui a été utilisé sur la plateforme expérimentale (4 m³ min⁻¹). Nous nous sommes basés sur la fixation de CO₂ des mésocosmes des traitements les plus actifs pour calculer la surface nécessaire pour absorber tout le CO₂ de l'air, en supposant que la déplétion de CO₂ dans le mésocosme serait linéaire. Nous avons estimé que seulement 6.5 m² seraient nécessaire pour décarbonater 4 m³ min⁻¹. Bien évidemment, l'efficacité de fixation photosynthétique évoluera selon les saisons, mais les besoins en air pour les mésocosmes évoluent dans le même sens. De plus, un éclairage LED d'appoint permettrait de maintenir une activité photosynthétique importante tout au long de l'année. Pour ces calculs préliminaires, nous avons supposé que la déplétion de CO₂ serait linéaire alors qu'elle est asymptotique lorsqu'on se rapproche du point d'équilibre (Tolbert et al., 1995). La surface estimée devrait être alors revue à la hausse et mieux estimée grâce à l'utilisation de modèles, par exemple de Q10 pour mieux prendre en compte l'effet des saisons sur la photosynthèse.

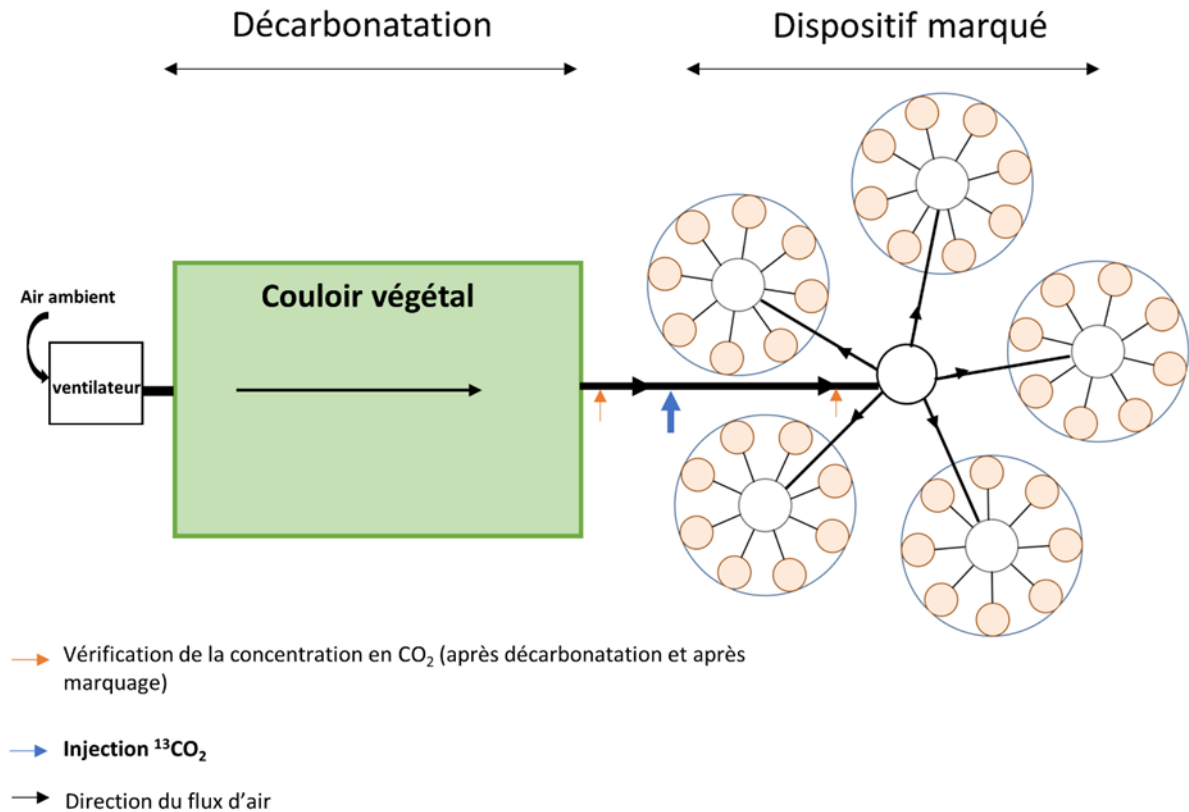


Figure 5. 3 : Représentation schématique du système de décarbonatation naturelle de l'air avant marquage au ¹³C des plantes.

L'analyse de sensibilité des estimations du RPE (**Chapitre 2**) a montré que l'intensité de marquage (différence de composition isotopique entre la plante et le sol initial) joue également un rôle important dans l'incertitude des estimations de RPE. Actuellement, la méthode que nous utilisons (décarbonatation et injection de ¹³C appauvri provenant de la combustion d'énergie fossile) conduit à une intensité de marquage oscillant entre 21.8 et 28.5 ‰ et à une incertitude qui reste élevée (26.8%). L'analyse a montré qu'une intensité de marquage supérieure à 60 ‰ était nécessaire pour estimer le RPE avec une incertitude inférieure à 10%. C'est pourquoi, les efforts méthodologiques peuvent encore être améliorés en changeant la source de ¹³C marqué sans augmenter les coûts. Par exemple, la combustion du méthane permet d'obtenir un delta

^{13}C variant de -55 à -70‰ ; ce qui conduirait à une intensité de marquage oscillant entre 47 et 62‰.

(2) Développement d'un outil de diagnostic de la synchronisation sol-plantes pour le terrain

Nous avons montré que l'ajustement de l'offre du sol à la demande de la plante au cours de l'année pouvait être caractérisé par la relation entre le delta minéralisation-immobilisation brute de l'N et l'activité photosynthétique (GPP) (**Chapitre 4**). Ainsi, en mesurant au champ ou dans un écosystème la photosynthèse ainsi que la minéralisation et immobilisation brute de l'N à différentes saisons, il est possible d'estimer le degré de (dé)synchronisation entre l'offre du sol et la demande du couvert. Il devient donc possible d'évaluer les nouveaux systèmes de culture mis au point par les agriculteurs (ex. les rotations en agriculture de conservation) et les instituts de recherche.

Des indicateurs de photosynthèse pourraient être facilement mesurés au champ au travers des mesures de traits foliaires : leaf area index (LAI), surface leaf area (SLA) (Pearce et al., 1965; Meziane and Shipley, 2001) ou des mesures de météo du milieu: température, humidité et de rayonnement lumineux permettant de déduire la photosynthèse à partir de modèles (Hari and Nöjd, 2009). Les mesures de minéralisation et d'immobilisation brute de l'N impliquent de prélever du sol dans la parcelle à différents endroits afin d'être le plus représentatif possible et de l'analyser en utilisant la méthode de dilution ^{15}N de l'azote (Davidson et al., 1991; Recous et al., 1995; Mary et al., 1998). Cette mesure reste compliquée et devra être effectuée par un laboratoire compétent.

4.2. Implications de nos résultats sur les nouveaux systèmes de cultures

Nos premiers résultats suggèrent que l'association d'une céréale annuelle et de plantes pérennes permettrait de s'affranchir, au moins en partie, des problèmes environnementaux

causés par les monocultures de céréales tout en maintenant la production. Cependant, des progrès doivent encore être réalisés pour pouvoir caractériser l'ensemble des services (stockage de carbone, pollinisation, etc.) assurés par ces nouveaux systèmes de culture, mais surtout pour appliquer ces cultures au champ.

(1) Implications à court-terme : déterminer le stockage de carbone au sein de nos mésocosmes

Nous avons montré que l'association blé-prairie permettait de réduire les pertes d'N par lixiviation et ainsi d'éviter la pollution des eaux souterraines et l'eutrophisation des milieux aquatiques. Même si les premiers résultats (quantité de racines, incorporation de C) laissent présager que cette association prévient la perte de fertilité des sols habituellement observée en monoculture annuelle, le stockage de C reste à évaluer pour étayer cette hypothèse.

L'estimation du stockage de C pourrait se faire au travers du calcul du bilan des échanges de CO₂. Cependant, le bilan représente des quantités de C très faibles comparées aux flux qui le constitue (GPP, RE et exportation de C). Une analyse rapide de l'incertitude de nos mesures a montré que le bilan C dressé par cette approche est trop incertain pour être utilisé. Afin de réaliser ces bilans de C, il faudrait améliorer la qualité des mesures des échanges de CO₂ en augmentant la fréquence (1) du contrôle du flux d'air traversant les mésocosmes et (2) de la calibration des analyseurs. Cela nécessiterait des moyens techniques supplémentaires que nous n'avons pas.

Lors de la première année d'expérimentation, les agrosystèmes implantés dans les mésocosmes n'étaient pas à l'équilibre à cause de la perturbation initiale du sol. Cela nous pousse à maintenir l'expérimentation pendant quelques années afin de laisser le temps aux systèmes sol-plantes de se stabiliser. Le stockage de C pourrait alors être déterminé en réalisant des carottes de sol sur toute la colonne de sol afin de détecter l'évolution du stock de C depuis

le début de l'expérimentation. Étant donné que le sol a été tamisé et homogénéisé initialement, la teneur en C et sa répartition spatiale au sein de chaque horizon de sol est homogène, appuyant la pertinence de cette mesure.

(2) Choix des espèces et prise en compte de la limitation en nutriments dans la conception de nouveaux systèmes de culture

Dans notre expérimentation, nous avons choisi d'associer une céréale annuelle et deux espèces pérennes de prairie. Plus précisément, nous avons utilisé du blé tendre de la variété LENNOX qui est assez résistant aux maladies et à paille courte afin de ne pas dépasser la hauteur de nos mésocosmes (Fiche technique, Saaten Union). Les espèces prairiales choisies étaient le raygrass et le trèfle blanc, ces espèces étant communément associées en prairie et précédemment étudiées pour les mesures de RPE (Shahzad et al., 2012). Cependant, pour les futures expérimentations, le choix des espèces pour la conception de nouveaux systèmes de cultures devrait dépendre des conditions pédoclimatiques du milieu d'implantation.

La compétition entre espèces doit aussi être gérée au mieux dans ces nouveaux systèmes de culture. En effet, dans notre étude, nous avons planté le blé afin de permettre au mieux son développement. La première année, la compétition a été contrôlée par des interventions prenant la forme de coupes de plantes pérennes autour des plants de blé jusqu'à ce que le blé prenne le dessus. Cela n'a pas été nécessaire la deuxième année. Cette gestion de la compétition n'est pas applicable au champ, ce qui implique de trouver des solutions afin d'assurer l'implantation du blé et son succès dans le couvert. Par exemple, il serait intéressant de développer des engins agricoles permettant de faucher l'herbe sans toucher les plants de blé. L'écologie pourrait permettre de choisir les variétés de plantes cultivées et de plantes pérennes les plus conciliables permettant une efficacité optimale de l'exploitation des ressources dans ces systèmes de culture (mécanismes de complémentarité de niches spatiales, temporelles etc.). Ainsi, l'approche des traits et des règles d'assemblage des espèces dans les milieux naturels pourrait être utilisée.

Cependant, se baser sur les interactions entre espèces ne suffit pas pour concevoir les nouveaux systèmes de cultures. Il faut aussi tenir compte d'un appauvrissement du milieu en réalisant des bilans de matières. En effet, la multiplication des exportations des biomasses aériennes sans retour au sol au cours du temps conduirait à un appauvrissement du sol en nutriments, en particulier en N et en phosphore (P), essentiels pour la croissance des végétaux. Il faudrait alors compenser les exportations par des entrées. Par exemple, via fertilisation ou en utilisant des légumineuses pour favoriser (1) l'entrée d'N par fixation symbiotique du N₂ et (2) la mise à disposition du P insoluble en P inorganique (acidification). Ces solutions sont satisfaisantes pour l'N mais pas pour les autres minéraux. Par exemple, pour le P, la fertilisation n'est pas une solution pérenne étant donné l'épuisement constaté des mines de phosphate. La restitution de la matière organique par les fèces des animaux d'élevage pourrait limiter l'appauvrissement du sol, mais cela implique des réflexions sur la réorganisation de l'agriculture. La spécialisation agricole des régions (ex. grandes cultures en Beauce et élevage en Bretagne) n'est pas favorable au recyclage de la matière. Cependant, les nouveaux systèmes de culture produisant à la fois des céréales et du fourrage pourraient donner une nouvelle pertinence aux systèmes de polycultures élevage, qu'ils soient développés sur une même exploitation agricole ou organisés au sein d'un territoire. Par exemple, des éleveurs pourraient faire pâturer les couverts de plantes pérennes avant les semis de blé afin de favoriser les restitutions au sol par l'urine et les fèces, et de réduire la compétition pour la lumière entre les plantes pérennes et le blé. Bien-sûr, la faisabilité agronomique et économique de ces nouveaux systèmes de culture reste à développer, mais inventer une nouvelle agriculture durable et bio-diversifiée représente un défi scientifique et sociétal dont l'humanité ne peut se passer.

Références bibliographiques

A

- Agreste, 2018. Agreste Synthèses - Céréales, oléagineux et protéagineux. Conjoncture n°2018/331.
- Agreste Centre-Val de Loire, 2018. Bilan de la production fourragère en 2017. Conjoncture agricole N° 2018-C1.
- Agreste primeur, 2008. Les rendements du blé et du maïs ne progressent plus. Agreste: la statistique agricole. Ministère de l'agriculture et de la pêche 4.
- Altieri, M.A., 1989. Agroecology: A new research and development paradigm for world agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment, International Symposium on Agricultural Ecology and Environment* 27, 37–46. doi:10.1016/0167-8809(89)90070-4
- Alvarez, G., Shahzad, T., Andanson, L., Bahn, M., Wallenstein, M.D., Fontaine, S., 2018. Catalytic power of enzymes decreases with temperature: New insights for understanding soil C cycling and microbial ecology under warming. *Global Change Biology* 24, 4238–4250. doi:10.1111/gcb.14281

B

- Balesdent, J., 1991. Estimation du renouvellement du carbone des sols par mesure isotopique $\delta^{13}C$ Précision, risque de biais. *Cahiers ORSTOM - Série Pédologie*, 26, 315–326.
- Balesdent, J., Mariotti, A., Guillet, B., 1987. Natural $\delta^{13}C$ abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 25–30. doi:10.1016/0038-0717(87)90120-9
- Balesdent, J., Wagner, G.H., Mariotti, A., 1988. Soil Organic Matter Turnover in Long-term Field Experiments as Revealed by Carbon-13 Natural Abundance. *Soil Science Society of America Journal* 52, 118. doi:10.2136/sssaj1988.03615995005200010021x
- Beare, M.H., Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F., Odum, E.P., 1995. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* 170, 5–22. doi:10.1007/BF02183051
- Bell, C.W., Asao, S., Calderon, F., Wolk, B., Wallenstein, M.D., 2015. Plant nitrogen uptake drives rhizosphere bacterial community assembly during plant growth. *Soil Biology and Biochemistry* 85, 170–182. doi:10.1016/j.soilbio.2015.03.006
- Benoit, M., 2007. Prairies et qualité des eaux : mesures parcellaires, assolement, et observatoires des pratiques. *Fourrages* (189), 33-50. (2007).

- Betencourt, E., Duputel, M., Colomb, B., Desclaux, D., Hinsinger, P., 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biology and Biochemistry* 46, 181–190. doi:10.1016/j.soilbio.2011.11.015
- Billen, G., Garnier, J., Lassaletta, L., 2013. The nitrogen cascade from agricultural soils to the sea: modelling nitrogen transfers at regional watershed and global scales. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 368, 20130123. doi:10.1098/rstb.2013.0123
- Bingeman, C.W., Varner, J.E., Martin, W.P., 1953. The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Soil Science Society of America Journal* 17, 34. doi:10.2136/sssaj1953.03615995001700010008x
- Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.-H., Kuzyakov, Y., 2007. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* 37, 95–105. doi:10.1016/j.apsoil.2007.05.002
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils* 45, 115–131. doi:10.1007/s00374-008-0334-y
- Bodson, B., Vandenberghe, C., 2013. Gestion durable de l'azote au-delà de la seule problématique « nitrate ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 4.
- Borrelli, P., Robinson, D.A., Fleischer, L.R., Lugato, E., Ballabio, C., Alewell, C., Meusburger, K., Modugno, S., Schütt, B., Ferro, V., Bagarello, V., Oost, K.V., Montanarella, L., Panagos, P., 2017. An assessment of the global impact of 21st century land use change on soil erosion. *Nature Communications* 8, 2013. doi:10.1038/s41467-017-02142-7
- Bottner, P., Pansu, M., Sallih, Z., 1999. Modelling the effect of active roots on soil organic matter turnover. *Plant and Soil* 216, 15–25. doi:10.1023/A:1004769317657
- Brisson, N., Gate, P., Gouache, D., Charmet, G., Oury, F.-X., Huard, F., 2010. Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119, 201–212. doi:10.1016/j.fcr.2010.07.012
- Brooker, R., Kikvidze, Z., Pugnaire, F.I., Callaway, R.M., Choler, P., Lortie, C.J., Michalet, R., 2005. The importance of importance. *Oikos* 109, 63–70. doi:10.1111/j.0030-1299.2005.13557.x

C

- Callaway, R.M., 1995. Positive interactions among plants. *The Botanical Review* 61, 306–349. doi:10.1007/BF02912621

- Canadell, J.G., Quéré, C.L., Raupach, M.R., Field, C.B., Buitenhuis, E.T., Ciais, P., Conway, T.J., Gillett, N.P., Houghton, R.A., Marland, G., 2007. Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18866–18870. doi:10.1073/pnas.0702737104
- Carney, K.M., Hungate, B.A., Drake, B.G., Megonigal, J.P., 2007. Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 4990–4995. doi:10.1073/pnas.0610045104
- Carrillo, Y., Dijkstra, F.A., Pendall, E., LeCain, D., Tucker, C., 2014. Plant rhizosphere influence on microbial C metabolism: the role of elevated CO₂, N availability and root stoichiometry. *Biogeochemistry* 117, 229–240. doi:10.1007/s10533-014-9954-5
- Chabbi, A., Lehmann, J., Ciais, P., Loescher, H.W., Cotrufo, M.F., Don, A., SanClements, M., Schipper, L., Six, J., Smith, P., Rumpel, C., 2017. Aligning agriculture and climate policy. *Nature Climate Change* 7, 307–309. doi:10.1038/nclimate3286
- Chang, J., Ciais, P., Herrero, M., Havlik, P., Campioli, M., Zhang, X., Bai, Y., Viovy, N., Joiner, J., Wang, X., Peng, S., Yue, C., Piao, S., Wang, T., Hauglustaine, D.A., Soussana, J.-F., Peregon, A., Kosykh, N., Mironycheva-Tokareva, N., 2016a. Combining livestock production information in a process-based vegetation model to reconstruct the history of grassland management. *Biogeosciences* 13, 3757–3776. doi:https://doi.org/10.5194/bg-13-3757-2016
- Chang, J., Ciais, P., Viovy, N., Vuichard, N., Herrero, M., Havlík, P., Wang, X., Sultan, B., Soussana, J.-F., 2016b. Effect of climate change, CO₂ trends, nitrogen addition, and land-cover and management intensity changes on the carbon balance of European grasslands. *Global Change Biology* 22, 338–350. doi:10.1111/gcb.13050
- Chapin, F.S., Schulze, E., Mooney, H.A., 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 423–447. doi:10.1146/annurev.es.21.110190.002231
- Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols: Evaluation et implications. *Étude et Gestion des Sols* 3, 18.
- Chen, R., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Lin, X., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology* 20, 2356–2367. doi:10.1111/gcb.12475

- Cheng, W., 1996. Measurement of rhizosphere respiration and organic matter decomposition using natural ^{13}C . *Plant and Soil* 183, 263–268. doi:10.1007/BF00011441
- Cheng, W., Dijkstra, F.A., 2007. Theoretical proof and empirical confirmation of a continuous labeling method using naturally ^{13}C -depleted carbon dioxide. *Journal of Integrative Plant Biology* 49, 401–407. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00387.x
- Cheng, W., Johnson, D.W., Fu, S., 2003. Rhizosphere effects on decomposition: controls of plant species, phenology, and fertilization. *Soil Science Society of America Journal* 67, 10.
- Cheng, W., Parton, W.J., Gonzalez-Meler, M.A., Phillips, R., Asao, S., McNickle, G.G., Brzostek, E., Jastrow, J.D., 2014. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. *New Phytologist* 201, 31–44. doi:10.1111/nph.12440
- Ciais, P., Bala, S., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, R., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le quéré, C., Myneri, R., Piao, S., Thornton, P., 2013. Carbon and other biogeochemical cycles., in: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Ciais, P., Gervois, S., Vuichard, N., Piao, S.L., Viovy, N., 2011. Effects of land use change and management on the European cropland carbon balance. *Global Change Biology* 17, 320–338. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02341.x
- Clarholm, M., 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 181–187. doi:10.1016/0038-0717(85)90113-0
- Comité Français d’Etude et de Développement de la Fertilisation Raisonnée, 2013. Calcul de la fertilisation azotée: guide méthodologique pour l’établissement des prescriptions locales : cultures annuelles et prairies.
- Conant, R.T., 2012. Grassland Soil Organic Carbon Stocks: Status, Opportunities, Vulnerability, in: *Recarbonization of Biosphere: Ecosystems and the Global Carbon Cycle*. Springer Netherlands.
- Conant, R.T., Cerri, C.E.P., Osborne, B.B., Paustian, K., 2017. Grassland management impacts on soil carbon stocks: a new synthesis. *Ecological Applications* 27, 662–668. doi:10.1002/eap.1473

- Crews, T.E., Blesh, J., Culman, S.W., Hayes, R.C., Jensen, E.S., Mack, M.C., Peoples, M.B., Schipanski, M.E., 2016. Going where no grains have gone before: From early to mid-succession. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 223, 223–238. doi:10.1016/j.agee.2016.03.012
- Culman, S.W., DuPont, S.T., Glover, J.D., Buckley, D.H., Fick, G.W., Ferris, H., Crews, T.E., 2010. Long-term impacts of high-input annual cropping and unfertilized perennial grass production on soil properties and belowground food webs in Kansas, USA. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Special section Harvested perennial grasslands: Ecological models for farming's perennial future 137, 13–24. doi:10.1016/j.agee.2009.11.008
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Ollenburger, M., Basso, B., DeHaan, L.R., 2013. Soil and Water Quality Rapidly Responds to the Perennial Grain Kernza Wheatgrass. *Agronomy Journal* 105, 735. doi:10.2134/agronj2012.0273
- Curtis, P.S., Hanson, P.J., Bolstad, P., Barford, C., Randolph, J.C., Schmid, H.P., Wilson, K.B., 2002. Biometric and eddy-covariance based estimates of annual carbon storage in five eastern North American deciduous forests. *Agricultural and Forest Meteorology, FLUXNET 2000 Synthesis* 113, 3–19. doi:10.1016/S0168-1923(02)00099-0

D

- Dairy Soils and Fertiliser Manual Team, 2013. Dairy Soils and Fertiliser Manual: Australian Nutrient Management Guidelines.
- Davidson, E.A., Hart, S.C., Shanks, C.A., Firestone, M.K., 1991. Measuring gross nitrogen mineralization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Journal of Soil Science* 42, 335–349. doi:10.1111/j.1365-2389.1991.tb00413.x
- Dijkstra, F., Cheng, W., Johnson, D., 2006. Plant biomass influences rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition in two differently managed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2519–2526. doi:10.1016/j.soilbio.2006.02.020
- Dijkstra, F.A., Morgan, J.A., Blumenthal, D., Follett, R.F., 2010. Water limitation and plant inter-specific competition reduce rhizosphere-induced C decomposition and plant N uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1073–1082. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.026
- Dimassi, B., Mary, B., Wylleman, R., Labreuche, J., Couture, D., Piraux, F., Cohan, J.-P., 2014. Long-term effect of contrasted tillage and crop management on soil carbon dynamics during 41 years. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 188, 134–146. doi:10.1016/j.agee.2014.02.014

- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J., 2009. Eutrophication of U.S. Freshwaters: Analysis of Potential Economic Damages. *Environmental Science & Technology* 43, 12–19. doi:10.1021/es801217q
- Doré, T., Makowski, D., Malézieux, E., Munier-Jolain, N., Tchamitchian, M., Titttonell, P., 2011. Facing up to the paradigm of ecological intensification in agronomy: Revisiting methods, concepts and knowledge. *European Journal of Agronomy* 34, 197–210. doi:10.1016/j.eja.2011.02.006
- Duchene, O., Vian, J.-F., Celette, F., 2017. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240, 148–161. doi:10.1016/j.agee.2017.02.019
- DuPont, S.T., Culman, S.W., Ferris, H., Buckley, D.H., Glover, J.D., 2010. No-tillage conversion of harvested perennial grassland to annual cropland reduces root biomass, decreases active carbon stocks, and impacts soil biota. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Special section Harvested perennial grasslands: Ecological models for farming's perennial future 137, 25–32. doi:10.1016/j.agee.2009.12.021

E

- Easterling, D.R., Evans, J.L., Groisman, P.Y., Karl, T.R., Kunkel, K.E., Ambenje, P., 2000. Observed variability and trends in extreme climate events: A brief review. *Bulletin of the American Meteorological Society* 81, 417–426. doi:10.1175/1520-0477(2000)081<0417:OVATIE>2.3.CO;2
- Erb, K.-H., Kastner, T., Plutzer, C., Bais, A.L.S., Carvalhais, N., Fetzel, T., Gingrich, S., Haberl, H., Lauk, C., Niedertscheider, M., Pongratz, J., Thurner, M., Luyssaert, S., 2018. Unexpectedly large impact of forest management and grazing on global vegetation biomass. *Nature* 553, 73–76. doi:10.1038/nature25138

F

- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T., 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 503–537. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002443

- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. TOWARD AN ECOLOGICAL CLASSIFICATION OF SOIL BACTERIA. *Ecology* 88, 1354–1364. doi:10.1890/05-1839
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content: Carbon input in soil carbon sequestration. *Ecology Letters* 7, 314–320. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x
- Fontaine, S., Barot, S., 2005. Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation: Modelling long-term SOM dynamics. *Ecology Letters* 8, 1075–1087. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00813.x
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280. doi:10.1038/nature06275
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revalliot, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8
- Fowler, D., O'Donoghue, M., Muller, J.B.A., Smith, R.I., Dragosits, U., Skiba, U., Sutton, M.A., Brimblecombe, P., 2004. A Chronology of Nitrogen Deposition in the UK Between 1900 and 2000. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 4, 9–23. doi:10.1007/s11267-004-3009-1
- Fujita, K., Ofosu-Budu, K.G., Ogata, S., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. *Plant and Soil* 141, 155–175. doi:10.1007/BF00011315

G

- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vöosmarty, C.J., 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309, 1387–1390. doi:10.1126/science.1112665

- Gardner, J.B., Drinkwater, L.E., 2009. The fate of nitrogen in grain cropping systems: a meta-analysis of ¹⁵N field experiments. *Ecological Applications* 19, 2167–2184. doi:10.1890/08-1122.1
- Gibson, D.J., 2009. Grasses and grassland ecology. Oxford University Press, New York.
- Glover, Culman, S.W., DuPont, S.T., Whitney Broussard, Young, L., Mangan, M.E., Mai, J.G., Crews, T.E., DeHaan, L.R., Buckley, D.H., Ferris, H., Turner, R.E., Reynolds, H.L., Wyse, D.L., 2010. Harvested perennial grasslands provide ecological benchmarks for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Special section Harvested perennial grasslands: Ecological models for farming's perennial future 137, 3–12. doi:10.1016/j.agee.2009.11.001
- Glover, J.D., Reganold, J.P., Bell, L.W., Borevitz, J., Brummer, E.C., Buckler, E.S., Cox, C.M., Cox, T.S., Crews, T.E., Culman, S.W., DeHaan, L.R., Eriksson, D., Gill, B.S., Holland, J., Hu, F., Hulke, B.S., Ibrahim, A.M.H., Jackson, W., Jones, S.S., Murray, S.C., Paterson, A.H., Ploschuk, E., Sacks, E.J., Snapp, S., Tao, D., Tassel, D.L.V., Wade, L.J., Wyse, D.L., Xu, Y., 2010. Increased food and ecosystem security via perennial grains. *Science* 328, 1638–1639. doi:10.1126/science.1188761
- Gobat, J., Aragno, M., Matthey, W., 2010. Le sol vivant. Bases de pédologie-Biologie des sols, 3ème édition revue et augmentée, Science & Ingénierie de l'environnement. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Guenet, B., Camino-Serrano, M., Ciais, P., Tifafi, M., Maignan, F., Soong, J.L., Janssens, I.A., 2018. Impact of priming on global soil carbon stocks. *Global Change Biology* 24, 1873–1883. doi:10.1111/gcb.14069
- Guo, L.B., Gifford, R.M., 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology* 8, 345–360. doi:10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x

H

- Haber, F., Rossignol, R.L., 1913. Über die technische Darstellung von Ammoniak aus den Elementen. *Zeitschrift Für Elektrochemie Und Angewandte Physikalische Chemie* 19, 53–72. doi:10.1002/bbpc.19130190201
- Hanson, P.J., Edwards, N.T., Garten, C.T., Andrews, J.A., 2000. Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: A review of methods and observations. *Biogeochemistry* 48, 115–146. doi:10.1023/A:1006244819642

- Hari, P., Nöjd, P., 2009. The effect of temperature and PAR on the annual photosynthetic production of Scots pine in northern Finland during 1906–2002. *Boreal Environment Research* 14, 5–18.
- Hatfield, J.L., Prueger, J.H., 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes, USDA Research and Programs on Extreme Events* 10, 4–10. doi:10.1016/j.wace.2015.08.001
- Hayes, D.C., 1985. Seasonal nitrogen translocation in big bluestem during drought conditions. *Journal of Range Management* 38, 406–410. doi:10.2307/3899709
- Hébert, J., 1969. La fumure azotée du blé d’hiver. *Bull. Tech. Inform. Min. Agric.* 244, 755–766.
- Heimann, M., Reichstein, M., 2008. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* 451, 289–292. doi:10.1038/nature06591
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321, 117–152. doi:10.1007/s11104-008-9885-9
- Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology* 156, 1078–1086. doi:10.1104/pp.111.175331
- Houlès, V., Mary, B., Guérif, M., Makowski, D., Justes, E., 2004. Evaluation of the ability of the crop model STICS to recommend nitrogen fertilisation rates according to agro-environmental criteria. *Agronomie* 24, 339–349. doi:10.1051/agro:2004036
- Hubbell, D.H., 1995. Extension of symbiotic biological nitrogen fixation technology in developing countries. *Fertilizer Research* 42, 231–239. doi:10.1007/BF00750517
- Huo, C., Luo, Y., Cheng, W., 2017. Rhizosphere priming effect: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 78–84. doi:10.1016/j.soilbio.2017.04.003
- Huyghe, C., 2007. Place des prairies dans les territoires français : regard historique. *Fourrages* 189, 3–18.

I

- IPCC, 2014. Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. Geneva, Switzerland.

IPCC, 2018. Global warming of 1.5 °C: Summary for policymakers. Incheon, Republic of Korea.

J

Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C., Schmidt, S.K., 1999. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* 80, 1883–1891. doi:10.1890/0012-9658(1999)080[1883:SPONBP]2.0.CO;2

Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, 2013. Atlas Européen de la biodiversité des sols. Publications Office, Luxembourg.

Jenkinson, D.S., Potts, J.M., Perry, J.N., Barnett, V., Coleman, K., Johnston, A.E., 1994. Trends in herbage yields over the last century on the Rothamsted Long-term Continuous Hay Experiment. *The Journal of Agricultural Science* 122, 365–374. doi:10.1017/S0021859600067290

Jennings, D., Lysek, G., 1996. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.

Jensen, B., 1993. Rhizodeposition by ¹⁴CO₂-pulse-labelled spring barley grown in small field plots on sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1553–1559. doi:10.1016/0038-0717(93)90010-9

Jones, D.L., Hinsinger, P., 2008. The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil* 312, 1–6. doi:10.1007/s11104-008-9774-2

Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163, 459–480. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x

Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* 321, 5–33. doi:10.1007/s11104-009-9925-0

Justes, E., Mary, B., Meynard, J.-M., Machet, J.-M., Thelier-Huche, L., 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Annals of Botany* 74, 397–407. doi:10.1006/anbo.1994.1133

K

Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Kleber, M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change* 5, 588–595. doi:10.1038/nclimate2580

- Keith, H., Oades, J.M., Martin, J.K., 1986. Input of carbon to soil from wheat plants. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 445–449. doi:10.1016/0038-0717(86)90051-9
- Kirizii, D.A., Vorobei, N.A., Kots', S.Y., 2007. Relationships between nitrogen fixation and photosynthesis as the main components of the productivity in alfalfa. *Russian Journal of Plant Physiology* 54, 589–594. doi:10.1134/S1021443707050032
- Kirschbaum, M.U.F., 2000. Will changes in soil organic carbon act as a positive or negative feedback on global warming? *Biogeochemistry* 48, 21–51. doi:10.1023/A:1006238902976
- Kleber, M., Johnson, M.G., 2010. Chapter 3 - Advances in understanding the molecular structure of soil organic matter: Implications for interactions in the environment, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 77–142. doi:10.1016/S0065-2113(10)06003-7
- Kravchenko, A.N., Guber, A.K., 2017. Soil pores and their contributions to soil carbon processes. *Geoderma, STRUCTURE AND FUNCTION OF SOIL AND SOIL COVER IN A CHANGING WORLD: CHARACTERIZATION AND SCALING* 287, 31–39. doi:10.1016/j.geoderma.2016.06.027
- Krull, E.S., Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2003. Importance of mechanisms and processes of the stabilisation of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Functional Plant Biology* 30, 207–222. doi:10.1071/fp02085
- Kumar, A., Kuzyakov, Y., Pausch, J., 2016. Maize rhizosphere priming: field estimates using ¹³C natural abundance. *Plant and Soil* 409, 87–97. doi:10.1007/s11104-016-2958-2
- Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396. doi:https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<382::AID-JPLN382>3.0.CO;2-#
- Kuzyakov, Y., 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 425–448. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.020
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371. doi:10.1016/j.soilbio.2010.04.003
- Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001a. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. doi:10.1016/S0038-0717(01)00117-1
- Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2001b. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1915–1925. doi:10.1016/S0038-0717(01)00117-1

- Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2004. Photosynthesis controls of CO₂ efflux from maize rhizosphere. *Plant and Soil* 263, 85–99. doi:10.1023/B:PLSO.0000047728.61591.f0
- Kuzyakov, Y.V., 2001. Tracer studies of carbon translocation by plants from the atmosphere into the soil (a review). *Eurasian Soil Science* 34, 28–42.

L

- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1–22. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.032
- Lal, R., 2016. Beyond COP 21: Potential and challenges of the ‘4 per Thousand’ initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71, 20A–25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A
- Lal, Rattan, 2016. Beyond COP 21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71, 20A–25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A
- Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D., Barois, I., 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* 170, 23–33. doi:10.1007/BF02183052
- Lavelle, P., Spain, A., 2001. *Soil Ecology*. Springer Netherlands.
- Ledgard, S.F., Luo, J., Monaghan, R.M., 2011. Managing mineral N leaching in grassland systems., in: Lemaire, G., Hodgson, J., Chabbi, A. (Eds.), *Grassland Productivity and Ecosystem Services*. CABI, Wallingford, pp. 83–91. doi:10.1079/9781845938093.0083
- Lemaire, G., Nicolardot, B., 1997. *Maîtrise de l’azote dans les agrosystèmes: Reims (France)*, 19–20 novembre 1996. Editions Quae.
- Li, L., Tilman, D., Lambers, H., Zhang, F.-S., 2014. Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist* 203, 63–69. doi:10.1111/nph.12778
- Liljeroth, E., Kuikman, P., Veen, J.A.V., 1994. Carbon translocation to the rhizosphere of maize and wheat and influence on the turnover of native soil organic matter at different soil nitrogen levels. *Plant and Soil* 161, 233–240. doi:10.1007/BF00046394
- Liu, X.-J.A., Sun, J., Mau, R.L., Finley, B.K., Compson, Z.G., van Gestel, N., Brown, J.R., Schwartz, E., Dijkstra, P., Hungate, B.A., 2017. Labile carbon input determines the direction and magnitude of the priming effect. *Applied Soil Ecology* 109, 7–13. doi:10.1016/j.apsoil.2016.10.002
- Lloyd, J., Taylor, J.A., 1994. On the temperature dependence of soil respiration. *Functional Ecology* 8, 315–323. doi:10.2307/2389824
- Löhnis, F., 1926. Nitrogen availability of green manures. *Soil Science* 22, 253.

- Lorenz, K., Lal, R., 2018a. Agricultural land use and the global carbon cycle, in: Carbon Sequestration in Agricultural Ecosystems. Springer, pp. 1–37. doi:10.1007/978-3-319-92318-5_1
- Lorenz, K., Lal, R., 2018b. Carbon sequestration in grassland soils, in: Carbon Sequestration in Agricultural Ecosystems. Springer, pp. 175–209. doi:10.1007/978-3-319-92318-5_4
- Lorenz, K., Lal, R., 2018c. Carbon sequestration in cropland soils, in: Carbon Sequestration in Agricultural Ecosystems. Springer, pp. 137–173. doi:10.1007/978-3-319-92318-5_3
- Lorenz, K., Lal, R., 2018d. Soil Carbon Stock, in: Carbon Sequestration in Agricultural Ecosystems. Springer, Cham, pp. 39–136. doi:10.1007/978-3-319-92318-5_2
- Loubet, B., Laville, P., Lehuger, S., Larmanou, E., Fléchar, C., Mascher, N., Genermont, S., Roche, R., Ferrara, R.M., Stella, P., Personne, E., Durand, B., Decuq, C., Flura, D., Masson, S., Fanucci, O., Rampon, J.-N., Siemens, J., Kindler, R., Gabrielle, B., Schrumpf, M., Cellier, P., 2011. Carbon, nitrogen and Greenhouse gases budgets over a four years crop rotation in northern France. *Plant and Soil* 343, 109. doi:10.1007/s11104-011-0751-9
- Lynch, J.M., Panting, L.M., 1980. Variations in the size of the soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 12, 547–550. doi:10.1016/0038-0717(80)90033-4

M

- Macarthur, R., Levins, R., 1967. The Limiting Similarity, Convergence, and Divergence of Coexisting Species. *The American Naturalist* 101, 377–385. doi:10.1086/282505
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S., Valantin-Morison, M., 2009. Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29, 43–62. doi:10.1051/agro:2007057
- Manlay, R.J., Feller, C., Swift, M.J., 2007. Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119, 217–233. doi:10.1016/j.agee.2006.07.011
- Mariotti, A., 1997. Quelques réflexions sur le cycle biogéochimique de l’azote dans les agrosystèmes, in: *Maîtrise de l’azote dans les agrosystèmes*. Editions Quae.
- Mary, B., Recous, S., Robin, D., 1998. A model for calculating nitrogen fluxes in soil using ¹⁵N tracing. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1963–1979. doi:10.1016/S0038-0717(98)00068-6

- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J., 1997. Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science* 277, 504–509. doi:10.1126/science.277.5325.504
- MEA (Ed.), 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Meziane, D., Shipley, B., 2001. Direct and Indirect Relationships Between Specific Leaf Area, Leaf Nitrogen and Leaf Gas Exchange. Effects of Irradiance and Nutrient Supply. *Annals of Botany* 88, 915–927. doi:10.1006/anbo.2001.1536
- Moss, D.N., 1962. The Limiting Carbon Dioxide Concentration for Photosynthesis. *Nature* 193, 587. doi:10.1038/193587a0
- Myers, R.J.K., Palm, C.A., Cuevas, E., Gunatilleke, I.U.N., Brossard, M., 1994. The synchronisation of nutrient mineralisation and plant nutrient demand, in: Woomer, P.L., Swift, M.J. (Eds.), *The Biological Management of Tropical Soil Fertility*. J. Wiley, Chichester, pp. 81–116.

N

- Neergaard, A.D., Magid, J., 2001. Influence of the rhizosphere on microbial biomass and recently formed organic matter. *European Journal of Soil Science* 52, 377–384. doi:10.1046/j.1365-2389.2001.00393.x
- Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396. doi:10.1051/agro:2003011
- Nicholls, R.J., Cazenave, A., 2010. Sea-Level Rise and Its Impact on Coastal Zones. *Science* 328, 1517–1520. doi:10.1126/science.1185782

O

- Orchard, V.A., Cook, F.J., 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 447–453. doi:10.1016/0038-0717(83)90010-X

P

- Paul, E.A., 2016. The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology and Biochemistry* 98, 109–126. doi:10.1016/j.soilbio.2016.04.001
- Paul, E.A., Clark, F., 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, USA.
- Pausch, J., Kuzyakov, Y., 2018. Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24, 1–12. doi:10.1111/gcb.13850

- Pausch, J., Zhu, B., Kuzyakov, Y., Cheng, W., 2013. Plant inter-species effects on rhizosphere priming of soil organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 91–99. doi:10.1016/j.soilbio.2012.08.029
- Paustian, K., Levine, E., Post, W.M., Ryzhova, I.M., 1997. The use of models to integrate information and understanding of soil C at the regional scale. *Geoderma* 79, 227–260. doi:10.1016/S0016-7061(97)00043-8
- Pearce, R.B., Brown, R.H., Blaser, R.E., 1965. Relationships between Leaf Area Index, Light Interception and Net Photosynthesis in Orchardgrass 1. *Crop Science* 5, 553–556. doi:10.2135/cropsci1965.0011183X000500060021x
- Perveen, N., Barot, S., Alvarez, G., Klumpp, K., Martin, R., Rapaport, A., Herfurth, D., Louault, F., Fontaine, S., 2014. Priming effect and microbial diversity in ecosystem functioning and response to global change: a modeling approach using the SYMPHONY model. *Global Change Biology* 20, 1174–1190. doi:10.1111/gcb.12493
- Peterson, B.J., Fry, B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 293–320.
- Pianka, E.R., 1970. On r- and K-Selection. *The American Naturalist* 104, 592–597.
- Pimentel, D., Cerasale, D., Stanley, R.C., Perlman, R., Newman, E.M., Brent, L.C., Mullan, A., Chang, D.T.-I., 2012. Annual vs. perennial grain production. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 161, 1–9. doi:10.1016/j.agee.2012.05.025
- Plantureux, S., Pottier, E., Carrère, P., 2012. La prairie permanente : nouveaux enjeux, nouvelles définitions ? *Fourrages* 181–193.
- Plaza-Bonilla, D., Nolot, J.-M., Raffaillac, D., Justes, E., 2015. Cover crops mitigate nitrate leaching in cropping systems including grain legumes: Field evidence and model simulations. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 212, 1–12. doi:10.1016/j.agee.2015.06.014
- Plaza-Bonilla, D., Nolot, J.-M., Raffaillac, D., Justes, E., 2017. Innovative cropping systems to reduce N inputs and maintain wheat yields by inserting grain legumes and cover crops in southwestern France. *European Journal of Agronomy, Farming systems analysis and design for sustainable intensification: new methods and assessments* 82, 331–341. doi:10.1016/j.eja.2016.05.010

R

- Ramankutty, N., Evan, A.T., Monfreda, C., Foley, J.A., 2008. Farming the planet: 1. Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000: Global agricultural lands in 2000. *Global Biogeochemical Cycles* 22, 1–19. doi:10.1029/2007GB002952
- Recous, S., Lashermes, G., Bertrand, I., 2017. Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l'azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés, in: *Les Sols et La Vie Souterraine: Des Enjeux Majeurs En Agroécologie, Synthèses (Quae)*. Editions Quae, p. 328 p.
- Recous, S., Loiseau, P., Machet, J., Mary, B., 1996. Transformations et devenir de l'azote de l'engrais sous cultures annuelles et sous prairies, in: *Maitrise de l'azote Dans Les Agrosystèmes*. Editions Quae, pp. 105–120.
- Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529–1538. doi:10.1016/0038-0717(95)00096-W
- Reich, P.B., Hobbie, S.E., 2013. Decade-long soil nitrogen constraint on the CO₂ fertilization of plant biomass. *Nature Climate Change* 3, 278–282. doi:10.1038/nclimate1694
- Reich, P.B., Hobbie, S.E., Lee, T., Ellsworth, D.S., West, J.B., Tilman, D., Knops, J.M.H., Naeem, S., Trost, J., 2006. Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* 440, 922–925. doi:10.1038/nature04486
- Reichstein, M., Falge, E., Baldocchi, D., Papale, D., Aubinet, M., Berbigier, P., Bernhofer, C., Buchmann, N., Gilmanov, T., Granier, A., Grünwald, T., Havránková, K., Ilvesniemi, H., Janous, D., Knohl, A., Laurila, T., Lohila, A., Loustau, D., Matteucci, G., Meyers, T., Miglietta, F., Ourcival, J.-M., Pumpanen, J., Rambal, S., Rotenberg, E., Sanz, M., Tenhunen, J., Seufert, G., Vaccari, F., Vesala, T., Yakir, D., Valentini, R., 2005. On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Global Change Biology* 11, 1424–1439. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.001002.x
- Rémy, J.C., 1974. Pas de recettes passe-partout pour la fertilisation du blé. *Fermes Modernes* n° spécial 'Le blé: céréale d'avenir', 89–96.
- Richardson, S.J., Peltzer, D.A., Allen, R.B., McGlone, M.S., Parfitt, R.L., 2004. Rapid development of phosphorus limitation in temperate rainforest along the Franz Josef soil chronosequence. *Oecologia* 139, 267–276. doi:10.1007/s00442-004-1501-y
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., Nykvist, B., de Wit, C.A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P.K., Costanza, R., Svedin, U.,

Falkenmark, M., Karlberg, L., Corell, R.W., Fabry, V.J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P., Foley, J.A., 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461, 472–475. doi:10.1038/461472a

S

- Saugier, B., Roy, J., Mooney, H.A., 2001. 23 - Estimations of Global Terrestrial Productivity: Converging toward a Single Number?, in: Roy, J., Saugier, B., Mooney, H.A. (Eds.), *Terrestrial Global Productivity, Physiological Ecology*. Academic Press, San Diego, pp. 543–557. doi:10.1016/B978-012505290-0/50024-7
- Scheinost, P.L., Lammer, D.L., Cai, X., Murray, T.D., Jones, S.S., 2001. Perennial wheat: The development of a sustainable cropping system for the U.S. Pacific Northwest. *American Journal of Alternative Agriculture* 16, 147–151. doi:10.1017/S0889189300009115
- Schmidt, S.K., Costello, E.K., Nemergut, D.R., Cleveland, C.C., Reed, S.C., Weintraub, M.N., Meyer, A.F., Martin, A.M., 2007. BIOGEOCHEMICAL CONSEQUENCES OF RAPID MICROBIAL TURNOVER AND SEASONAL SUCCESSION IN SOIL. *Ecology* 88, 1379–1385. doi:10.1890/06-0164
- Schneider, M.K., Lüscher, A., Richter, M., Aeschlimann, U., Hartwig, U.A., Blum, H., Frossard, E., Nösberger, J., 2004. Ten years of free-air CO₂ enrichment altered the mobilization of N from soil in *Lolium perenne* L. swards. *Global Change Biology* 10, 1377–1388. doi:10.1111/j.1365-2486.2004.00803.x
- Schulze, E.D., Luyssaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I.A., Soussana, J.F., Smith, P., Grace, J., Levin, I., Thiruchittampalam, B., Heimann, M., Dolman, A.J., Valentini, R., Bousquet, P., Peylin, P., Peters, W., Rödenbeck, C., Etiope, G., Vuichard, N., Wattenbach, M., Nabuurs, G.J., Poussi, Z., Nieschulze, J., Gash, J.H., the CarboEurope Team, 2009. Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nature Geoscience* 2, 842–850. doi:10.1038/ngeo686
- Schulze, E.-D., Robichaux, R.H., Grace, J., Rundel, P.W., Ehleringer, J.R., 1987. Plant Water Balance In diverse habitats, where water often is scarce, plants display a variety of mechanisms for managing this essential resource. *BioScience* 37, 30–37. doi:10.2307/1310175
- Shahzad, T., 2012. Role of plant rhizosphere across multiple species, grassland management and temperature on microbial communities and long term soil organic matter dynamics. Paris, AgroParisTech.

- Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C., Fontaine, S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 146–155. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.023
- Shahzad, T., Chenu, C., Repinçay, C., Mougin, C., Ollier, J.-L., Fontaine, S., 2012. Plant clipping decelerates the mineralization of recalcitrant soil organic matter under multiple grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 73–80. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.014
- Shahzad, T., Rashid, M.I., Maire, V., Barot, S., Perveen, N., Alvarez, G., Mougin, C., Fontaine, S., 2018. Root penetration in deep soil layers stimulates mineralization of millennia-old organic carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 124, 150–160. doi:10.1016/j.soilbio.2018.06.010
- Smil, V., 1999. Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13, 647–662. doi:10.1029/1999GB900015
- Smith, V.H., 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10, 126–139. doi:10.1065/espr2002.12.142
- Snapp, S., 2017. Chapter 2 - Agroecology: Principles and practice, in: Snapp, S., Pound, B. (Eds.), *Agricultural Systems* (Second Edition). Academic Press, San Diego, USA, pp. 33–72. doi:10.1016/B978-0-12-802070-8.00002-5
- Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G.M., Persson, L.M., Ramanathan, V., Reyers, B., Sorlin, S., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855–1259855. doi:10.1126/science.1259855
- Sterner, R., Elser, J., 2002. *Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, New Jersey.
- Sun, Z., Chen, Q., Han, X., Bol, R., Qu, B., Meng, F., 2018. Allocation of photosynthesized carbon in an intensively farmed winter wheat–soil system as revealed by ^{14}C pulse labelling. *Scientific Reports* 8, 3160. doi:10.1038/s41598-018-21547-y
- Swift, M.J., Heal, O., Anderson, J., 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

T

- Tang, X., Bernard, L., Brauman, A., Daufresne, T., Deleporte, P., Desclaux, D., Souche, G., Placella, S.A., Hinsinger, P., 2014. Increase in microbial biomass and phosphorus availability in the rhizosphere of intercropped cereal and legumes under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 86–93. doi:10.1016/j.soilbio.2014.04.001
- Thurgood, A., Singh, B., Jones, E., Barbour, M.M., 2014. Temperature sensitivity of soil and root respiration in contrasting soils. *Plant and Soil* 382, 253–267. doi:10.1007/s11104-014-2159-9
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. doi:10.1038/nature01014
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D’Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292, 281–284. doi:10.1126/science.1057544
- Tolbert, N.E., Benker, C., Beck, E., 1995. The oxygen and carbon dioxide compensation points of C3 plants: possible role in regulating atmospheric oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 11230–11233. doi:10.1073/pnas.92.24.11230
- Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C., Blanchart, E., 2016. Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. *Plant and Soil* 398, 1–24. doi:10.1007/s11104-015-2671-6
- Tuba, Z., Csintalan, Z., Szente, K., Nagy, Z., Fekete, G., Larcher, W., Lichtenthaler, H.K., 2008. Winter photosynthetic activity of twenty temperate semi-desert sand grassland species. *Journal of Plant Physiology* 165, 1438–1454. doi:10.1016/j.jplph.2007.10.017

V

- van Groenigen, K.J., Osenberg, C.W., Terrer, C., Carrillo, Y., Dijkstra, F.A., Heath, J., Nie, M., Pendall, E., Phillips, R.P., Hungate, B.A., 2017. Faster turnover of new soil carbon inputs under increased atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 23, 4420–4429. doi:10.1111/gcb.13752
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703–707. doi:10.1016/0038-0717(87)90052-6
- Venterea, R.T., Halvorson, A.D., Kitchen, N., Liebig, M.A., Cavigelli, M.A., Grosso, S.J.D., Motavalli, P.P., Nelson, K.A., Spokas, K.A., Singh, B.P., Stewart, C.E., Ranaivoson,

- A., Strock, J., Collins, H., 2012. Challenges and opportunities for mitigating nitrous oxide emissions from fertilized cropping systems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10, 562–570. doi:10.1890/120062
- Vertès, F., Decau, M.L., 1992. Suivis d'azote minéral dans les sols: risque de lessivage de nitrate selon le couvert végétal. *Fourrages* 11–28.
- Vestergård, M., Reinsch, S., Bengtson, P., Ambus, P., Christensen, S., 2016. Enhanced priming of old, not new soil carbon at elevated atmospheric CO₂. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 140–148. doi:10.1016/j.soilbio.2016.06.010
- Vitousek, P.M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Tilman, G.D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle : Causes and consequences. *Ecological Society of America, Issues in Ecology* 1–16.
- Vitousek, P.M., Howarth, R.W., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115. doi:10.1007/BF00002772

W

- Wagoner, P., 1990. Perennial grain development: Past efforts and potential for the future. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9, 381–408. doi:10.1080/07352689009382298
- Wang, X., Tang, C., Severi, J., Butterly, C.R., Baldock, J.A., 2016. Rhizosphere priming effect on soil organic carbon decomposition under plant species differing in soil acidification and root exudation. *New Phytologist* 211, 864–873. doi:10.1111/nph.13966
- Wingler, A., Hennessy, D., 2016. Limitation of Grassland Productivity by Low Temperature and Seasonality of Growth. *Frontiers in Plant Science* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01130
- Wissuwa, M., 2003. How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects. *Plant Physiology* 133, 1947–1958. doi:10.1104/pp.103.029306

X-Z

- Xu, Z.Z., Zhou, G.S., 2006. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta* 224, 1080–1090. doi:10.1007/s00425-006-0281-5
- Young, I.M., Crawford, J.W., 2004. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304, 1634–1637. doi:10.1126/science.1097394
- Zhang, F., Quan, Q., Song, B., Sun, J., Chen, Y., Zhou, Q., Niu, S., 2017. Net primary productivity and its partitioning in response to precipitation gradient in an alpine meadow. *Scientific Reports* 7, 15193. doi:10.1038/s41598-017-15580-6

Zhu, B., Cheng, W., 2012. Nodulated soybean enhances rhizosphere priming effects on soil organic matter decomposition more than non-nodulated soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 51, 56–65. doi:10.1016/j.soilbio.2012.04.016

ANNEXES

FICHES SYNTHETIQUES

PART 1: Test of the bank mechanism in a temperate grassland by using seasonal N dynamics and manipulation of carbon and nitrogen to modulate plant nitrogen demand.

The main source of nutrient for plant growth comes from the mineralization of soil organic matter (SOM) by microorganisms. The destruction of SOM by microorganisms implies a phenomenon called rhizosphere priming effect (RPE), consisting in a change in SOM decomposition due to fresh organic matter (FOM) supplying microorganisms in fresh energy compound (RPE) (Liljeroth et al., 1994; Kuzyakov, 2002). By definition, SOM decomposition through RPE is limited by fresh carbon (C). Moreover, studies report that the mineral nitrogen (N) availability in soil solution modulates the intensity of this degradation (Fontaine et al., 2004, 2007). Plants could have an indirect control on N availability in soil solution, depending on its N uptake, leading to a theory suggesting that the soil function as a bank of nutrients for plants, *i.e.* the bank mechanism (Fontaine and Barot, 2005; Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). According to the bank mechanism, a release of nutrients from SOM would occur when the N availability in soil solution is low due to high plant N uptake (**Fig. 1**). In contrast, a sequestration of SOM could be observed if the plant N uptake is low, leading to N excess in soil solution. The sequestration or release of N from SOM by microorganisms is defined by the difference between the rates of N mineralization and immobilization fluxes (**Fig. 1**).

The aim of this study was to test the bank mechanism on grassland plant mixtures (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*) by manipulating the C and N availabilities for plant in order to modulate plant N demand. The plant N demand was manipulated by using ambient and elevated atmospheric CO₂ concentrations (C-:400ppm; C+:700ppm) and low and high levels of N fertilization (N-: 40 kg N ha⁻¹ year⁻¹; N+: 200 kg N ha⁻¹ year⁻¹). First, we hypothesized that the soil N offer can be adjusted to plant N demand according to seasons. Secondly, we assumed that elevated CO₂ can increase plant photosynthesis leading to an intensification of RPE and gross N mineralization in response to high plant N demand. Thirdly, we hypothesized that N

fertilization can favor N sequestration in SOM through the favor of immobilization fluxes in comparison to mineralization fluxes. The adjustment of soil N offer to plant N demand was tested by measuring the response of soil fluxes to photosynthetic fluxes. In order to characterize the soil offer potential, the mineralization immobilization turnover (MIT) was measured at two key seasons (spring and winter). The delta between the potential of gross N mineralization and immobilization (delta MIT) was calculated to estimate the soil offer, considering that the delta MIT increases when the soil N offer increases. The RPE was also measured over the year as an indicator of SOM destruction. The plant N demand was characterized by measuring gross primary production (GPP).

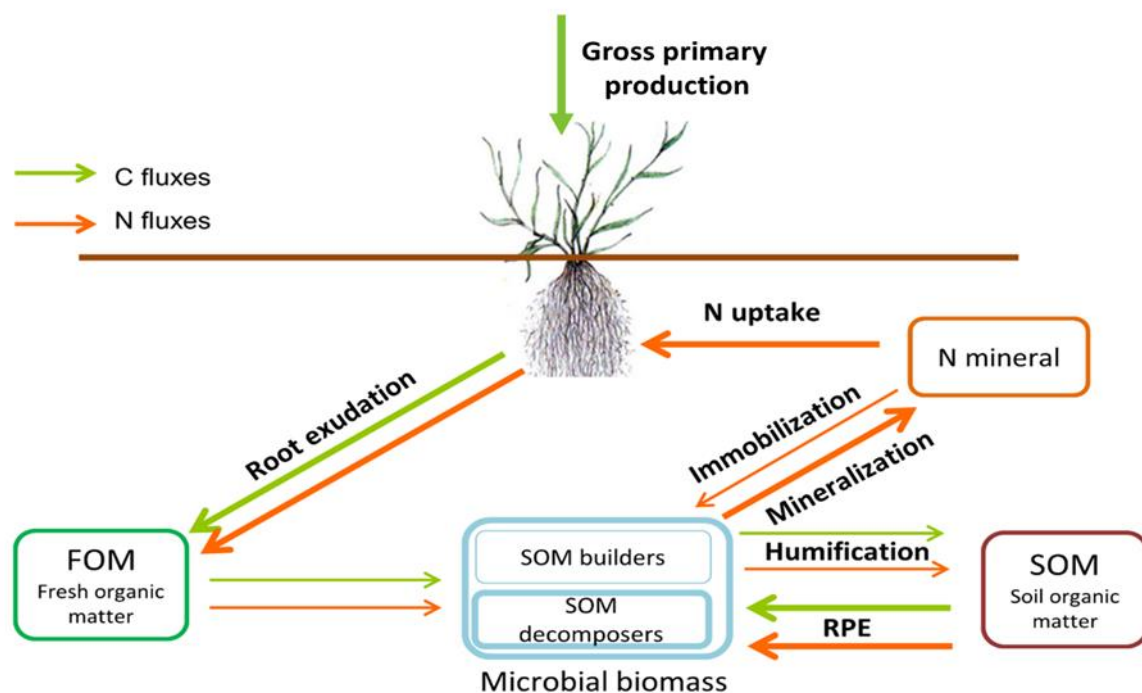


Figure 1 : Diagram of the bank mechanism theory adapted for high plant nitrogen (N) demand. Bold arrows stand for high intensity of the process or the compartment associated (adapted from Fontaine et al., 2011 and Perveen et al., 2014).

The different treatments (N-C-, N-C+, N+C- and a bare soil control) were conducted in an experimental mesocosm platform coupling continuous CO₂ exchange measurements and plant labeling with ¹³C depleted CO₂ from fossil fuel origin allowing RPE and GPP measurements. More details are available in Cros et al. (2019). Simultaneously, greenhouses containing pots dedicated to soil destructive measurements were conducted. More details are available in Chapter: “*Perennial species promote the synchronization between plant nitrogen demand and soil nitrogen offer even in grassland-wheat monocrop*”. Pots were harvested in May and November allowing the quantification of gross N mineralization and immobilization with the ¹⁵N pool dilution technique (Davidson et al., 1991; Recous et al., 1995; Mary et al., 1998).

Large variations of GPP were observed over the year depending on seasons and plant cutting (**Fig. 2A**). We observed a continuous GPP over the year for all treatments. Overall, GPP rapidly increased from March 2017 to May 2017 and decreased after a cut. The same pattern was observed from May 2017 to July 2017 and July 2017 to October 2017 for these treatments (**Fig. 2A**). Over the year, we observed a significant positive effect of N and C fertilization in comparison to the control (N-C-) (*P<0.05).

The variations of RPE measured during the growing season period followed the dynamic of GPP (**Fig. 2B**). Indeed, strong positive relationships between RPE and GPP were found for all treatments with an overall R² of 0.67 (*P<0.05) (**Fig. 3**). Overall, the RPE increased from March 2017 to May 2017 and decreased after a cut. The same pattern was observed from July 2017 to October 2017. The N fertilization increased significantly the RPE only on 12th May 2017 in comparison to N-C- control (**Fig. 2B**). The C fertilization did not affect the RPE compare to N-C- control.

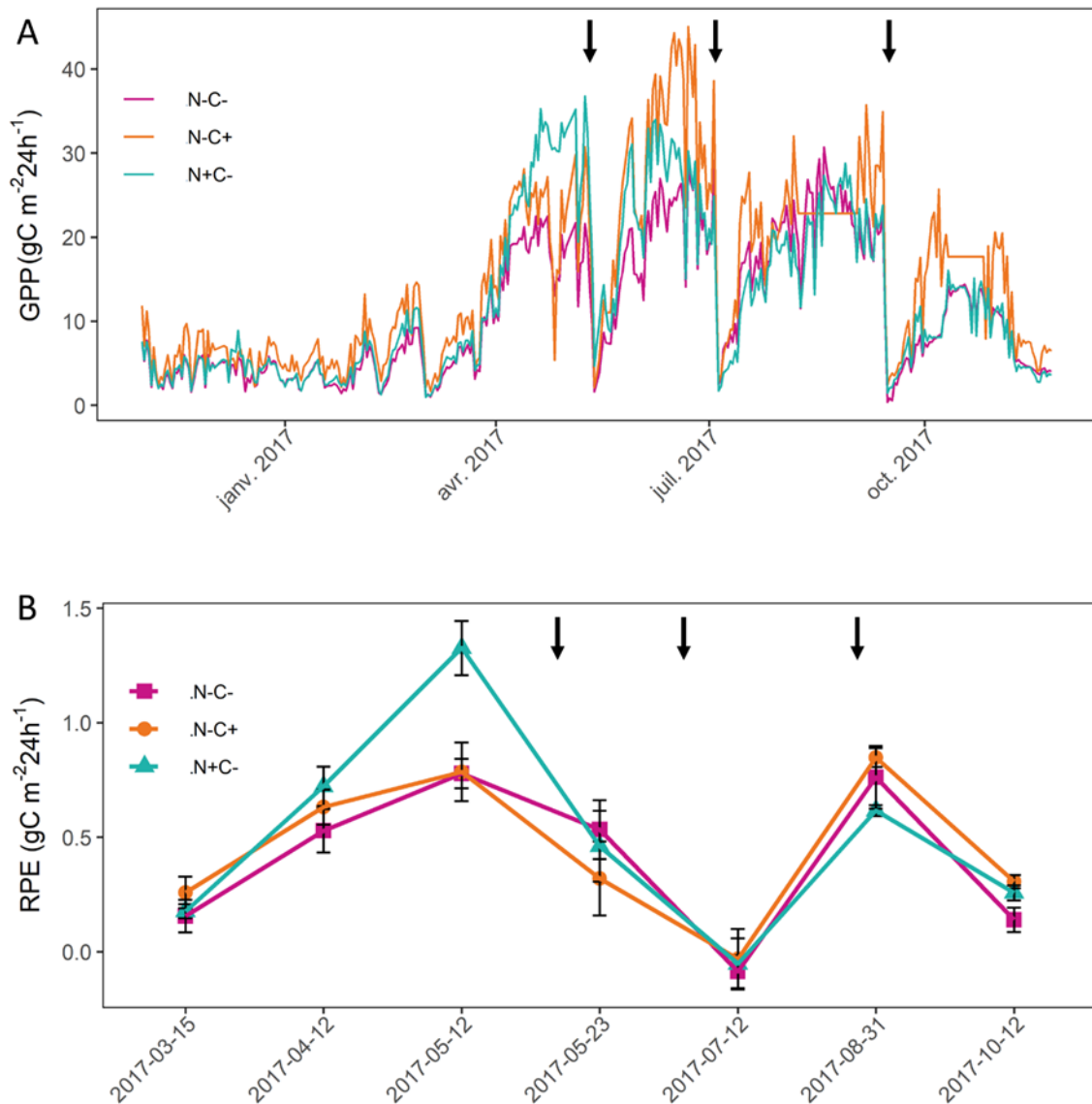


Figure 2 : (A) Dynamic of gross primary production from 1th November 2016 to 24th November 2017 for the different treatments; and (B) dynamic of rhizosphere priming effect (RPE) over the growing season period for each treatment. Error bars stand for standard errors. Pink lines stand for grassland with low level of fertilization and ambient CO₂ concentration, orange lines for the grassland with low level of fertilization and elevated CO₂ concentration and green lines correspond to the grassland with high level of fertilization and ambient CO₂ concentration. Arrows stand for plant cuts.

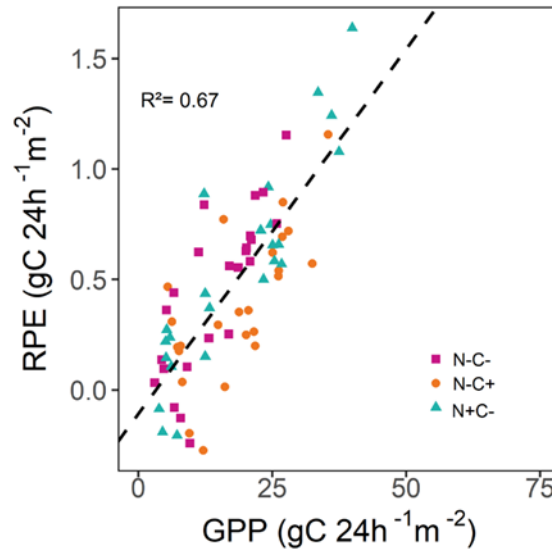


Figure 3: Relationships between rhizosphere priming effect (RPE) and gross primary production (GPP) for seven RPE measurements. Dotted lines represented linear regressions between the two variables. N-: 40kg N ha⁻¹year⁻¹, N+: 200kg N ha⁻¹ year⁻¹, C-:400 ppm, C+: 700ppm.

Overall, no significant difference between treatments was observed in delta MIT, both in May and in November (**Fig. 4A**). However, by testing independently for an effect of either C or N fertilization, we found a significant positive effect in comparison to the control N-C- in May (**Fig. 4A**). The delta MIT significantly decreased from May to November in planted soil (*P<0.05) (**Fig. 4A**).

Significant positive relationships were observed between delta MIT and GPP for the three planted treatments (*P<0.05) (**Fig. 4B**), allowing the determination of the following equations: N- C-: $0.37 \times \text{GPP} - 8.07$; N- C+: $0.28 \times \text{GPP} - 7.60$; N+ C-: $0.16 \times \text{GPP} - 5.43$. By using these equations, we estimated delta MIT for equivalent simulated GPP values for each treatment (**Fig. 4C**). We found that for high GPP values, the delta MIT is lower with both high level of N fertilization and elevated CO₂ in comparison to the control N-C- (**Fig. 4C**).

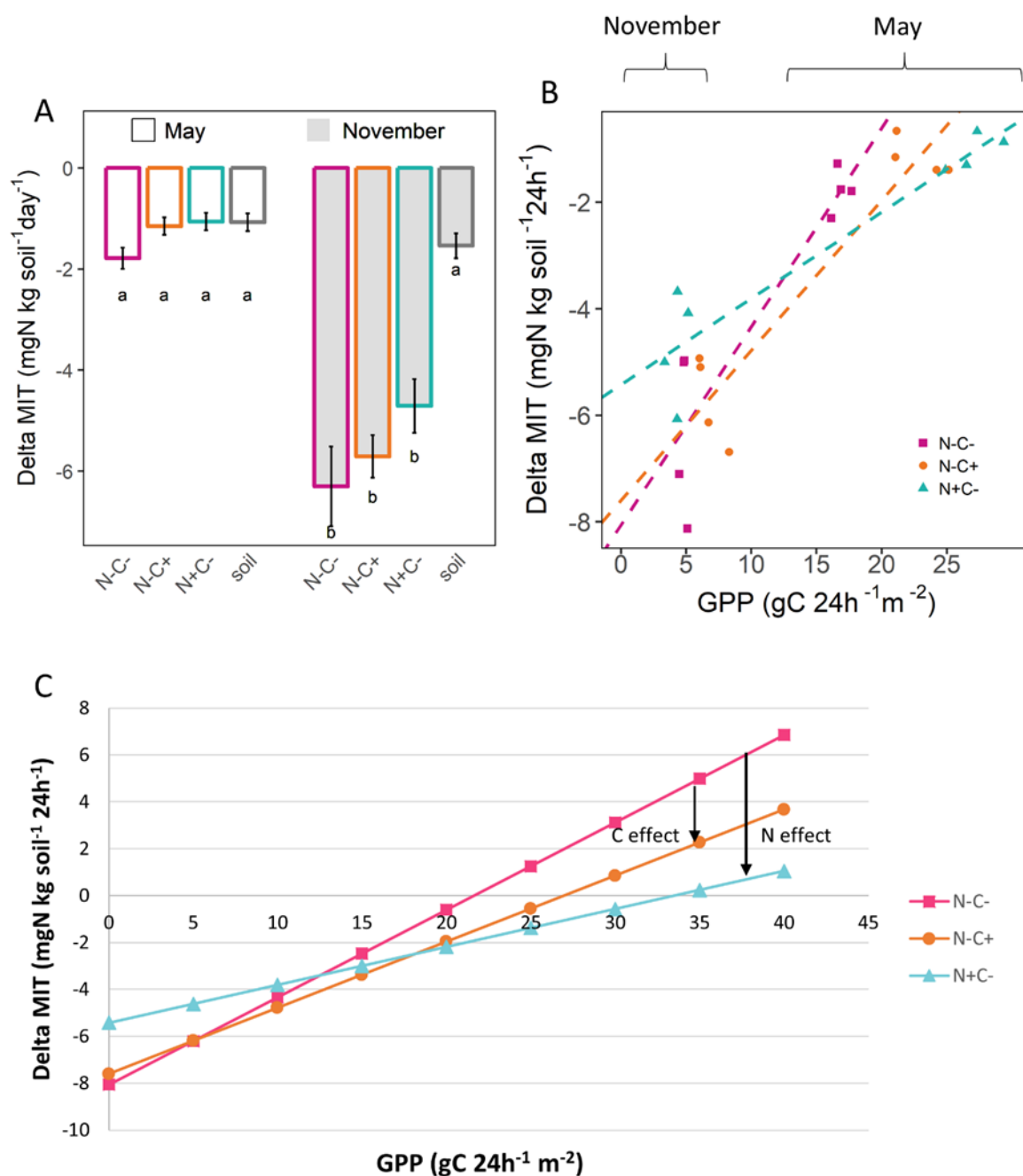


Figure 4: (A) Difference between gross N mineralization and immobilization (delta MIT) measured in May (Spring) and November (autumn) 2017 for each treatment. Error bars stand for standard errors. Letters indicate significant differences between treatments at each date (one-way ANOVA following by Tukey's post hoc test, * $P < 0.05$). (B) Relationships between delta MIT (gross N mineralization minus gross N immobilization) and GPP for the two MIT measurements (May and November). Dotted lines represented linear regressions between the two variables. (C) Delta MIT estimates for simulated GPP values using the equations listed

above for each treatment. N-: 40kg N ha⁻¹year⁻¹, N+: 200kg N ha⁻¹ year⁻¹, C-:400 ppm, C+: 700ppm. Soil indicates the bare soil control.

Hypothesis 1: adjustment of soil N offer to plant N demand over the seasons:

The close positive relationships between delta MIT and GPP (**Fig. 4B**) highlight the adjustment of soil N offer to plant N demand in grasslands across the seasons. Indeed, we observed seasonal variations of SOM destruction (RPE) and delta MIT characterizing the soil offer (**Fig. 2B, 4A**). In May, when the plant demand was high, the SOM destruction and the soil offer were high, while in November the SOM destruction and soil offer largely decreased. We provide new evidences in favor of the existence of the bank mechanism proposed by Fontaine and Barot (2005) and developed in SYMPHONY model (Perveen et al., 2014).

Hypothesis 2: The N fertilization favor the nutrient sequestration:

At first sight, we found that in May (high plant demand), the delta MIT was higher in N+ compared to N- control, while GPP was not equivalent (higher in N+). The simulations made to estimate the delta MIT for fixed GPP values showed that the soil N offer is lower for high GPP values in high level of fertilization in comparison to low level of fertilization (**Fig. 4C**). That means that N sequestration is favored when N input is added. We suggest that the assumption of the bank mechanism implying that the sequestration or released of N mineral depends on N availability in soil solution is validated by our findings.

Hypothesis 3: The C fertilization through elevated CO₂ concentration increases the soil offer due to an increase of plant demand:

Elevated CO₂ concentration stimulated photosynthesis activity but did not induce an increase of SOM destruction. Elevated CO₂ induced a higher soil offer in May in comparison to control N-C- while the GPP was higher. Simulations made on the equations obtained from **Fig. 4B** show that, for the same GPP, soil N offer is slightly lower in elevated CO₂ compared to ambient CO₂ atmospheric concentration. This absence of soil offer increase might be due to the presence of legumes species, which can use the symbiotic N₂ fixation as source of N instead of destruct the SOM.

PART 2: Intercropping grass with legumes under elevated CO₂ provide higher plant biomass without altering soil regulations

In a context of changing world, policies and current studies would want to limit the increase of atmospheric CO₂ concentration by using soil as a carbon sink (Lal, 2016; Chabbi et al., 2017). However, some studies suggest that climate change can conduct to a negative soil carbon (C) balance (Carney et al., 2007; Perveen et al., 2014; Vestergård et al., 2016) leading to a positive feedback of soil to climate change (Heimann and Reichstein, 2008). Others predict a null effect of climate change on soil C balance (van Groenigen et al., 2017). Hence, a better understanding is needed of how elevated CO₂ atmosphere concentration (eCO₂) will affect the soil organic carbon (SOC) stock.

Under eCO₂, most of the studies agreed that plant photosynthetic activity is stimulated (Hungate et al., 1997; Cheng, 1999). Since the plant rhizodeposits are proportionally linked to photosynthesis (Nguyen, 2003; Pausch and Kuzyakov, 2018), the increase of photosynthesis would increase fresh C input into the soil (*i.e.* rhizodeposits). Through this means, some scientists expect an increase of SOM destocking into the soil under eCO₂ (Vestergård et al., 2016). Indeed, through their rhizodeposits and especially root exudation, plants accelerate soil organic matter (SOM) decomposition by stimulating microorganism activities; a phenomenon called ‘rhizosphere priming effect’ (RPE) (Liljeroth et al., 1994; Kuzyakov, 2002; Shahzad et al., 2015). Moreover, according to bank mechanism, the stimulation of photosynthesis would increase plant nitrogen (N) demand, leading to an adjustment of soil N offer (Fontaine and Barot, 2005; Fontaine et al., 2011; Perveen et al., 2014). Consistent with the bank mechanism, an increase in plant N demand would lead to an exhaustion of mineral N in soil solution, which could conduct to a stimulation of SOM destruction and N mineralization releasing mineral N for plant growth (Fontaine et al., 2004, 2011; Perveen et al., 2014).

The aim of this paper was to increase our knowledge on the effect of eCO₂ on grasslands composed with grass monocrop or grass and legume intercrop (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*) through the study of the bank mechanism. First, we hypothesized that elevated CO₂ increases the plant biomass increasing plant N demand leading to an increase of SOM destruction and N mineralization in comparison to grass under ambient CO₂. Secondly, we hypothesized that the presence of legume counteracts the SOM destruction by using symbiotic N fixation as source of N. The adjustment of soil N offer to plant N demand was tested by measuring the response of soil fluxes to photosynthetic fluxes. In order to characterize the soil offer potential, mineralization immobilization turnover (MIT) was measured at three keys stages (end of winter, spring, autumn). The delta between potential of gross N mineralization and immobilization (delta MIT) has been calculated to estimate the soil offer, considering that delta MIT increases when the soil N offer increases. The RPE was also measured over the year as an indicator of SOM destruction. Plant N demand was characterized by measuring gross primary production (GPP). The aboveground and belowground biomass were measured several times during the experiment by plant cuts and destructive measurements, respectively.

The different treatments (grass monocrop and grass-legume intercrop under ambient or elevated CO₂) were conducted for one year in an experimental mesocosm platform coupling continuous CO₂ exchange measurements and plant labeling with ¹³C depleted CO₂ from fossil fuel origin allowing RPE and GPP measurements. More details are available in Cros et al. (2019). Simultaneously, greenhouses containing pots dedicated to soil destructive measurements were conducted. More details are available in Chapter 4: “*Perennial species promote the synchronization between plant nitrogen demand and soil nitrogen offer even in grassland-wheat monocrop*”. Pots were harvested in March, May and November 2017, allowing the quantification of roots biomass and gross N mineralization and immobilization with the ¹⁵N pool dilution technique (Davidson et al., 1991; Recous et al., 1995; Mary et al.,

1998). Four aboveground cuts were made during the experiment (May, July, September and November).

Annual GPP was significantly higher in grass-legume intercrop than in grass monocrop. The eCO_2 increased significantly the annual GPP of grass-legume intercrop but not of grass monocrop (**Fig. 5A**). More specifically, in grass monocrop, eCO_2 had a significant positive effect on GPP from November 2016 to April 2017 and from July 2017 to the end of the experiment (**Fig. 5A**). From April 2017 to July 2017, no significant difference in GPP between ambient and eCO_2 was observed. In grass-legume intercrop, the effect of eCO_2 was significant over time. After the first cut in May, the GPP of the grass monocrop decreased (**Fig. 5A**).

The aboveground biomass of the grass-intercrop and grass monocrop were similar until the cut of May (**Fig. 5B**). Then, we observed a decrease of grass monocrop production (**Fig. 5B**). The aboveground biomass of grass monocrop in eCO_2 was similar to the ambient, while the aboveground biomass was higher in eCO_2 for the grass-legume intercrop (**Fig. 5B**).

Root biomass was higher in eCO_2 than ambient for the two treatments (**Fig. 5C**). No difference between grass monocrop and grass-legume intercrop was observed.

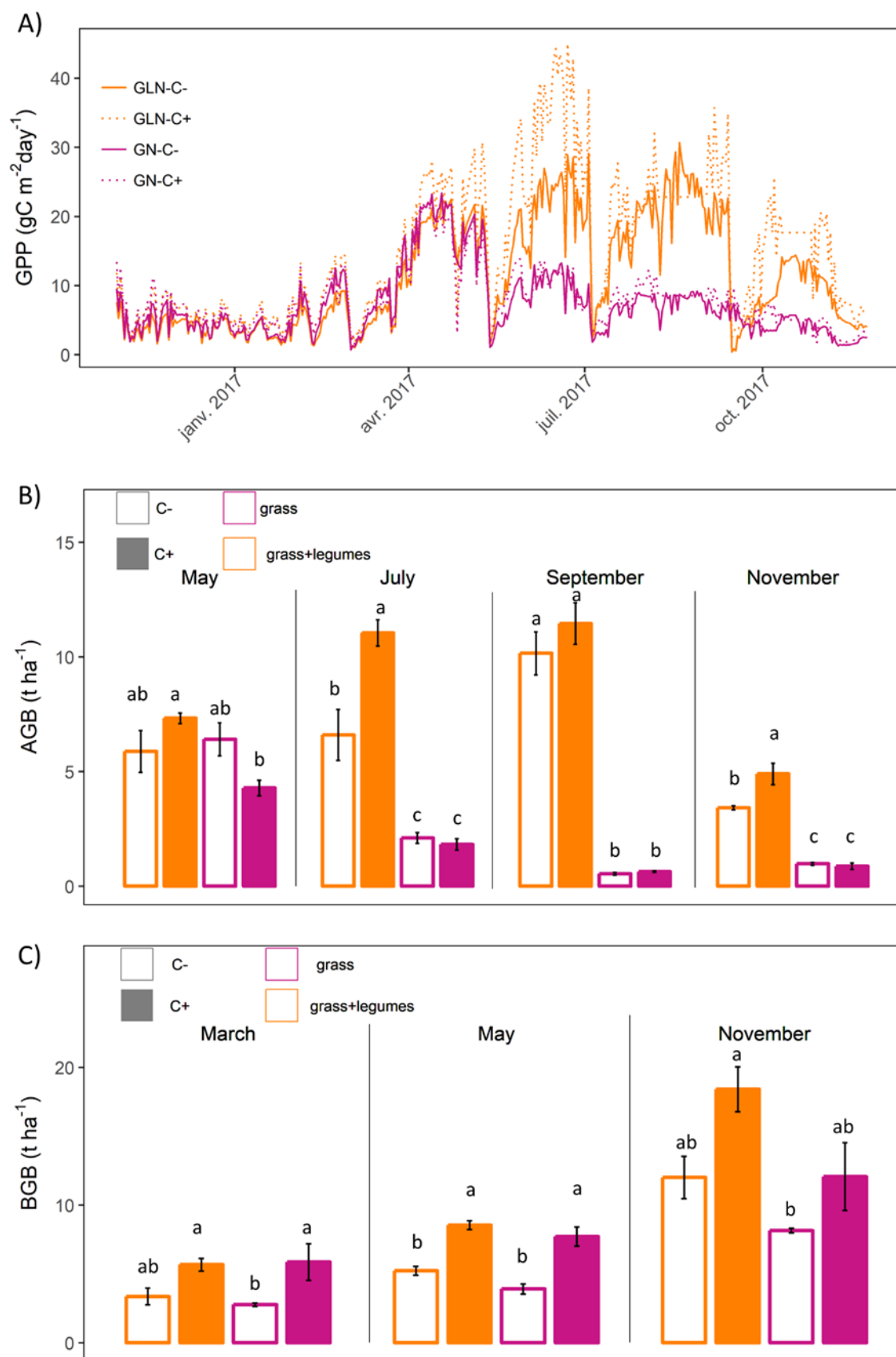


Figure 5: (A) Dynamic of gross primary production from 1th November 2016 to 24th November 2017 for the different treatments; (B) Aboveground biomass (AGB) measured for the four plant cut for the different treatments ;(C) Belowground biomass (BGB) measured during the destructive measurements of March, May and November for the different treatments. Orange bars and lines stand for grass-legume intercrop and red bars and lines for grass in monocrop. Dotted lines and filled bars stand for elevated CO₂ concentration. Error bars stand for standard errors. Letters indicate significant differences between treatments at each date (one-way ANOVA following by Tukey's post hoc test, *P<0.05).

The RPE was significantly higher in grass-legume intercrop compared to grass monocrop, except after the cut of July (**Fig. 6A**). In grass-legume intercrop, the dynamics of RPE over the year was not different in ambient and eCO₂ (*P>0.05). In contrast, in grass monocrop, the RPE was lower in eCO₂ than in ambient from May to July (**Fig. 6A**) and higher in eCO₂ than ambient in March, August and October (*P<0.05).

In March, delta MIT was significantly higher in eCO₂ than ambient for grass monocrop (**Fig. 6B**). No significant difference was observed in grass-legume intercrop for this date. In May, no significant difference between treatments was observed (**Fig. 6B**). In November, delta MIT was lower in grass-legume intercrop than grass monocrop. No effect of CO₂ was observed for this date. Delta MIT decreased from May to November (**Fig. 6B**).

Significant positive relationships between RPE and GPP were observed for each treatment (**Fig. 7A**).

Significant positive relationships between delta MIT and GPP were found for each treatment (**Fig. 7B**). The regression line calculated for grass monocrop showed higher delta MIT in eCO₂ than ambient for equivalent GPP. The opposite trend was observed for grass-legume intercrop.

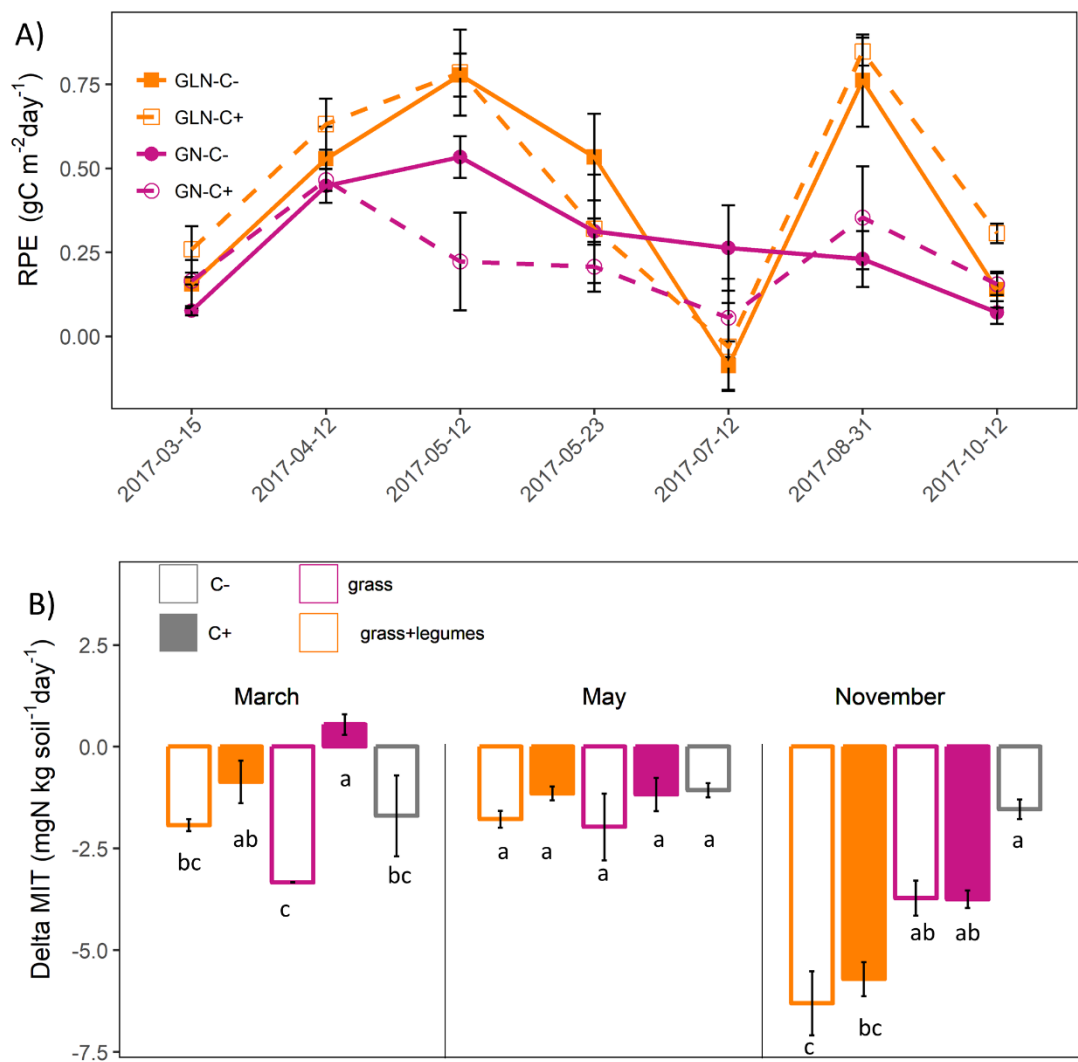


Figure 6: (A) Dynamic of rhizosphere priming effect (RPE) over the growing season period (2017) for each treatment. (B) Difference between gross N mineralization and immobilization (delta MIT) measured in March (end of winter), May (spring) and November (autumn) 2017 for each treatment. Orange bars and lines stand for grass-legume intercrop and red bars and lines for grass in monocrop. Grey bars stand for bare soil control. Dotted lines and filled bars stand for elevated CO₂ concentration. Error bars stand for standard errors. Letters indicate significant differences between treatments at each date (one-way ANOVA following by Tukey's post hoc test, *P<0.05).

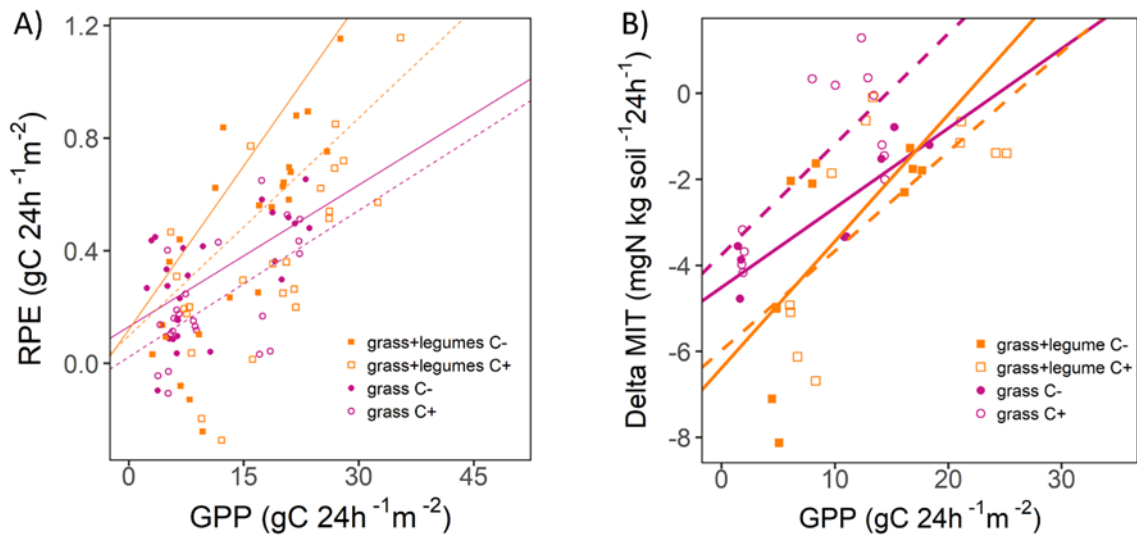


Figure 7: (A) Relationships between the rhizosphere priming effect (RPE) and the gross primary production (GPP) for seven RPE measurements; (B) relationships between the delta MIT (gross N mineralization minus gross N immobilization) and GPP for the three MIT measurements (March, May and November). Orange lines stand for grass-legume intercrop and red lines for grass in monocrop. Dotted lines represent linear regressions for elevated CO₂ while solid lines represent linear regression for ambient CO₂. Linear regressions were performed with linear mixed model and all the regressions were significant (*P<0.05).

Hypothesis 1: Elevated CO₂ concentration increases plant photosynthetic activity of grass leading to a stimulation of SOM destruction and N mineraliation rate in response to an increase of plant N demand:

The overall effect of eCO₂ on annual GPP was not significant in grass monocrop. The relationships observed in Figure 3 show an adjustment of soil N offer to plant N demand, suggesting that bank mechanism occurred in both ambient and eCO₂. In eCO₂, C fixed was preferentially allocated to roots, probably due to an exhaustion of mineral N in soil solution.

Indeed, in March, we observed a significant lower mineral N concentration in soil solution in eCO₂ than ambient (data not shown). Simultaneously, we observed a slightly higher GPP in eCO₂ than ambient, suggesting that a higher plant demand occurred. At this date, we observed a higher SOM destruction (higher RPE) and a higher N soil offer (higher delta MIT). These results highlight that eCO₂ has an effect at the short-term on plant growth and soil microbial activities.

After May, no difference in soil N offer was observed between the two treatments and the SOM destruction was reduced until the end of summer in eCO₂ compared to ambient, preventing access to N from SOM. We suggest that this absence of long-term effect could be explained by the sensitivity of the chosen species (*Lolium perenne*) to high temperature, leading to low photosynthetic activity from spring to end of summer preventing microbes fueling. More investigations must be carried out to understand better the effect of elevated CO₂ atmosphere on soil regulations.

Hypothesis 2: The presence of legume avoid SOM destruction:

In the presence of legumes, we observed higher GPP in eCO₂ compared to ambient, signifying that plant N demand increased. However, we observed no difference in both SOM destruction and soil offer between the two CO₂ treatments. We suggest that the surplus of N needed to answer to the increasing GPP is acquired from symbiotic N₂ fixation.

References

- Carney, K.M., Hungate, B.A., Drake, B.G., Megonigal, J.P., 2007. Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 4990–4995. doi:10.1073/pnas.0610045104
- Chabbi, A., Lehmann, J., Ciais, P., Loescher, H.W., Cotrufo, M.F., Don, A., SanClements, M., Schipper, L., Six, J., Smith, P., Rumpel, C., 2017. Aligning agriculture and climate policy. *Nature Climate Change* 7, 307–309. doi:10.1038/nclimate3286
- Cheng, W., 1999. Rhizosphere feedbacks in elevated CO₂. *Tree Physiology* 19, 313–320. doi:10.1093/treephys/19.4-5.313
- Cros, C., Alvarez, G., Keuper, F., Fontaine, S., 2019. A new experimental platform connecting the rhizosphere priming effect with CO₂ fluxes of plant-soil systems. *Soil Biology and Biochemistry* 130, 12–22. doi:10.1016/j.soilbio.2018.11.022
- Davidson, E.A., Hart, S.C., Shanks, C.A., Firestone, M.K., 1991. Measuring gross nitrogen mineralization, and nitrification by ¹⁵N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Journal of Soil Science* 42, 335–349. doi:10.1111/j.1365-2389.1991.tb00413.x
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A., 2004. Carbon input to soil may decrease soil carbon content: Carbon input in soil carbon sequestration. *Ecology Letters* 7, 314–320. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x
- Fontaine, S., Barot, S., 2005. Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation: Modelling long-term SOM dynamics. *Ecology Letters* 8, 1075–1087. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00813.x
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280. doi:10.1038/nature06275
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revallot, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017
- Heimann, M., Reichstein, M., 2008. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* 451, 289–292. doi:10.1038/nature06591

Hungate, B.A., Holland, E.A., Jackson, R.B., Iii, F.S.C., Mooney, H.A., Field, C.B., 1997. The fate of carbon in grasslands under carbon dioxide enrichment. *Nature* 388, 576–579. doi:10.1038/41550

Kuzyakov, Y., 2002. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382–396. doi:https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<382::AID-JPLN382>3.0.CO;2-#

Lal, R., 2016. Beyond COP 21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71, 20A-25A. doi:10.2489/jswc.71.1.20A

Liljeroth, E., Kuikman, P., Veen, J.A.V., 1994. Carbon translocation to the rhizosphere of maize and wheat and influence on the turnover of native soil organic matter at different soil nitrogen levels. *Plant and Soil* 161, 233–240. doi:10.1007/BF00046394

Mary, B., Recous, S., Robin, D., 1998. A model for calculating nitrogen fluxes in soil using ¹⁵N tracing. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1963–1979. doi:10.1016/S0038-0717(98)00068-6

Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23, 375–396. doi:10.1051/agro:2003011

Pausch, J., Kuzyakov, Y., 2018. Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24, 1–12. doi:10.1111/gcb.13850

Perveen, N., Barot, S., Alvarez, G., Klumpp, K., Martin, R., Rapaport, A., Herfurth, D., Louault, F., Fontaine, S., 2014. Priming effect and microbial diversity in ecosystem functioning and response to global change: a modeling approach using the SYMPHONY model. *Global Change Biology* 20, 1174–1190. doi:10.1111/gcb.12493

Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529–1538. doi:10.1016/0038-0717(95)00096-W

Shahzad, T., Chenu, C., Genet, P., Barot, S., Perveen, N., Mougin, C., Fontaine, S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 146–155. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.023

van Groenigen, K.J., Osenberg, C.W., Terrer, C., Carrillo, Y., Dijkstra, F.A., Heath, J., Nie, M., Pendall, E., Phillips, R.P., Hungate, B.A., 2017. Faster turnover of new soil carbon inputs under increased atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 23, 4420–4429. doi:10.1111/gcb.13752

Vestergård, M., Reinsch, S., Bengtson, P., Ambus, P., Christensen, S., 2016. Enhanced priming of old, not new soil carbon at elevated atmospheric CO₂. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 140–148. doi:10.1016/j.soilbio.2016.06.010

Résumé

La présence de plantes accélère la décomposition de la matière organique du sol (MOS) au travers de l'apport de composés riches en énergie (rhizodépôts et litières) stimulant les microorganismes ; un phénomène appelé « rhizosphere priming effect » (RPE). Une augmentation de la photosynthèse, activité pourvoyeuse d'énergie rhizodéposée, pourrait augmenter le RPE et l'offre du sol en nutriments. Récemment, le modèle SYMPHONY couplant activités photosynthétiques et microbiennes du sol suggère un ajustement de l'offre du sol en nutriments (delta minéralisation-immobilisation) à la demande des plantes. Cependant, le rôle clé de la photosynthèse sur cet ajustement offre-demande reste à étudier expérimentalement.

L'objectif général de la thèse est d'étudier le rôle des interactions des activités photosynthétiques et microbiennes du sol dans les régulations des flux de carbone (C) et d'azote (N) des écosystèmes. Trois écosystèmes types ont été étudiés : la prairie, la monoculture de blé et un nouveau système de culture (NSC) associant blé et plantes pérennes de la prairie. Nous émettons l'hypothèse que les plantes pérennes, via une activité photosynthétique pourvoyant les microorganismes en énergie tout au long de l'année, sont essentielles à l'ajustement offre-demande en N.

De nombreux défis techniques ont été relevés afin de construire une plateforme expérimentale de 40 mésocosmes sous éclairage et température naturels. Cette plateforme permet de coupler marquage ^{13}C des plantes, mesures continues des échanges de CO_2 , du RPE, de la production végétale, du stockage de C du sol, le taux de minéralisation-immobilisation d'N et du lessivage d'N.

Ce dispositif nous a permis de déterminer la contribution du RPE dans les flux de C des écosystèmes comprenant la production nette de l'écosystème (NEP), la production primaire brute (GPP) et la respiration de l'écosystème (RE) exprimées en $\text{g C m}^{-2} 24\text{h}^{-1}$. Nous avons montré une relation positive linéaire entre (1) RPE et GPP et (2) RPE et biomasse aérienne (AGB) (g C m^{-2}). A partir de ces relations, le RPE peut être prédit en utilisant les équations suivantes : $RPE = (2.03 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}) \cdot GPP - 1.57 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$ et $RPE = (8.03 \cdot 10^{-4} \pm 7.6 \cdot 10^{-5}) \cdot AGB + 9.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.05$.

Nous montrons un ajustement offre-demande de l'N au cours des saisons : une forte activité photosynthétique (printemps) est liée à un RPE et un delta minéralisation-immobilisation d'N élevés alors qu'une faible activité photosynthétique (automne) est liée à un RPE et un delta minéralisation-immobilisation d'N faibles. Cet ajustement était observé dans la prairie et dans le NSC mais pas en monoculture de blé. Logiquement, la lixiviation d'N était importante en monoculture de blé alors qu'elle était quasi nulle en prairie et dans le NSC. Après deux années de maintien des trois écosystèmes types, la production aérienne totale du NSC était équivalente à la prairie, tous deux étant supérieurs d'environ un facteur deux à la monoculture de blé. Ces résultats confirment l'importance des plantes pérennes dans la synchronisation offre-demande de l'N.

L'ensemble de ces investigations souligne l'importance des activités des plantes et des processus rhizosphériques dans la régulation des cycles CN des écosystèmes. Ces régulations pourront être étudiées *in situ* et à l'échelle globale grâce aux proxys de ces processus rhizosphériques (RPE, ajustement offre-demande) déterminés dans la thèse. Des activités photosynthétiques et rhizosphériques tout au long de l'année sont essentielles à l'ajustement offre-demande en nutriments conduisant à une forte production primaire, à la fermeture des cycles des nutriments et au stockage de MOS. Ces découvertes offrent l'opportunité de construire de nouveaux systèmes de culture, à l'image de l'association blé-plantes pérennes étudiée, à hautes performances agro-environnementales.

Mots clés : « rhizosphere priming effect » ; flux de CO_2 ; ^{13}C ; ^{15}N ; N minéralisation-immobilisation ; couplage carbone et azote ; synchronisation offre-demande ; plantes pérennes ; prairie ; monoculture blé ; services écosystémiques ; agroécologie.