



HAL
open science

Interactions sol-plante au sein d'une culture associée céréale-légumineuse et effets sur le fonctionnement du sol

Ana Beatriz de Oliveira

► **To cite this version:**

Ana Beatriz de Oliveira. Interactions sol-plante au sein d'une culture associée céréale-légumineuse et effets sur le fonctionnement du sol. Science des sols. Montpellier SupAgro, 2019. Français. NNT : 2019NSAM0036 . tel-04106664

HAL Id: tel-04106664

<https://theses.hal.science/tel-04106664>

Submitted on 25 May 2023

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Ecologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques

Ecole doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unités de recherche UMR Eco&Sols (Montpellier) et UMR SAS (Rennes)

Interactions sol-plante au sein d'une culture associée céréale-légumineuse et effets sur le fonctionnement du sol

Présentée par Ana Beatriz de Oliveira
Le 5 décembre 2019

Sous la direction de Edith LE CADRE et Philippe HINSINGER

Devant le jury composé de

Françoise BINET, Directrice de recherche, Université de Rennes 1, France

Iñigo VIRTO, *Assistant professor*, Université de Navarre, Espagne

Aurélie METAY, Maître de conférences, Montpellier SupAgro, France

Annette BERARD, Chargée de recherche, INRA, France

Edith LE CADRE, Professeur, AGROCAMPUS OUEST, France

Philippe HINSINGER, Directeur de recherche, INRA, France

Mustapha ARKOUN, Chef de projet, Agro Innovation International (Roullier), France

Rapporteur / Président du jury

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Membre invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Je dédie cette thèse à mes parents, **Vera & André**, les piliers de ma vie...

Remerciements

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler dans trois laboratoires de recherche avec des personnes exceptionnelles, en plus d'avoir été entourée par celles qui font partie de mon cercle privé/familial et qui m'ont énormément soutenue de près ou de loin tout au long de ces 3 ans. Par conséquent, ma liste de remerciements s'avère longue, et cela ne pourrait pas être différent.

Ceci dit, je voudrais adresser mes plus profonds remerciements :

A mes directeurs de thèse :

Je remercie ma directrice de thèse Edith Le Cadre, l'idéalisatrice du présent projet. Edith : merci pour ton support scientifique et pour tous les différents échanges qu'on a eus tout au long de ces 3 ans. Je te serai toujours reconnaissante d'avoir contribué à mon évolution personnelle et professionnelle.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Philippe Hinsinger, pour son support actif à l'installation de la première grande expérience de cette thèse, pour les échanges toujours très enrichissants et à son apport scientifique exceptionnel contribuant à la finalisation de mes travaux.

Aux membres de mon jury :

Je voudrais remercier mes deux rapporteurs, Françoise Binet et Iñigo Virto, pour leurs remarques et contributions si enrichissantes tant sur le manuscrit de thèse qu'au moment de la soutenance. J'adresse également mes profonds remerciements à mes examinatrices, Aurélie Metay et Annette Bérard, avec lesquelles les échanges ont été tout aussi constructifs. Merci à tous les quatre d'avoir accepté d'évaluer mon travail et merci surtout de l'avoir fait avec autant de professionnalisme et de bienveillance.

Aux membres de mon Comité de Suivi de Thèse :

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, Elena Kazakou, Annette Bérard, Christian Walter et Simon Boudsoq, qui m'ont très bien orienté et aidé à améliorer mes travaux, à travers leurs remarques et conseils très constructifs, ainsi qu'à travers leur notable soutien humain.

A l'équipe du laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon:

Tout particulièrement, je remercie Amélie Cantarel et Alessandro Florio pour l'importante collaboration que nous avons eue pendant ma thèse et qui a rendu de beaux fruits ! Cela a été un plaisir de travailler avec vous.

Au Groupe Roullier et à mes collègues du Centre Mondial de l'Innovation (CMI):

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Groupe Roullier, financeur de cette thèse. Je les remercie de m'avoir offert l'opportunité de travailler dans une structure exceptionnelle, avec une super équipe, ce qui a fortement contribué à la réussite de cette thèse.

Tout particulièrement, j'adresse un grand merci au directeur mondial de recherche du Groupe, Jean-Claude Yvin, avec qui j'ai eu les premiers contacts, encore au Brésil. Je le remercie pour sa

simplicité et son charisme, ce qui m'a toujours mis à l'aise au sein du Groupe. Enfin, je le remercie de m'avoir permis de réaliser ce beau projet et de l'avoir suivi avec intérêt.

Je remercie également mon responsable direct au CMI, Mustapha Arkoun, pour son professionnalisme et sa sérénité sans faille. J'avoue que cette dernière qualité m'a été d'une grande valeur dans les moments de petites paniques inhérentes à une thèse (surtout très expérimentale !). Merci également à Sylvain Pluchon pour les différents échanges et pour l'intérêt que tu as toujours porté pour cette thèse.

Je tiens aussi à remercier Amandine Nedellec et Bastien Billiot, qui m'ont énormément aidé avec mes expérimentations en serre et qui ont rendu le travail en équipe encore plus plaisant : votre appui professionnel et humain (avec nos conversations diverses, qui me manqueront immensément !) a été très important à la réussite de mes travaux expérimentaux et à mon épanouissement au sein du CMI. Merci pour votre soutien et amitié !

Je remercie également tous les autres collègues du CMI avec qui j'ai eu un immense plaisir à travailler ou tout simplement à côtoyer, notamment David, Matthieu, Marine, Sibylle (que je remercie tout particulièrement pour son précieux support au labo et pour tous les innombrables moments de causerie et rigolade ;-)), Justine, Sandrine, Allan, Adrian, Damien, Anne, Noémie, Charlotte, Morgane, Nusrat, Laura, Mariana, Larissa... en particulier, un petit mot à ces 6 dernières : quel bonheur d'avoir eu votre compagnie pendant les déjeuners/pauses à la cafétéria ! Avec vous, pas de place à la mauvaise humeur ou à la moindre déprime ! Laurita, guapa, merci pour tes petits soins (notamment les chocolats ☺), de m'avoir toujours gentiment prêté ton poste de travail quand j'en ai eu besoin et de me faire autant rigoler; Nusrat, merci pour ta gentillesse et ta précieuse aide pendant mes analyses qPCR ! Larissa, merci pour nos conversations toujours agréables et de m'avoir autant soutenue. J'ai été ravie d'avoir pu compter avec ta présence le jour de ma soutenance.

Je tiens également à remercier Rafaela Martin, mon amie Roullier/Agrocampus/Aqua-wellness, pour sa compagnie et amitié tout au cours de ces 3 ans. Toujours sereine et ayant les bons mots pour toutes les situations, la vie est plus légère avec toi ! Rafitcha, je t'admire énormément et je sais que tu iras très très loin !

Enfin, je remercie également les stagiaires Lucile et Marie, qui m'ont laissé un super souvenir en raison de leur amabilité et compétence ! J'espère que vous vous épanouissez là où vous êtes.

A mes collègues de l'UMR Eco&Sols :

Mes 4 premiers mois de thèse se sont passés à l'UMR Eco&Sols et j'ai eu la chance d'avoir été entourée, dès les premiers jours, de personnes en or comme Marie Sauvadet et Damien Dezette. Damien, merci d'avoir été si accueillant et chaleureux, tu m'as mise à l'aise dès le début et m'as fait m'intégrer rapidement à l'équipe (notamment en m'invitant à aller boire un verre de caipirinha dès ma première semaine de thèse ☺). Je te remercie aussi pour ton aide inestimable pendant mes manipulations Bio Mol et pour tous les moments agréables passés ensemble ! Marie, la post-doc pour qui j'ai tout de suite éprouvé une grande admiration en raison de son travail impeccable. Je te remercie de m'avoir autant aidé (avec tes précieux conseils et éclaircissements) et d'être devenue une grande amie. De retour à Montpellier pour quelques courts séjours pendant ma thèse, j'ai eu aussi l'immense plaisir de connaître Camille d'Hervilly, que je remercie pour les différents échanges, ainsi que pour sa sympathie et sa joie de vivre, et aussi ma petite Nancy, avec qui « ça a matché » tout de suite tant sur le plan professionnel (quelle efficacité de notre binôme pour les biomasses microbiennes !) que sur le plan personnel. Avec Marie, vous êtes devenues mes deux petits trésors Eco&Soliens ! Je remercie aussi

tous les autres « jeunes » de l'UMR, temporaires ou permanents, avec qui j'ai passé des moments très agréables pendant mes quelques passages à Eco&Sols : Maxime, Alexis, Juan, Victoria, Kenji, Elisa, Tanguy, Anne, et Esther, qui a toujours très gentilement répondu à mes questions.

J'adresse également mes plus profonds remerciements à Simon, dont le travail conduit auparavant a fortement inspiré ma première expérience de thèse. Simon, merci pour ton support et orientation pendant la planification de cette expérience (mais aussi pendant son suivi !), d'avoir accepté de composer mon comité de thèse (en contribuant activement à l'amélioration de mon travail), et merci surtout pour tes conseils toujours enrichissants, pour ton sourire contagieux et tout simplement pour ton amitié qui m'a fait énormément de bien pendant ce parcours si éprouvant.

Je tiens aussi à remercier Anne-Laure Pablo pour sa précieuse formation en Bio Mol et son humour à toute épreuve (cela a été un plaisir de travailler avec toi !); Laetitia Bernard et Eric Blanchart pour les différents échanges qu'on a eus et les collaborations si intéressantes qui en ont découlées; Tiphaine Chevalier et Claude Plassard pour les éclaircissements qu'elles m'ont apportés; et Jean-Marc Souquet pour son inestimable support au labo de physico-chimie. Un énorme merci également à Didier Blavet, pour avoir toujours été hyper réactif à mes mails et aux questions que j'avais concernant les données du Plateau OC. Je te serai toujours reconnaissante de m'avoir aidé avec autant de volonté et complaisance. Je remercie aussi Carlos Trives, pour sa gentillesse sans faille au labo de microbio, pour les conversations toujours agréables et pour son précieux coup de main pendant la collecte des échantillons de sol du Plateau OC en plein été héraultais ! Je remercie également Gérard Souche et Didier Arnal d'avoir toujours répondu à mes questions avec autant de gentillesse et attention; Philippe Benezech pour ses précieux coups de main en informatique et son humour qui m'a fait beaucoup rigoler; et Farid qui s'est toujours occupé de mes démarches administratives avec beaucoup de patience et d'amabilité. J'adresse également mes plus sincères remerciements à l'équipe de l'unité DIASCOPE et, tout particulièrement, à Pascal Sartre, pour sa disponibilité et réactivité pour toutes les questions que j'ai eu concernant les données du Plateau OC. Enfin, je remercie Jean-Luc Chotte, Isabelle Bertrand et l'ensemble du personnel Eco&Sols de m'avoir si bien accueillie pendant mon séjour chez vous.

A mes collègues de l'UMR SAS :

Quel plaisir d'être retournée à ce laboratoire où j'ai réalisé mon stage de Master 2 ! Et comme pour ma première expérience, le séjour à SAS pendant ma thèse n'a laissé que de très bons souvenirs.

Tout d'abord, je remercie Patrick Durand et l'ensemble de l'UMR d'avoir toujours été si chaleureux et accueillants ! Tout particulièrement, je remercie ceux qui m'ont aidé pendant les récoltes de mon expérimentation au CMI et qui ont rendu possible l'achèvement de cette première expérience avec grand succès : Marcel, Nicolas, Mikaël, Yannick Hamon, Yannick Fauvel, François, Bernard Bourel, Béa, Gaëlle, Laurence, Lucie, Marine, Lolo, Kevin, Thomas Soldano et Camille Launay.

Je tiens à remercier d'une manière toute spéciale Béatrice Trinkler (ma chère Béa) qui, après être entrée dans ma vie en tant que « binôme efficace de manips » est devenue une grande amie et, surtout, une deuxième maman. Je te remercie profondément pour ton aide inestimable pendant mes expérimentations, mais je te remercie encore plus d'être cette personne extraordinaire, toujours si positive et joyeuse, qui apporte le soleil même dans les jours les plus sombres ! Je suis ravie de t'avoir connue et de pouvoir te compter parmi ceux qui me sont les plus chers.

J'adresse aussi un énorme merci à Yannick Fauvel, avec qui les liens datent déjà de tellement longtemps... Yannick : je t'avais remercié lors de mon stage de M2 et je renouvelle mes remerciements

maintenant pour ma thèse. Quel bonheur d'avoir un collègue si gentil et chaleureux à mes côtés ! Je peux t'assurer que plusieurs fois, quand le moral n'était pas au top, le fait de te croiser dans les couloirs avec ton grand sourire et ton « bom dia ! » si joyeux et encourageant, m'apportait le réconfort dont j'avais besoin. Tout simplement, merci d'être la personne que tu es ! Comme Béa, tu es devenu plus qu'un collègue de travail et j'espère que nous aurons d'autres occasions de nous revoir ☺.

Je tiens à remercier ma stagiaire adorée, Marie Seiller, grâce à qui ma deuxième expérience a été possible, ainsi que la publi qui va avec ;-) Marie, merci pour ton précieux travail de M2 et pour les super moments passés ensemble. Tu es une personne en or et j'espère que tu trouveras ton bonheur avec n'importe quel travail que tu exerceras !

Je voudrais également remercier Rémy Dubois, de m'avoir rendu service avec les mesures pF et de m'avoir aidé avec de petites questions organisationnelles avec beaucoup de gentillesse et sympathie ! Je remercie aussi l'ensemble des gestionnaires : Maryvonne, Karine, Monique, Tiphaine... et ma chère Séverine, avec qui j'ai partagé des discussions très agréables ! Merci également à Sophie Le Perchec pour son sourire et sa joie de vivre ! Tout particulièrement, j'adresse mes remerciements les plus sincères à Michèle Beguinél qui, en plus d'être une personne extraordinaire de par sa gentillesse, a toujours été irréprochable dans son travail. Grâce à son professionnalisme et son amabilité, j'ai pu compter sur elle les yeux fermés pour toutes les questions administratives, mais aussi pour les moments de détente/bavardage à la cafétéria du bâtiment 8 ou alors dans son propre bureau ☺.

Je suis également très reconnaissante envers Guénola Pérès, Anne Jaffrézic, Matthieu Carof, Anne Laperche et Dominique Ombredane, pour leurs précieux conseils pendant mes répétitions orales. Je remercie aussi Safya et Anne, pour nos riches échanges au début de ma thèse.

Je voudrais également remercier toute la bande « jeunes » de l'UMR, pour l'incroyable ambiance que vous mettez (ou avez mis) au labo : Sébastien, Marine, Lucie, Laurène, Stella, Léa, Victor, Elisa, Pierre, Antonin, Mamad, PA, Laure, Antoine, Julien, Charlotte, Lola et Kevin (que je remercie aussi pour les différents échanges et coups de main, notamment en « design graphique », n'est-ce pas M. Hoeffner ?). Tout particulièrement, je remercie Claire Brami, pour son amitié et son écoute, mais aussi pour tous les cheesecakes partagés sur le Mail ;-) Un grand merci également à Sébastien Mira, avec qui j'ai eu un immense plaisir à travailler à la fin de ma thèse et pour qui j'éprouve une grande admiration. Bon courage pour ta thèse Séb, je suis sûre que ce sera un succès !

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à la bande du bureau 61 : Julien, Antoine et Yosra. Je vous remercie pour les innombrables discussions, y compris en portugais (cela sert aussi à Julien ☺), pour votre soutien et, en ce qui concerne particulièrement Yosra, pour tout l'encouragement et compagnie pendant les mois (si éprouvants) de notre rédaction ! Nous avons survécu !!!

Un merci plus que spécial à mes collègues de bureau, Céline et Lolo (de surnom « Laurent » héhé). Céline, je te suis très reconnaissante pour tous les petits soins envers moi, de m'avoir toujours écouté quand j'en ai eu besoin, et d'être cette personne qui éprouve une si grande sensibilité envers ceux qui te sont proches ! Merci aussi pour ton support en anglais et pour toutes les discussions toujours si agréables ; je t'envoie plein de courage et d'ondes positives pour la fin de ta thèse ! Lolo, je suis ravie d'avoir pu construire une si belle amitié avec toi. Merci de m'avoir tenu compagnie pendant plusieurs WE au labo (et de m'avoir approvisionnée en café lyophilisé), d'avoir été un si bon élève de portugais, de m'avoir autant écouté et conseillé, d'avoir toujours accepté de faire des pauses avec moi à n'importe quel moment de la journée, de m'avoir fait découvrir le chat Albert et de la musique de haute qualité (ahahah !), enfin, merci d'avoir partagé avec moi autant de moments de rigolades, stress, panique, fou rires, conversations, réflexions et tout ce qui va avec... Tu as été présent dans des

moments cruciaux de cette longue aventure et m'as énormément appris avec ta clairvoyance, sérénité et patience, et je ne t'en remercierai jamais assez !

Et pour finir, je ne pourrais pas oublier de remercier fortement Ovidiu, qui n'était plus à l'UMR à la fin de ma thèse, mais qui a eu un rôle crucial lors de mon apprentissage R ☺. Ovi, merci de m'avoir appris les commandes R de la façon la plus amusante possible. Je m'étais toujours dit qu'un jour j'aimerais être comme toi, pas seulement en ce qui concerne tes connaissances R, mais aussi (et surtout) pour ta manière coolissime de mener la vie !

A mes amis :

A ceux qui sont loin, au Brésil (Elo, Tati, Fran, Le, Carol, Rafa, Fefa, Edu, Turco, Carina, Tissi, Ju, Presunto), et à ceux qui sont plus proches, à Rennes (Mariana, Nico, Rozenn, Marco, Anne, Clém, Xav), à Pleugueneuc (Yo), à Montauban (Rom et Nath), à Couëron (Lili et Clément), à Poissy (Angie et Polo), à Paris (Clarisse), à Tours (Bru et Manu), à Lille (Coraline et Hadrien) ou alors à Copenhague (Adèle et Fede)... Merci pour votre amitié, sans laquelle ma thèse certainement n'aurait pas été accomplie avec succès et, surtout, ma vie n'aurait jamais été remplie d'autant de bonheur et de moments magiques. Une pensée spéciale à Clacla, qui a fait tout son possible pour être là le jour de ma soutenance, mais qui a été empêchée par force majeure. Ne t'inquiètes pas ma belle, je sais que mentalement tu as été là, comme cela a toujours été le cas au cours de ces 3 ans. Merci pour cette si belle amitié et pour tout le soutien que tu m'as toujours apporté !

A mes familles (brésilienne et française):

Merci à ceux dont la distance outre-Atlantique n'a pas empêché d'être toujours présents ! Mãe, pai, Ana, Fezin, Cla, Newton, Tio Nando, Tia Sônia, Nice, Vô João, Vô Eunice... Votre soutien et votre encouragement constants ont été mon combustible le plus précieux tout au cours de ces 3 dernières années. Merci de me faire goûter, jour après jour, à l'amour le plus inconditionnel qui puisse exister, qui est celui de la famille.

Merci également à ma famille française, celle dont je suis extrêmement heureuse d'en faire maintenant partie. Christine, Jean-Luc, Laure, Anthony, tonton Erick et tatie Catherine : merci de m'avoir accueillie parmi vous avec autant d'amour et de m'avoir apporté tout le réconfort dont j'avais besoin à travers vos mots, vos gestes et, bien sûr, les repas de famille ☺. Je tiens à remercier tout particulièrement mon beau-père aimé, de m'avoir énormément aidé, soutenu et encouragé tout au long de ces 3 ans, avec son optimisme et sa sérénité à toute épreuve. Je ne te remercierai jamais assez pour ta présence et pour tout ce que tu as fait pour moi.

Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin, je boucle ces longues pages de remerciements en adressant ma plus profonde gratitude à toi, François, la personne qui a suivi cette thèse de plus près. Ton soutien, ta patience, ta compréhension et ton amour quotidiens ont été fondamentaux à la réussite de ma thèse, et je ne te serai jamais assez reconnaissante pour tout ce que tu as été pour moi tout au long de ce parcours. Merci d'avoir autant cru en moi et de m'avoir épaulée et encouragée quand je croyais perdre mes forces... Tout simplement, merci d'être mon *lindo* et merci pour tout ce que tu m'as appris et m'apprends, jour après jour.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1. Synthèse Bibliographique, Objectifs de la thèse & Stratégie de recherche.....	7
1. Diversité végétale et services écosystémiques	9
1.1. Biodiversité et services écosystémiques : généralités	9
1.2. Diversité végétale et services écosystémiques des sols.....	10
2. La diversité végétale dans les agroécosystèmes	12
2.1. Comment introduire plus de diversité végétale dans les agroécosystèmes ?	12
2.2. Associations de cultures annuelles : application de concepts écologiques en agriculture	13
2.3. Associations de cultures annuelles et leurs avantages agronomiques et environnementaux..	16
3. Les associations de cultures annuelles et leurs effets sur le fonctionnement des sols	20
3.1. Processus rhizosphériques impliqués dans les cycles des nutriments N et P	21
3.2. La place des associations de cultures annuelles dans les rotations : prise en compte des concepts <i>Plant-Soil Feedback</i> ou <i>Plant Legacy</i>	27
4. Diversité végétale et impact sur la résistance et la résilience des sols	30
4.1. Les concepts de résistance et résilience : de l'écologie à la science du sol	30
4.2. Résistance et résilience des communautés microbiennes du sol	33
5. Objectifs, stratégie de recherche et structure du manuscrit	38
5.1. Problématique et objectifs de la thèse	38
5.2. Stratégie de recherche	40
5.3. Structure du manuscrit.....	43
CHAPITRE 2. Matériel et Méthodes.....	45
1. Origine et description du sol d'étude.....	47
2. Expérience 1 : conduite d'un cycle de culture associée en conditions contrôlées	50
2.1. Présentation générale du dispositif expérimental	50
2.2. Mise en place et suivi de l'expérience.....	51
2.3. Récolte 1 : Stade Floraison	53
2.4. Récolte 2 : Stade Maturation	60
2.5. Traitement des données / Analyses statistiques.....	61
3. Expérience 2 : résistance et résilience des communautés microbiennes du sol face à un stress thermique.....	62
3.1. Mise en place et suivi de l'expérience.....	62
3.2. Analyses réalisées.....	65

3.3. Mesures de résistance et de résilience	66
3.4. Traitement des données / Analyses statistiques.....	67
CHAPITRE 3. Soil rhizosphere functioning in a cereal-legume intercrop under a soil N mineral gradient.....	69
1. Introduction.....	74
2. Material and Methods.....	76
3. Results	81
4. Discussion	88
5. Conclusions.....	91
CHAPITRE 4. Improved acquisition of potassium, calcium, magnesium and sulfur in wheat intercropped with white lupin as affected by nitrogen availability.....	93
1. Introduction.....	98
2. Material and Methods.....	99
3. Results and Discussion.....	100
CHAPITRE 5. Short-term plant legacy alters the resistance and resilience of soil microbial communities exposed to heat disturbance in a Mediterranean calcareous soil.....	107
1. Introduction.....	112
2. Material and Methods.....	113
3. Results	117
4. Discussion	123
5. Conclusions.....	127
DISCUSSION GENERALE	133
1. Rappel du contexte, des objectifs de la thèse et de la stratégie de recherche	135
2. L'effet rhizosphère de l'association blé lupin au cours d'un cycle cultural.....	137
3. La persistance de l'effet de l'association sur le fonctionnement du sol une fois les plantes récoltées.....	141
4. Effet de l'association blé-lupin sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes du sol	143
5. Considérations finales et perspectives pour le partenaire privé	146
CONCLUSIONS	149
ANNEXES.....	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157

Table des Figures

Figure 1. Relations entre traits fonctionnels des plantes, processus et services écosystémiques dans les agroécosystèmes (Faucon et al., 2017).	11
Figure 2. Compétition (A), complémentarité (partage d'utilisation de la ressource ; B) et facilitation (C) entre deux espèces en association (Hinsinger et al. 2011).	15
Figure 3. Illustration de la complexité des mécanismes physiques, chimiques et microbiologiques dans la rhizosphère des plantes associées, comparativement à celle des plantes en conditions de culture mono-spécifique (Ehrmann & Ritz, 2014).	24
Figure 4. Représentation schématique du cycle terrestre de l'azote, avec l'indication de l'importante place du processus de nitrification dans ce cycle (Robertson & Groffman, 2015).	26
Figure 5. Exemples de définition quantitative de la résistance et de la résilience d'un paramètre microbien (y), ayant une valeur moyenne (y_0) et une variabilité temporelle, face à des stress de type pulse ou press (Shade et al., 2012).	32
Figure 6. Schéma représentant comment la résilience et la résistance du sol sont liées à la qualité du sol à travers ses fonctions (Seybold et al., 1999).	33
Figure 7. Schéma montrant que la réponse de l'écosystème sol à une perturbation est influencée par la résistance et la résilience de la communauté microbienne du sol (Griffiths & Philippot, 2013).	34
Figure 8. Représentation schématique des hypothèses de la thèse.	40
Figure 9. Schéma synthétisant la stratégie expérimentale de la thèse et les expériences ayant donné origine aux trois articles correspondant aux chapitres 3, 4 et 5 de la thèse.	43
Figure 10. Localisation de la parcelle d'étude et indication approximative des points de prélèvements du sol.	48
Figure 11. Moyennes de pluviométrie et de température de Mauguio entre 1988 et 2008 (avant l'échantillonnage du sol).	48
Figure 12. Schéma synthétique du dispositif expérimental de l'Expérience 1.	50
Figure 13. Disposition des pots dans la serre de phénotypage du CMI au début de l'Expérience 1. ...	51
Figure 14. Les différentes modalités de culture au moment de la récolte 1 (stade floraison) de l'Expérience 1.	54
Figure 15. Sol rhizosphérique autour du système racinaire du lupin blanc.....	54

Figure 16. Les étapes du protocole d'extraction de l'ADN du sol - UMR Eco&Sols (adapté de Tournier et al., 2015).....	59
Figure 17. Les différentes modalités de culture au moment de la récolte 2 (stade maturation) de l'Expérience 1.	61
Figure 18. Schéma synthétique de l'Expérience 2.	64
Figure 19. Microcosmes contenant les échantillons de sol lors de l'Expérience 2.	64
Figure 20. Résultats de la pré-expérience réalisée avant la mise en place de l'Expérience 2, pour la détermination de la modalité (température et durée) du stress thermique.....	156

INTRODUCTION GENERALE

Pour faire face à une demande alimentaire croissante et à la menace pressante du changement climatique, les pratiques agricoles doivent assurer la production alimentaire tout en minimisant les impacts négatifs sur l'environnement (Bommarco et al., 2013; Doré et al., 2011). L'agroécologie propose ainsi de concevoir des systèmes agricoles basés en partie sur la diversité végétale afin de promouvoir des régulations biologiques menant à des services écosystémiques de support et de régulation pour remplacer les intrants (Duru et al., 2015b). Il s'agit ainsi de s'inspirer des écosystèmes naturels pour tirer un maximum de profit des régulations biologiques qui y ont lieu (Doré et al., 2011; Malézieux, 2012). Un moyen d'introduire de la diversité végétale dans les agroécosystèmes est à travers les associations de cultures, *i.e.* la culture simultanée de deux espèces/variétés, ou plus, dans le même espace, pendant une partie significative de leur cycle de vie (Brooker et al., 2015; Willey, 1979).

Les avantages des cultures associées à court terme (pas de temps d'un cycle cultural) en terme de gains de production sont bien documentés dans la littérature. En effet, une meilleure productivité des associations comparées aux cultures mono-spécifiques est parfois observée et expliquée par des processus de complémentarité et de facilitation permettant i) la diminution de l'incidence de ravageurs, maladies et adventices (Ehrmann & Ritz, 2014; Lithourgidis et al., 2011; Zhu & Morel, 2018) et ii) une meilleure utilisation des ressources disponibles telles que la lumière, l'eau et les nutriments du sol (Brooker et al., 2015; Duchene et al., 2017; Ehrmann & Ritz, 2014). L'association céréale-légumineuse est particulièrement intéressante dans ce cas, puisque la légumineuse, au travers de la symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (N_2), est capable d'accéder à ce pool supplémentaire d'azote, en réduisant la compétition avec la céréale pour l'azote du sol (Bedoussac et al., 2015; Bedoussac & Justes, 2010b). En outre, les légumineuses sont aussi connues pour faciliter l'acquisition du phosphore par l'autre culture présente dans l'association (Betencourt et al., 2012; Hinsinger et al., 2011).

Cependant, les conséquences à court terme (au cours et consécutivement à un cycle de culture) des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement du sol sont encore peu étudiées, si ce n'est au niveau de la rhizosphère, même si les associations sont connues pour avoir une influence sur des paramètres physiques (Ehrmann & Ritz, 2014; Lithourgidis et al., 2011) mais également chimiques et microbiologiques des sols (Betencourt et al., 2012; Chen et al., 2018; Tang et al., 2016; Xu et al., 2018). En effet, les plantes peuvent influencer le fonctionnement des sols via l'entrée de litières (aériennes et racinaires) (de Vries et al., 2017; Orwin et al., 2010) ou via les divers processus dont la rhizosphère, *i.e.* la zone du sol bio-influencée par les racines, est le siège : production par les racines de différents composés organiques et inorganiques dénommés rhizodépôts (Dennis et al., 2010; Philippot et al., 2013) et modification des équilibres chimiques en conséquence des prélèvements et modifications de pH induits par les racines (Hinsinger et al., 2009; Hinsinger et al.,

2011). Ainsi, l'association de cultures est supposée affecter différemment les sols comparativement à chaque culture cultivée seule, puisque la quantité et la qualité des litières, mais également la composition des rhizodépôts et les propriétés de la rhizosphère, varient en fonction de la variété et/ou de l'espèce végétale (Hinsinger et al., 2011; Philippot et al., 2013).

Or, les effets à court et moyen terme des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement des sols sont cruciaux à considérer dans les agroécosystèmes. En effet, l'effet des plantes sur le fonctionnement du sol persistant après leur disparition (*i.e.* à leur récolte pour des agroécosystèmes) peut affecter la croissance des plantes suivantes au cours de la succession végétale (culturelle dans le cas des agroécosystèmes). Cet effet, défini comme *plant legacy effect* (ou effet d'héritage), parfois appelé aussi *plant-soil feedback* (boucles de rétro action sol-plante), est très étudié par les écologues pour comprendre la coexistence d'espèces végétales, les successions végétales ou les invasions (van der Putten et al., 2013). Ces effets d'héritage peuvent affecter les performances de la culture suivante, et donc affecter le succès d'une culture suivant l'association dans un agroécosystème. Cependant, dans le contexte actuel de changement climatique et d'augmentation de la fréquence d'événements extrêmes (IPCC, 2019), pour lesquels les systèmes agricoles méditerranéens sont particulièrement vulnérables (Cramer et al., 2018), la connaissance des effets d'héritage d'une diversité végétale accrue sur la composante microbiologique des sols et, par extension, sur sa stabilité face à ces perturbations environnementales est tout aussi essentiel pour la durabilité des agroécosystèmes. En effet, selon Strecker et al. (2016), la diversité végétale et les microorganismes du sol sont les deux composantes écologiques essentielles à la base des fonctions vitales des écosystèmes terrestres. Par conséquent, il est nécessaire d'évaluer l'effet d'une diversité végétale plus importante en milieu agricole (association de cultures en l'occurrence) sur les activités microbiennes en réponse à des stress environnementaux, en termes à la fois de résistance (capacité à résister à un stress) et de résilience (capacité à récupérer après un stress), les deux composantes de la stabilité (Griffiths & Philippot, 2013; Pimm, 1984). Ainsi, l'étude des effets à court/moyen terme des associations de cultures sur le fonctionnement des sols est primordiale afin de privilégier les combinaisons de cultures permettant la génération d'effets d'héritage positifs pouvant assurer à la fois i) une production satisfaisante de denrées alimentaires, ii) la fourniture de services écosystémiques de support et de régulation et iii) une meilleure résilience des agroécosystèmes face aux perturbations climatiques.

Ces systèmes de cultures innovants questionnent également l'agro-industrie qui doit prévoir une adaptation de ses schémas stratégiques vis-à-vis de la formulation d'engrais et d'intrants innovants pour les systèmes agro-écologiques, reposant sur les interactions biologiques en substitution aux intrants chimiques conventionnels. Ainsi, la production de biostimulants, *i.e.* molécules et/ou organismes qui appliqués à la plante ou à sa rhizosphère sont capables de stimuler

l'absorption, l'efficacité d'absorption des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques, et la qualité des cultures (EBIC, 2019), est actuellement en plein développement (+12% parts de marché par an). Ces intrants se distinguent des intrants conventionnels car un effet biostimulant ne peut être assimilé à un seul effet fertilisant (Calvo et al., 2014), et questionnent l'industrie des engrais. La proposition de nouvelles formulations d'engrais (Ghormade et al., 2011; Trouillefou et al., 2015; Withers et al., 2015) est également étudiée. Une autre possibilité réside dans l'adaptation des doses de nutriments, notamment l'azote, pouvant modifier les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol (in 't Zandt et al., 2019) dans la rhizosphère (Moreau et al., 2019). Par conséquent, la formation de cadres en recherche et développement dans les agro-industries est nécessaire pour accompagner la nécessaire mutation de ce secteur industriel dans le contexte de la transition agro-écologique de l'agriculture. Dans ce contexte, le groupe Roullier, fondé en 1959, dont un des piliers est l'agrofourniture, qui s'est investi dans cette thématique au travers de sa filiale Agro Innovation International, s'est associé avec deux laboratoires, l'UMR Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols et des Agroécosystèmes à Montpellier et l'UMR Sol Agro hydrosystèmes et Spatialisation à Rennes, pour étudier les effets d'une association céréale-légumineuse sur le fonctionnement du sol, modulés par un gradient d'azote.

Cette thèse a pour objectif d'apporter de nouveaux éléments de compréhension du fonctionnement des cultures associées, en situation de fertilisation azotée dans un contexte de sol calcaire méditerranéen. Plus précisément, il s'agit de comprendre si un gradient d'apport d'azote peut affecter le fonctionnement du sol au sein de la rhizosphère et la nutrition des plantes pour différents éléments majeurs, et d'étudier si un effet différentiel d'héritage des associations sur le fonctionnement microbien des sols est perceptible à court terme, en considérant la réponse des microorganismes du sol à un stress thermique.

CHAPITRE 1

Synthèse Bibliographique,
Objectifs de la thèse & Stratégie de
recherche

1. Diversité végétale et services écosystémiques

1.1. Biodiversité et services écosystémiques : généralités

D'après le *Millennium Ecosystem Assessment* (2005), les services écosystémiques sont définis comme les bénéfices que les humains tirent des écosystèmes, pouvant être classifiés en quatre catégories : i) *services de support*, tels que le cycle des nutriments et la formation des sols ; ii) *services de régulation*, comme le contrôle des ravageurs, la pollinisation des cultures, la régulation du climat et la purification de l'eau ; iii) *services d'approvisionnement*, comme la fourniture d'eau, aliments, fibres et carburants ; et iv) *services culturels*, tels que la valeur esthétique, l'éducation et les loisirs.

Cardinale et al. (2012) ont mis en évidence l'importance de la biodiversité (*i.e.* l'ensemble d'espèces végétales, animales et microbiennes existant et interagissant au sein d'un écosystème (Altieri, 1999)) pour assurer des services écosystémiques essentiels de régulation et d'approvisionnement. En effet, pour les services d'approvisionnement, ces auteurs ont pu mettre en exergue que : i) la diversité génétique intra-spécifique est responsable de l'augmentation de la productivité des cultures ; ii) la diversité des arbres dans les peuplements forestiers augmente la production de bois et que iii) la diversité dans les prairies accroît la production de fourrage. Selon ces auteurs, la diversité végétale est également responsable de la fourniture des services de régulation et l'augmentation de cette diversité engendre : i) l'accroissement de la résistance aux invasions des plantes exotiques ; ii) la réduction de la pression de pathogènes tels que les infections fongiques et virales ; iii) l'accroissement de la séquestration du carbone en raison de l'augmentation de la production de biomasse ; et, finalement, iv) l'augmentation de la matière organique et de la minéralisation des nutriments.

Ainsi, la perte de biodiversité a des impacts négatifs sur le fonctionnement des écosystèmes (Hooper et al., 2012) et notamment la perte de diversité végétale (Eisenhauer et al., 2018). Par conséquent, l'augmentation de la diversité végétale devient un levier pour accroître les services écosystémiques que ce soit dans les milieux naturels ou dans les agroécosystèmes (Bommarco et al., 2013; Duru et al., 2015b; Quijas et al., 2010). Tout particulièrement, depuis que le sol a été reconnu par sa multifonctionnalité (Walter et al., 2015), cette ressource a été mise au cœur de cette problématique et les sols ont été reconnus comme un capital naturel (Dominati et al., 2010) pouvant contribuer eux-mêmes à la fourniture de nombreux services écosystémiques. En étant le support pour toutes les plantes, les sols et les services écosystémiques qu'ils rendent sont, par conséquent, en intime relation avec la diversité végétale. En effet, plusieurs travaux montrent que les plantes et leur diversité ont un rôle important sur plusieurs fonctions des sols et, par conséquent, sur les services écosystémiques qui y sont associés (Eisenhauer et al., 2018; Faucon et al., 2017; Zak et al., 2003). De

ce fait, il est essentiel que la diversité végétale soit prise en compte dans un contexte de préservation ou d'accroissement des services écosystémiques délivrés par les sols, comme développé ci-après.

1.2. Diversité végétale et services écosystémiques des sols

Chaque espèce végétale possède des caractéristiques morphologiques, physiologiques et phénologiques mesurables, *i.e. traits fonctionnels*, permettant de renseigner sur son fonctionnement (Garnier & Navas, 2012; Violle et al., 2007). Ces caractéristiques sont susceptibles d'affecter les sols, comme par exemple la surface spécifique et les ratios C : N des feuilles, ou alors la longueur des racines et leur profil d'exsudation (Faucon et al., 2015; Roumet et al., 2016) (Figure 1). Les plantes peuvent donc influencer les sols via des traits liés à la quantité et la qualité des litières (aérienne et racinaire), puisque cela joue sur la facilité de leur décomposition et sur la dynamique de minéralisation/libération de nutriments dans les sols (de Vries et al., 2017; Orwin et al., 2010; Schweitzer et al., 2008). Ces traits liés aux litières ont déjà été évoqués comme étant à l'origine des variations des concentrations de C et N dans les sols de prairies observées à l'échelle de l'écosystème (Garnier et al., 2004; Lavorel et al., 2011). D'un autre côté, les plantes peuvent aussi influencer le cycle des nutriments et du carbone dans les sols via leurs exsudats racinaires (Orwin et al., 2010). Ces effets touchent l'ensemble des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols et, par conséquent, agissent comme régulateur de plusieurs processus et/ou services écosystémiques-clés (Figure 1) comme par exemple i) la dynamique et la séquestration du C dans les sols, ii) l'augmentation de leur stabilité structurelle et diminution de l'érosion, iii) la dynamique et la disponibilité des nutriments et iv) l'abondance et diversité des microorganismes pathogènes (Faucon et al., 2017).

Ainsi, la combinaison de plusieurs caractéristiques ou traits fonctionnels dans une communauté végétale diversifiée affectera également le fonctionnement des sols, mais ces effets ne sont pas encore pleinement compris (Faucon et al., 2017). A titre d'exemple, Zak et al. (2003), après 7 ans d'une expérience de terrain comprenant plusieurs combinaisons d'espèces pérennes (1 à 16 espèces) typiques des prairies et des savanes du nord des Etats-Unis, ont observé que la biomasse microbienne, la respiration du sol, l'abondance fongique et le taux de minéralisation de N ont augmenté avec l'augmentation de la diversité végétale. La plupart de ces résultats ont cependant été associés à la plus grande production de biomasse par les plantes (*i.e.* détrit) due à l'augmentation de la diversité (en conséquence des interactions positives entre les différentes espèces), plutôt qu'à la diversité de composés organiques contenus dans les détrit des communautés plus diversifiées.

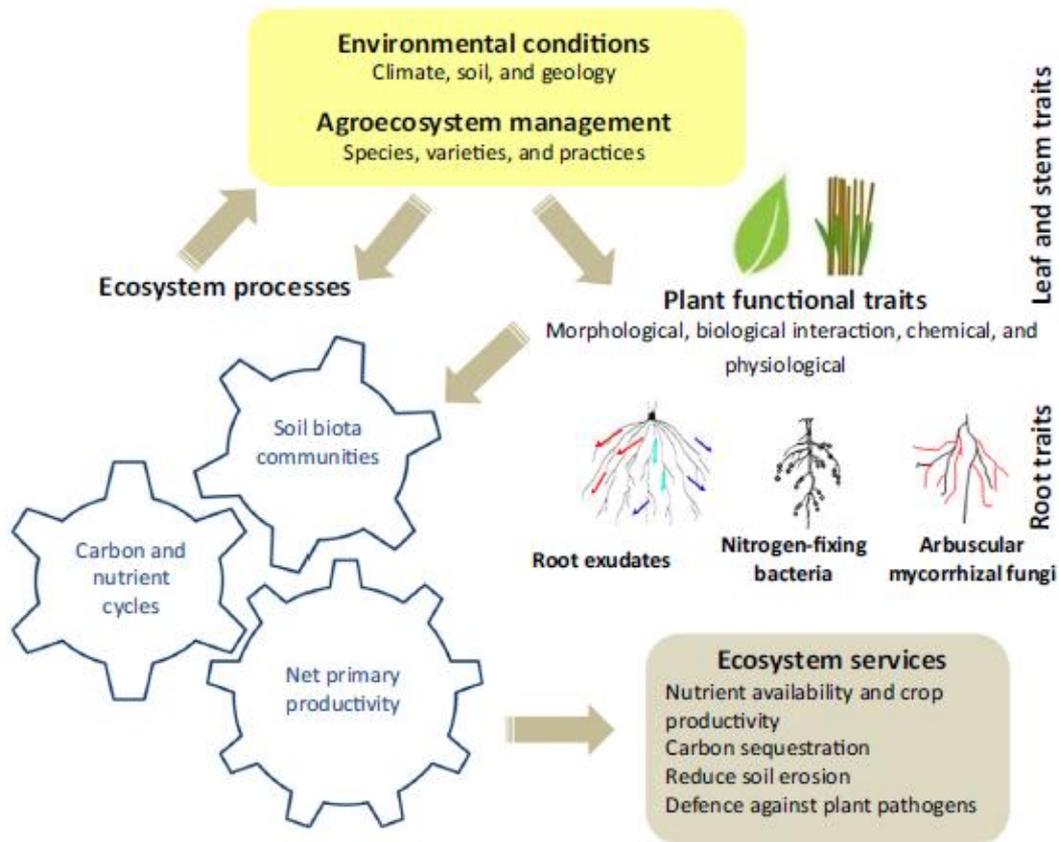


Figure 1. Relations entre traits fonctionnels des plantes, processus et services écosystémiques dans les agroécosystèmes (Faucon et al., 2017).

D'autres études ont mis en évidence l'effet d'une plus grande diversité d'espèces prairiales sur i) l'augmentation de l'activité des microorganismes du sol et du stockage de carbone, en raison d'un apport accru de composés carbonés dans la rhizosphère (Lange et al., 2015), ou sur ii) l'augmentation de la biomasse microbienne et l'activité de quelques enzymes en lien avec le cycle du carbone et de l'azote (Steinauer et al., 2015). Cette dernière étude a conclu que les effets de la diversité végétale ont été plus forts que ceux provoqués par la chaleur (dans un contexte de changement climatique) sur les propriétés du sol mentionnées ci-avant. Un travail récent a aussi montré l'effet positif d'une plus grande diversité végétale sur des fonctions essentielles assurées par les sols (Eisenhauer et al., 2018). Enfin, la richesse des systèmes racinaires existant dans une communauté végétale diversifiée, aura aussi des effets positifs sur les propriétés physiques des sols, via une meilleur porosité, agrégation et stabilité structurale, en réduisant les risques d'érosion et en améliorant la qualité de l'eau (Faucon et al., 2017).

Les travaux exposés jusqu'ici ont surtout considéré la diversité végétale en milieu naturel, comme les systèmes prairiaux. Cependant, dans les agroécosystèmes, il est aussi possible d'introduire de la diversité végétale, même si moins importante par rapport aux systèmes naturels, et cette

diversité est également reconnue comme un moyen d'accroître les services écosystémiques rendus par les sols (Bommarco et al., 2013). Ce sujet sera donc abordé plus en profondeur dans les sections suivantes.

2. La diversité végétale dans les agroécosystèmes

Pour faire face aux nombreux défis actuels de l'agriculture, *i.e.* assurer la sécurité alimentaire tout en diminuant les impacts négatifs sur l'environnement, l'agroécologie (Duchene et al., 2017; Wezel et al., 2014) et l'intensification écologique (Bommarco et al., 2013; Doré et al., 2011) proposent de concevoir des systèmes agricoles reposant sur des principes écologiques et sur des services écosystémiques pour maintenir ou augmenter la production, tout en améliorant la durabilité des agroécosystèmes. Conformément à ces principes, un large éventail de pratiques a été mis au point, dont l'utilisation de la diversité végétale, comme exposé ci-après.

2.1. Comment introduire plus de diversité végétale dans les agroécosystèmes ?

La diversification végétale dans un agroécosystème peut être considérée d'un point de vue temporel ou spatial (Duru et al., 2015a; Duru et al., 2015b). A l'échelle temporelle, cette diversification peut être accrue via l'augmentation du nombre d'espèces dans les rotations de cultures (McDaniel et al., 2014). En effet, depuis plusieurs siècles, les agriculteurs ont adopté la rotation culturale comme un moyen d'atténuer la pression exercée par les adventices, les insectes et les pathogènes, ainsi que pour augmenter les rendements des cultures comme dans le cas particulier de la rotation entre les céréales et les légumineuses (Gurr et al., 2003; Smith et al., 2008). Plus récemment, cependant, les agriculteurs y ont eu recours également en raison des impacts positifs que cette pratique peut avoir sur les sols, notamment en termes d'augmentation de la matière organique ou de l'activité microbienne (McDaniel et al., 2014). Les inter-cultures sont aussi un moyen d'accroître la diversité à l'échelle temporelle, en cultivant des espèces avec un intérêt particulier (fourrage, méthanisation, etc.) (Ehrmann & Ritz, 2014), ou tout simplement comme couverture verte servant de piège à nitrate, pendant l'intervalle entre deux cultures principales (Duru et al., 2015b).

A l'échelle spatiale, l'augmentation de la diversité végétale peut se faire via les cultures de couverture (*i.e.* cultures coexistant avec une culture principale mais qui ne sont pas récoltées, ayant un objectif particulier comme par exemple le piégeage de nitrate dans les sols), ou les dénommés « systèmes multicultures ou multi-espèces », dans lesquels plusieurs variétés ou espèces sont cultivées simultanément dans le même champ pendant une partie importante de leur cycle de vie (Ehrmann &

Ritz, 2014). Cette dernière définition inclut, ainsi, toutes les possibilités de cultures mixtes (annuelles ou pérennes), allant du seul mélange de cultures annuelles jusqu'à l'association avec des espèces d'arbres, caractéristique des systèmes agroforestiers (Li et al., 2013; Malézieux et al., 2009).

Dans le cas particulier des associations de cultures annuelles, la définition proposée par Vandermeer (1992) et Willey (1979), *i.e. la culture simultanée de deux espèces ou plus sur une même surface pendant une période significative de leur cycle de vie, mais sans nécessairement être semées et récoltées en même temps*, peut être complétée en remplaçant le terme « deux espèces ou plus » par « deux cultures ou plus », voire « deux variétés ou plus ». En effet, non seulement des espèces différentes mais également des variétés (ou génotypes) correspondant à une même espèce peuvent être combinées pour constituer des associations de cultures en contexte agricole (Malézieux et al., 2009). Enfin, il est aussi possible de distinguer plusieurs types d'associations de cultures annuelles (*i.e. « intercropping »*) en conditions de terrain, parmi lesquelles: i) les associations mixtes ou en mélange (*i.e. deux ou plusieurs cultures cultivées simultanément sans un arrangement spatial prédéterminé*), ii) les cultures associées intercalaires ou en « relay » (*i.e. une deuxième culture semée après l'implantation d'une première, mais avant la maturation de celle-ci*) et iii) les cultures associées en bandes (*i.e. deux ou plusieurs cultures cultivées simultanément, en rangs séparés*) (Brooker et al., 2015; Li et al., 2013).

2.2. Associations de cultures annuelles : application de concepts écologiques en agriculture

Les associations de cultures annuelles telles que les céréales et les légumineuses se sont développées sur la base de l'observation des écosystèmes naturels (Duchene et al., 2017). En effet, dans la nature, les légumineuses sont communément observées parmi les graminées, et l'importance de ce groupe fonctionnel pour la maintenance et l'efficacité du fonctionnement des écosystèmes est bien documenté (Duchene et al., 2017).

Dans les systèmes mono-spécifiques ou monovariétaux, toutes les plantes du peuplement possèdent les mêmes traits fonctionnels, entrant donc en compétition pour l'ensemble des ressources abiotiques puisqu'elles exploitent les mêmes niches écologiques (*i.e. ensemble des ressources et conditions environnementales nécessaires au développement d'un individu* (Hutchinson, 1957)). Dès lors que la diversité est accrue, une augmentation de la productivité végétale est souvent observée. Cet avantage est ainsi communément relié à une meilleure utilisation des ressources existantes, celle-ci pouvant être expliquée essentiellement par deux mécanismes écologiques : la complémentarité de niche et la facilitation (Brooker et al., 2015; Fridley, 2001; Hinsinger et al., 2011).

2.2.1. Complémentarité et facilitation

La complémentarité de niches peut intervenir lorsque deux ou plusieurs espèces/variétés utilisent le même pool d'une ressource donnée de manière différente dans le temps ou dans l'espace, ou lorsqu'elles exploitent deux pools différents d'une même ressource (Duchene et al., 2017; Fridley, 2001). La complémentarité peut être donc observée, par exemple, i) quand deux plantes ayant des architectures racinaires différentes exploitent l'eau du sol d'une manière contrastée (en profondeur et en surface par exemple, il s'agit alors de complémentarité dans l'espace) ou ii) quand une espèce non-fixatrice d'azote profite plus du N du sol puisque l'espèce associée, fixatrice d'azote, peut accéder au pool supplémentaire de N atmosphérique (complémentarité en termes de forme - ou pool - de la ressource) (Justes et al., 2014) (Figure 2B).

La facilitation s'oppose au concept de compétition (*i.e.* réduction des performances d'un individu par un autre, via la diminution de l'accès à une ressource donnée ; Figure 2A) et correspond à l'augmentation de la croissance ou de la survie d'une espèce par une autre à travers l'amélioration des conditions environnementales (*i.e.* température, lumière, humidité, disponibilité de nutriments, oxygénation, introduction d'organismes bénéfiques...) induite par au moins l'une des espèces pour son propre bénéfice et pour le bénéfice de l'espèce associée (Brooker et al., 2008; Callaway, 1995). La facilitation pour la ressource en phosphore au sein d'une association céréale-légumineuse en constitue un exemple (Hinsinger et al., 2011) (Figure 2C). En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence la capacité de la légumineuse à augmenter la biodisponibilité du phosphore du sol via l'exsudation des composés pouvant mobiliser des pools de P normalement non-accessibles aux céréales seules (Cu et al., 2005; Dissanayaka et al., 2015; Li et al., 2007; Li et al., 2003a). Dans les systèmes de prairies datant d'au moins 2 ou 3 ans, des mécanismes de facilitation pour l'azote du sol ont pu aussi être mis en exergue, avec l'observation de transferts de N des légumineuses vers les graminées via la rhizodéposition (Oberson et al., 2013; Pirhofer-Walzl et al., 2012). Cependant, l'extension de ces mécanismes aux associations de cultures annuelles semble plus délicate, probablement du fait de la moindre durée de leur cycle de vie, ce qui ne semble pas suffisant pour assurer une biotransformation microbienne (quand il s'agit de rhizodépôts sous formes organiques) rapide et importante des rhizodépôts issus des légumineuses (Justes et al., 2014). Ce dernier mécanisme de facilitation (transfert d'azote d'une plante à l'autre via la rhizosphère) a récemment été classifié comme un mécanisme *direct* de facilitation par Duchene et al. (2017). Ainsi, selon ces mêmes auteurs, la plupart des autres mécanismes de facilitation vérifiés dans la littérature pourraient être catégorisés comme des mécanismes *indirects*, car nécessitant une modification de l'environnement pour se produire. Par conséquent, la facilitation pour le P mentionnée précédemment serait placée dans cette catégorie. En outre, Duchene et al. (2017) mentionnent également la régulation des adventices, des maladies et des

ravageurs comme un mécanisme indirect de facilitation, du fait de la réduction de la compétition pour les ressources avec les adventices et de l'atténuation de la pression des autres bio-agresseurs.

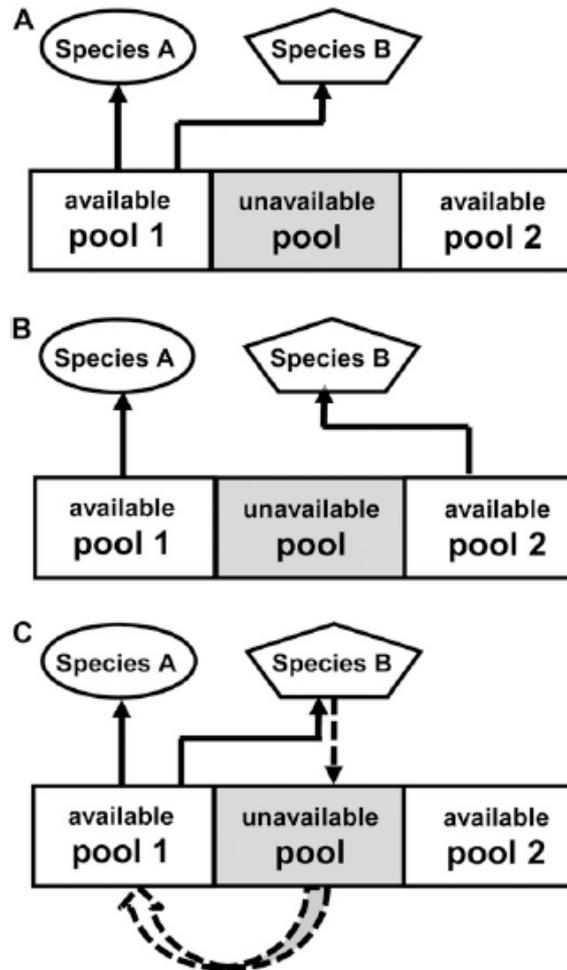


Figure 2. Compétition (A), complémentarité (partage d'utilisation de la ressource ; B) et facilitation (C) entre deux espèces en association. Les pools représentent les différentes formes d'une même ressource (i.e. nutriment). Les flèches pleines indiquent l'absorption de la ressource par les espèces associées, tandis que les flèches pointillées indiquent les mécanismes par lesquels l'espèce B peut modifier la disponibilité de la ressource, augmentant ainsi la taille du pool disponible au détriment du pool indisponible (indiqué par la flèche incurvée), améliorant ainsi l'absorption de la ressource par l'espèce A (facilitation) (Hinsinger et al. 2011).

2.2.2. L'Hypothèse du Gradient de Stress

Il est cependant important de noter que ces interactions positives (i.e. complémentarité de niche et facilitation) ayant lieu dans les systèmes plurispécifiques (notamment pérennes), sont généralement observées dans des contextes où la disponibilité des ressources est faible. En effet, les bénéfices des associations annuelles céréales-légumineuses concernant le partage de la ressource azotée (Bedoussac et al., 2015; Bedoussac & Justes, 2010b; Corre-Hellou et al., 2006), ou la facilitation pour le phosphore (Betencourt et al., 2012; Dissanayaka et al., 2015; Latati et al., 2014), ont été surtout

vérifiés dans des conditions de faible disponibilité de ces ressources. Ces observations sont ainsi en accord avec une théorie élaborée en écologie des communautés, la « *Stress Gradient Hypothesis* ». Celle-ci dit que les interactions positives (complémentarité ou facilitation) se produisent plus fréquemment lorsque les conditions environnementales sont défavorables, tandis que les interactions négatives (compétition) prédominent en conditions environnementales non-limitantes (Bertness & Callaway, 1994; Brooker et al., 2005). Toutefois, cette hypothèse fait encore débat. En effet, des travaux menés au champ ont démontré qu'une trop forte carence en phosphore a fortement impacté la fixation du N atmosphérique chez la légumineuse, en empêchant la mise en place des mécanismes de facilitation pour l'acquisition du P de la féverole vers le blé dur (Justes et al., 2014). Afin d'explorer cette hypothèse en conditions agricoles, il est nécessaire d'identifier les conditions où les avantages des associations d'espèces sont maximisés.

2.3. Associations de cultures annuelles et leurs avantages agronomiques et environnementaux

2.3.1. Indices de performances/interactions entres plantes

Plusieurs indices sont proposés dans la littérature pour évaluer les interactions intra- et interspécifiques dans les systèmes associant des espèces ou variétés, ainsi que l'avantage potentiel de l'association par rapport aux cultures mono-spécifiques ou mono-variétales (Armas et al., 2004; Weigelt & Jolliffe, 2003). Parmi ces indices, le RYM (*Relative Yield of Mixtures*) et le RII (*Relative Interaction Intensity*) revêtent un intérêt particulier. En prenant en compte, par exemple, la biomasse comme variable de production, l'indice RII ($RII = [B_w - B_o] / [B_w + B_o]$) permet d'analyser l'effet d'une plante en association (B_w – biomasse de la plante associée) par rapport à cette même plante cultivée seule (B_o – biomasse de la plante seule). Seule la biomasse moyenne d'une plante (céréale ou légumineuse) est considérée, quelle que soit la densité des plantes dans chaque condition (association ou non) (Armas et al., 2004). Cet indice est ainsi calculé pour chaque espèce et permet de caractériser un effet neutre, positif ou négatif de l'association sur l'espèce/plante cible. D'autre part, le RYM ($RYM = \sum_{i=1}^n B_{ICi} / \sum_{i=1}^n B_{SCi}$) permet d'appréhender l'interaction à l'échelle du système global, où les biomasses (B) de toutes les espèces (i) (allant de 1 à n espèces) associées (IC) et en culture pure (SC) sont prises en compte sur une base de densité identique (*i.e.* la même surface et le même nombre d'individus de chaque espèce est considérée à la fois pour le mélange et pour les cultures pures) (Wilson, 1988). Cet indice permet ainsi de voir si les cultures associées sont plus productives que les cultures pures, pour une surface et un nombre d'individus identiques en systèmes pur et associé. Si tel est le cas, cela

signifie alors qu'au moins l'une des espèces est supérieure en association qu'en culture seule, dans une base par plante.

Dans les essais agronomiques, le LER (*Land Equivalent Ratio*) est un indicateur communément utilisé pour évaluer la performance relative des associations par rapport aux cultures pures (Bedoussac & Justes, 2011). Le LER correspond à la surface de cultures pures nécessaire pour obtenir la même production qu'un hectare d'association : $LER = [X_{\text{cér.associée}}/X_{\text{cér.seule}}] + [X_{\text{lég.associée}}/X_{\text{lég.seule}}]$; où X peut correspondre à la biomasse, rendement en grains ou toute autre variable quantitative de production d'après Bedoussac et al. (2015). Ces derniers auteurs ont conduit une importante synthèse de la littérature sur les bénéfices des associations céréales-légumineuses, basée sur 58 expériences de terrain menées en agriculture biologique et dans plusieurs conditions pédoclimatiques européennes. Parmi d'autres résultats importants issus de cette synthèse, Bedoussac et al. (2015) ont montré, à travers des indices LER, que i) les associations céréales-légumineuses ont produit de rendements en grains plus importants et plus stables que la moyenne des cultures pures et que ii) les céréales associées ont présenté une plus grande concentration en protéines comparativement aux céréales cultivées seules. Ces résultats ont cependant été obtenus en conditions de bas intrants (faible disponibilité en azote), ce qui pose donc la question de l'influence des niveaux de la ressource azotée sur les performances des associations.

2.3.2. Influence de la fertilisation azotée sur les performances des associations

Dans plusieurs études portant sur les associations céréales-légumineuses, la fertilisation azotée a eu un effet positif sur la céréale et négatif sur la légumineuse associée (Andersen et al., 2005; Ghaley et al., 2005; Naudin et al., 2010), tandis que dans d'autres travaux l'application de N a eu soit un effet neutre (Cardoso et al., 2007; Li et al., 2005), soit un effet positif (Ofori et al., 1987; Siame et al., 1998) sur le rendement en grains de la légumineuse. Pelzer et al. (2014b) ont réalisé une méta-analyse sur les effets de la fertilisation azotée sur les rendements en grains dans les systèmes associant céréales et légumineuses annuelles. Les auteurs se sont basés sur des études couvrant 15 pays dans 5 continents, avec 6 espèces de céréales et 10 espèces de légumineuses. Les résultats ont révélé que la fertilisation azotée n'avait pas d'effet significatif sur les rendements en grains exprimés en terme de LER et *Yield Ratio* moyens (*Yield Ratio* = ratio de rendement en grains par unité de surface de la culture associée avec le rendement en grains par unité de surface des deux cultures pures, chacune étant cultivée dans une partie de la superficie proportionnelle à sa densité de semis relatif dans la culture associée). Cette méta-analyse a également montré que le LER total et les ratios de rendements des grains ont été globalement positifs, et cela même dans les conditions où un niveau important de fertilisation à l'azote a été apporté. Enfin, les auteurs ont souligné que la variabilité inter-études a été

toutefois importante, puisque dans certaines situations la fertilisation azotée a augmenté la performance des associations, tandis que dans d'autres cas ce bénéfice n'a pas été observé. Les auteurs ont donc suggéré qu'il n'est pas possible de définir un type de réponse des cultures associées à la fertilisation azotée, et que les effets positifs et négatifs observés dépendent de plusieurs facteurs, comme par exemple la disponibilité en azote initiale du sol. De plus, comme vérifié dans d'autres études (Bedoussac et al., 2015), Pelzer et al. (2014b) ont aussi évoqué que la céréale bénéficie davantage de l'association que la légumineuse, ce qui est expliqué par une plus grande compétitivité de la céréale pour la ressource azotée, sujet développé par la suite.

2.3.3. Bénéfices liés à une meilleure utilisation de la ressource azotée

Les gains de biomasse et/ou de rendement communément observés dans les associations (Bedoussac et al., 2015; Bedoussac & Justes, 2010a) sont souvent attribués à une meilleure utilisation de la ressource azotée, sans pour autant négliger les autres formes d'interactions positives (complémentarité et facilitation) évoquées précédemment. Particulièrement, cette meilleure efficacité dans l'utilisation du N est intimement liée à la grande compétitivité du blé pour cette ressource. En effet, dans les premiers stades de croissance d'un système associant une céréale et une légumineuse, les nodosités de la légumineuse ne sont pas encore complètement actives, de sorte qu'elle est en compétition directe avec la céréale pour l'azote minéral du sol (Voisin et al., 2002). La céréale est pourtant beaucoup plus compétitive par rapport à la légumineuse en début de cycle, en raison d'un enracinement plus dense et rapide, ainsi que d'une plus grande demande en N à ce stade (Corre-Hellou et al., 2007). Par conséquent, une diminution significative de l'azote minéral du sol peut être observée en début de croissance due à la bonne performance de la céréale, ce qui force la légumineuse à fixer davantage de N atmosphérique afin de répondre à ses besoins azotés. En effet, plusieurs études ont démontré une augmentation significative du pourcentage de N dérivé de la fixation atmosphérique (%Ndfa) chez les légumineuses associées à une céréale, comparativement à la légumineuse cultivée seule (Bedoussac & Justes, 2010a; Corre-Hellou et al., 2006; Naudin et al., 2010). Cette situation est souvent vérifiée quand la disponibilité de l'azote dans le sol est faible, mais des forts pourcentages de fixation en systèmes associés peuvent être également observés en milieu riche en N, puisque la céréale est capable de réduire le pool de nitrate du sol (Justes et al., 2014). Ainsi, en raison du plus fort taux de fixation et du moindre prélèvement de N du sol par la légumineuse, la quantité de N disponible pour la céréale associée est quasiment la même que pour la céréale cultivée seule. Cette situation engendre ainsi un autre avantage souvent observé dans les systèmes associant céréales et légumineuses : l'augmentation du taux de protéine (*i.e.* qualité des grains) de la céréale. Ce phénomène s'explique aussi du fait de la moindre densité de la céréale en culture associée par rapport

à celle en culture seule ; cela permet à la céréale de disposer d'une plus grande disponibilité de N par plante, par épi ou par grain (Bedoussac & Justes, 2010a, b).

2.3.4. Effets des associations de cultures annuelles sur les bio-agresseurs

Les associations de cultures sont connues pour atténuer l'incidence de bio-agresseurs (*i.e.* ravageurs, maladies et adventices), comparativement aux cultures pures (Brooker et al., 2015; Ehrmann & Ritz, 2014; Malézieux et al., 2009), en raison d'interactions complexes entre facteurs biotiques, physiques et microclimatiques existant au sein de ces systèmes (Corre-Hellou et al., 2014). Ainsi, au sein d'un couvert végétal plus diversifié, différents facteurs peuvent altérer la reconnaissance des plantes-hôtes par les ravageurs et pathogènes, et par conséquent le développement ou la dispersion de ces derniers. A titre d'exemples, i) confusion visuelle (couleurs et texture différentes) ou chimique (composés aromatiques émis par les plantes non-hôtes), ii) dilution des stimuli attractifs, iii) barrière mécanique due à un couvert végétal hétérogène, iv) création d'un microclimat défavorable, et v) développement de conditions favorables à l'attraction d'organismes bénéfiques comme des prédateurs ou parasitoïdes (Corre-Hellou et al., 2014; Ratnadass et al., 2012), peuvent être à l'origine des effets bénéfiques des associations sur les bio-agresseurs.

Les adventices sont souvent moins favorisées dans les associations de culture en raison surtout de i) la compétition plus forte pour les ressources existantes telles que lumière, eau, N et autres nutriments et ii) l'allélopathie (Malézieux et al., 2009). Plusieurs études ont ainsi montré l'efficacité des associations de cultures annuelles pour réduire l'infestation d'adventices (Amossé et al., 2013; Corre-Hellou et al., 2011), mais aussi de ravageurs et maladies (Boudreau, 2013; Corre-Hellou et al., 2004; Ndzana et al., 2014; Ratnadass et al., 2012), comparativement à l'une des deux cultures pures. Tout particulièrement, concernant un ravageur du colza (puceron), une étude a montré qu'au sein de l'association féverole-colza, l'espèce non-hôte (féverole) a été capable de produire un nectar extra-floral favorisant la longévité et la période d'oviposition d'une femelle d'un parasitoïde de ce puceron, démontrant l'importance de cette association pour le contrôle biologique des parcelles de colza (Jamont et al., 2014).

Enfin, d'autres travaux signalent également l'importance des interactions souterraines (« *belowground interactions* ») pour réduire l'incidence de bio-agresseurs au sein des associations de cultures (Ehrmann & Ritz, 2014). Ces interactions ayant lieu dans le sol sont beaucoup plus complexes que celles observées dans le compartiment aérien (« *aboveground interactions* »), mais les mécanismes/facteurs en jeu pour l'atténuation de bio-agresseurs via les sols sont quasiment les mêmes que ceux mentionnés plus haut, pour la composante aérienne (Ehrmann & Ritz, 2014). Particulièrement, les interactions souterraines seront en grande partie influencées par les exsudats

racinaires libérés au sein des cultures associées. Ces exsudats seront ainsi capables d'attirer i) des microorganismes bénéfiques ou antagonistes (Hao et al., 2010; Motisi et al., 2009) impliqués dans le contrôle des populations de pathogènes via compétition ou par antagonisme (antibiotiques par exemple), ou alors ii) des bactéries dites promotrices de la croissance des plantes (PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) et des champignons mycorhiziens, qui peuvent activer des mécanismes de défense chimiques et/ou physiques chez la plante-hôte (Eisenhauer, 2012; Monteiro et al., 2012). Enfin, ces exsudats peuvent aussi correspondre à des molécules allélopathiques, lesquelles sont susceptibles de supprimer efficacement des agents pathogènes dans le sol (Hao et al., 2010), mais aussi d'empêcher l'établissement et le développement d'adventices (Fernández-Aparicio et al., 2010; Midega et al., 2010; Singh et al., 2003).

3. Les associations de cultures annuelles et leurs effets sur le fonctionnement des sols

Comme évoqué dans la section 1.2 pour les systèmes naturels, la diversité végétale est reconnue pour avoir un effet sur le fonctionnement des sols également en contexte agricole. L'un des effets souvent évoqués dans la littérature concerne les propriétés physiques des sols. En effet, les associations céréales-légumineuses, via leurs systèmes racinaires diversifiés et complémentaires, sont capables d'exploiter différents horizons du sol, et éventuellement d'améliorer leur structure et de réduire ainsi les risques d'érosion (Ehrmann & Ritz, 2014; Lithourgidis et al., 2011). Des effets positifs des associations de cultures annuelles sont également évoqués en ce qui concerne le C organique du sol, en raison d'une séquestration accrue de C via l'augmentation des biomasses racinaires (Cong et al., 2015). Cependant, les effets les plus complexes et intéressants des associations de cultures sur le fonctionnement du sol se produisent dans la zone à l'interface entre le sol et les racines, *i.e.* la rhizosphère (Hinsinger et al., 2009; Philippot et al., 2013; Shen et al., 2013). Cette zone est enrichie en composés divers en raison de l'exsudation racinaire (Kuzyakov & Razavi, 2019), ce qui attire une myriade de microorganismes qui forment le rhizo-microbiome (Chaparro et al., 2013). En effet, il est reconnu qu'au sein de la rhizosphère la concentration de microorganismes est beaucoup plus importante que dans le sol *bulk*, non-influencé par les racines (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). Ainsi, des interactions complexes entre des processus physiques, chimiques et biologiques ont lieu dans la rhizosphère des cultures associées, ce qui module différemment le cycle de nutriments dans ces systèmes relativement aux cultures pures (Ehrmann & Ritz, 2014). Cet « effet rhizosphérique » des associations sur le fonctionnement des sols peut être aussi considéré en termes de suppression de bio-agresseurs (Ehrmann & Ritz, 2014; Hu et al., 2018), comme évoqué dans la section précédente.

Cependant, en raison de l'importance des nutriments N et P parmi les grands cycles biogéochimiques planétaires, seule l'influence des associations de cultures sur les cycles de N et P sera abordée dans la section suivante, en considérant les différents processus rhizosphériques qui sont impliqués.

3.1. Processus rhizosphériques impliqués dans les cycles des nutriments N et P

3.1.1. Effets directs liés à l'absorption et à l'exsudation racinaire

Les plantes peuvent influencer le fonctionnement des sols, et notamment la disponibilité des nutriments N et P, d'une manière directe via leur activité racinaire, *i.e.* à travers l'absorption de ces nutriments, voire d'autres, et également via l'exsudation de certains ions et composés.

3.1.1.1. Azote

La complémentarité d'utilisation de la ressource azotée au sein des associations céréales-légumineuses entraîne, par soi-même, une différence de teneurs en N minéral dans les sols soumis à ces systèmes, comparativement à ceux soumis aux cultures seules. En effet, Fan et al. (2011) ont signalé que les concentrations en nitrate dans la rhizosphère de l'association maïs-féverole a été plus proche de celle du maïs cultivé seul (teneur moins importante) que de celle de la culture pure de féverole (teneur plus importante). De ce fait, les associations céréales-légumineuses peuvent réduire les risques de lixiviation du nitrate comparativement aux cultures pures de légumineuses (Corre-Hellou et al., 2011; Hauggaard-Nielsen et al., 2003). Un autre mécanisme pouvant jouer directement sur la disponibilité de N au sein de la rhizosphère des systèmes associés est l'enrichissement du pool de N du sol par la légumineuse via la rhizodéposition ou NdfR (*Nitrogen derived from rhizodeposition*) (Duchene et al., 2017; Mahieu et al., 2014). La rhizodéposition peut être définie comme la libération, par les racines, d'ions solubles ou de molécules gazeuses (NH_4^+ , NO_3^- , H^+ , OH^- , HCO_3^- , CO_2 ...) et, surtout, des composés carbonés (Dennis et al., 2010). Ces composés correspondent à des fragments de cellules et de tissus racinaires arrachés, ainsi qu'à des sucres, acides aminés, acides organiques, protéines, enzymes etc., libérés par des cellules mortes ou en pleine activité (Dennis et al., 2010; Kuzyakov & Razavi, 2019). Ainsi, une espèce annuelle est capable de « rhizodéposer » entre 10 et 16% de son N total tout au cours de son cycle de vie (Jones et al., 2009), et ces flux azotés peuvent être environ 2 fois plus élevés chez les légumineuses que chez les graminées (Justes et al., 2014). A travers une étude réalisée avec trois espèces prairiales (trèfle rouge, trèfle blanc et ray-grass), Høgh-Jensen & Schjoerring (2001) ont observé que les composés azotés rhizodéposés (incluant des racines fines) ont constitué plus de 80% du N total dérivé des plantes dans le sol. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence que ces rhizodépôts ont constitué, de loin, le pool dominant de N d'origine végétale dans le sol étudié.

3.1.1.2. Phosphore

Au sein des systèmes associés céréales-légumineuses, la disponibilité de P peut être également affectée par les dynamiques d'exsudation racinaire de chaque espèce (Hinsinger et al., 2011). En effet, via leurs racines, les plantes sont capables d'influencer la disponibilité de P essentiellement via l'exsudation de i) protons/hydroxydes, ii) carboxylates (*i.e.* acides organiques carboxyliques dans leur forme dissociée) et iii) phosphatases (Hinsinger et al., 2011). Par exemple, dans des sols neutres ou alcalins, une augmentation de la disponibilité du P dans la rhizosphère des associations céréales-légumineuses peut être observée en raison de l'acidification induite par la libération de protons par la légumineuse (Latati et al., 2014; Li et al., 2008; Li et al., 2007), induisant la solubilisation des minéraux phosphatés. Plus généralement, les légumineuses sont connues pour exsuder davantage de protons par rapport aux céréales en raison du processus de fixation du N₂ qui résulte en un excès de cations absorbés (Hinsinger et al., 2003; Kuzyakov & Razavi, 2019). Par conséquent, lorsqu'elles sont associées à une céréale, les légumineuses ont tendance à davantage fixer de N₂ (Bedoussac & Justes, 2010a; Corre-Hellou et al., 2006; Fan et al., 2006; Naudin et al., 2010), ce qui fait que leur exsudation de protons peut être également plus importante comparativement à la légumineuse cultivée seule (Li et al., 2008). L'exsudation de ions OH⁻ peut aussi produire une augmentation de la disponibilité du P même dans les sols neutres à alcalins (Devau et al., 2009; Devau et al., 2010). Cela est dû à une désorption accrue des ions phosphates et à des changements dans les charges de surface des oxydes de fer et des minéraux argileux auxquels ces ions phosphatés sont liés (Hinsinger, 2001). De ce fait, dans un sol à pH neutre, une augmentation de la disponibilité de P a été observée dans les rhizosphères du blé et du pois chiche associés, relativement aux cultures pures, et dans le cas du blé dur, cette augmentation pouvait s'expliquer par une alcalinisation plus forte en association qu'en culture pure (Betencourt et al., 2012). Les carboxylates exsudés par les plantes sont capables d'affecter la disponibilité de P dans les sols via deux mécanismes majeurs : i) échange de ligands sur les sites d'adsorption de P et ii) complexation d'ions métalliques (Ca, Al, Fe) impliqués dans l'immobilisation de P (Hinsinger, 2001; Jones, 1998). Par conséquent, en raison de la capacité de certaines légumineuses à exsuder de grandes quantités de carboxylates (notamment en conditions de faible disponibilité de P), il est supposé que dans les systèmes associant céréales et légumineuses la disponibilité de P peut être ainsi accrue (Dissanayaka et al., 2015; Hinsinger et al., 2011), notamment par rapport aux céréales cultivées seules. En particulier, des légumineuses comme le pois-chiche (*Cicer arietinum*) et le lupin blanc (*Lupinus albus*) se distinguent des autres légumineuses, et surtout des céréales, quant à leurs capacités à exsuder des quantités massives de carboxylates tels que le malate et le citrate (Hinsinger, 2001; Neumann & Römheld, 1999; Pearse et al., 2006). Enfin, une étude comparant l'activité des

phosphatases acides dans la rhizosphère de certaines cultures a mis en évidence une plus grande activité chez le lupin blanc, suivie de la féverole (*Vicia faba*), du pois (*Pisum sativum*) et du blé (*Triticum aestivum*) (Nuruzzaman et al., 2006). Par conséquent, l'association d'une céréale (culture exsudant moins de phosphatases) avec une légumineuse (culture exsudant plus de phosphatases) peut provoquer une augmentation de la disponibilité de P à travers l'hydrolyse des formes organiques de P du sol, par rapport à la céréale cultivée seule (Dissanayaka et al., 2015; Inal et al., 2007; Li et al., 2004b). Cependant, pour le moment, aucune étude n'a permis de relier l'activité phosphatasique observée dans la rhizosphère des cultures aux enzymes effectivement sécrétées par les racines, puisque les phosphatases peuvent également être d'origine microbienne (Hinsinger et al., 2011).

3.1.2. Effets indirects liés aux communautés microbiennes de la rhizosphère

3.1.2.1. Généralités

Les microorganismes sont une composante fondamentale du fonctionnement des sols puisqu'ils sont essentiels à de nombreuses fonctions vitales (Schloter et al., 2018) ou processus écologiques, tels que le flux d'énergie, le cycle des nutriments et le renouvellement de la matière organique (Zhang et al., 2015). Les associations céréales-légumineuses sont donc également capables d'affecter le fonctionnement des sols et les cycles de N et P de manière indirecte via des changements dans la structure, l'abondance ou les activités des communautés microbiennes associées à leur rhizosphère. En effet, chaque espèce végétale ou génotype a une influence sélective sur les communautés microbiennes de la rhizosphère en raison de différences dans la quantité et la composition des rhizodépôts (Hinsinger et al., 2011; Hunter et al., 2014; Philippot et al., 2013). Ces rhizodépôts correspondent à la fois à une source d'énergie et à des signaux pouvant avoir des effets inhibiteurs ou stimulants sur ces communautés (Dennis et al., 2010; Philippot et al., 2013). Dans ce contexte, Song et al. (2007a) signalent que dans les associations céréales-légumineuses, les racines des différentes espèces sont en contact direct et, par conséquent, les communautés microbiennes de leurs rhizosphères respectives peuvent interagir entre elles (Figure 3). Cependant, la communauté microbienne résultante ne sera pas forcément un simple mélange des communautés sélectionnées par chaque espèce cultivée seule, puisque la composition des exsudats peut varier entre les espèces et qu'on pourrait s'attendre à une plus grande diversité de rhizodépôts dans cette rhizosphère commune (Hinsinger et al., 2011). Comme résultat, des nouvelles espèces microbiennes peuvent être sélectionnées dans cette rhizosphère commune, attirées par cette nouvelle combinaison d'exsudats (Ehrmann & Ritz, 2014) (Figure 3). En effet, plusieurs études ont démontré un changement dans la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère des associations céréales-légumineuses (Chen et al., 2018; Li et al., 2010; Li et al., 2016b; Wang et al., 2007), avec l'observation de nouvelles

espèces (Qiao et al., 2012; Zhang et al., 2010b), non-présentes dans les respectives cultures pures. Certains auteurs supposent également qu'une diversité végétale plus importante engendrerait une plus grande diversité microbienne (Philippot et al., 2013). Cela a été effectivement vérifié dans certains travaux portant sur l'association de cultures maraîchères (Zhou et al., 2011) ou céréales-légumineuses (Chai et al., 2005; Qiao et al., 2012; Song et al., 2007a), mais pas dans d'autres (Zhang et al., 2010b). En termes de biomasse de champignons et bactéries, une plus grande biomasse de communautés bactériennes et fongiques a été observée pour une association maïs-arachide comparée à ces deux cultures seules en conditions contrôlées (Li et al., 2016b), ainsi qu'une plus grande biomasse fongique dans une association graminée-légumineuse fourragère par rapport à la graminée cultivée seule en conditions de terrain (Zhao et al., 2015).

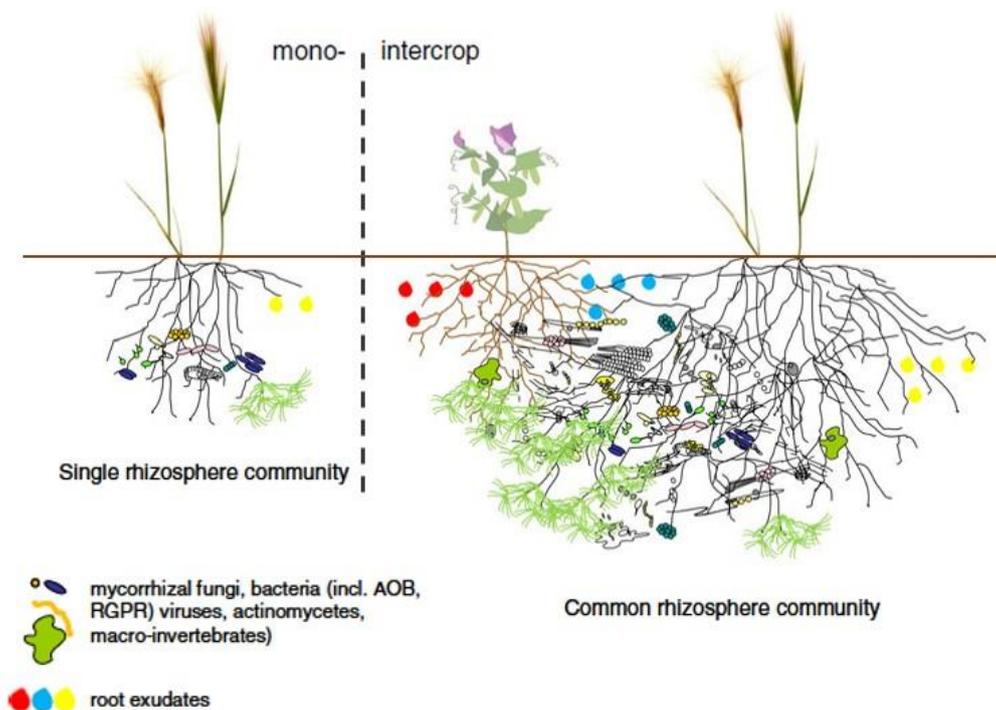


Figure 3. Illustration de la complexité des mécanismes physiques, chimiques et microbiologiques dans la rhizosphère des plantes associées, comparativement à celle des plantes en conditions de culture mono-spécifique (Ehrmann & Ritz, 2014).

3.1.2.2. Azote

Les teneurs en C, N et P de la biomasse microbienne (*Microbial Biomass Carbon* - MBC, *Microbial Biomass Nitrogen* - MBN et *Microbial Biomass Phosphorus* - MBP) sont des indicateurs microbiens pertinents à considérer lorsqu'on s'intéresse aux effets des associations de cultures sur les cycles de C et des nutriments N et P dans leur rhizosphère. Plusieurs travaux ont ainsi montré que les associations céréales-légumineuses sont capables de modifier le MBC (Latati et al., 2017; Song et al., 2007b; Tang et al., 2014; Tang et al., 2016), le MBN (Latati et al., 2017; Song et al., 2007b) ou le MBP (Tang et al., 2014; Tang et al., 2016), comparativement aux cultures pures. Les réseaux mycorhiziens qui peuvent s'établir au sein des associations céréale-légumineuses peuvent aussi contribuer à l'augmentation de la disponibilité de N dans leur rhizosphère. En effet, Li et al. (2009) ont démontré que l'association riz pluvial (*Oryza sativa*) – haricot mungo (*Vigna radiata*) a significativement augmenté la formation de mycorhizes à arbuscules, comparativement aux cultures pures, et tout particulièrement dans la rhizosphère du riz, ce qui, par conséquent, a également augmenté les transferts de N du haricot vers le riz.

Les associations céréales-légumineuses peuvent aussi modifier la structure de communautés microbiennes spécifiques au cycle de N, comme celles impliquées dans la fixation de N₂ atmosphérique, l'oxydation de l'ammonium, la dénitrification, la réduction du protoxyde d'azote ou la décomposition du N organique (Yu et al., 2019). En effet, des études récentes portant sur la quantification de plusieurs gènes microbiens codant pour des enzymes impliquées dans le cycle de N ont évoqué des changements significatifs de leur abondance dans la rhizosphère des cultures associées (Chen et al., 2018; Pivato et al., 2017; Zhao et al., 2017). Plusieurs travaux se sont intéressés au processus de nitrification, et spécialement à sa première étape (*i.e.* oxydation de l'ammoniac (NH₃) en nitrite (NO₂⁻)), laquelle est l'étape limitante de l'oxydation de NH₃ en nitrate (NO₃⁻) et donc essentielle au cycle global de N (Fan et al., 2011; Zhang et al., 2015) (Figure 4). Cette étape est assurée par deux groupes de microorganismes : les bactéries oxydant l'ammoniac ou AOB (*Ammonia-Oxidizing Bacteria*) et les archées oxydant l'ammoniac ou AOA (*Ammonia-Oxidizing Archaea*) (Robertson & Groffman, 2015; Ward, 2013). Dans ce contexte, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'effet de l'association de cultures sur l'abondance (Chen et al., 2018; Pivato et al., 2017; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2017) ou la structure des AOA et AOB (Fan et al., 2011; Song et al., 2007a), avec des résultats souvent contrastés. En effet, certains de ces travaux ont signalé que les cultures associées sont responsables d'une augmentation (Pivato et al., 2017; Zhang et al., 2015), d'une réduction (Chen et al., 2018) ou d'aucun effet (Zhao et al., 2017) sur l'abondance de certains nitrifiants (AOA ou AOB) dans leur rhizosphère, comparativement aux cultures pures. En termes de structures des communautés, Fan et al. (2011) n'ont pas observé de différences marquées entre les modalités de cultures (associées

versus seules). Au contraire, Song et al. (2007a) ont signalé des modifications significatives de la composition des AOB par les associations étudiées (blé-féverole, blé-maïs et maïs-féverole) et ils ont montré que l'intensité de ces changements variait en fonction des stades de croissance des plantes.

Enfin, Alvey et al. (2003) évoquent le rôle fonctionnel clé des nitrifiants et leur capacité à affecter d'autres propriétés chimiques et biologiques de la rhizosphère. En effet, la conversion de NH_3 en NO_3^- lors de la nitrification est un processus producteur de H^+ , tandis que la captation des nitrates par les racines est un mécanisme libérateur de OH^- (Helyar & Porter, 1989; Ward, 2013), ce qui affecte la biodisponibilité du P (comme évoqué précédemment), ainsi que l'abondance et l'activité d'autres groupes de microorganismes comme ceux impliqués dans la production d'hormones et d'antibiotiques pour les plantes (Alvey et al., 2003). Cela renforce, encore une fois, l'importance et la complexité des processus ayant lieu au sein de la rhizosphère des cultures associées et qui sont passibles d'affecter le fonctionnement chimique et microbiologique des sols sur plusieurs fronts.

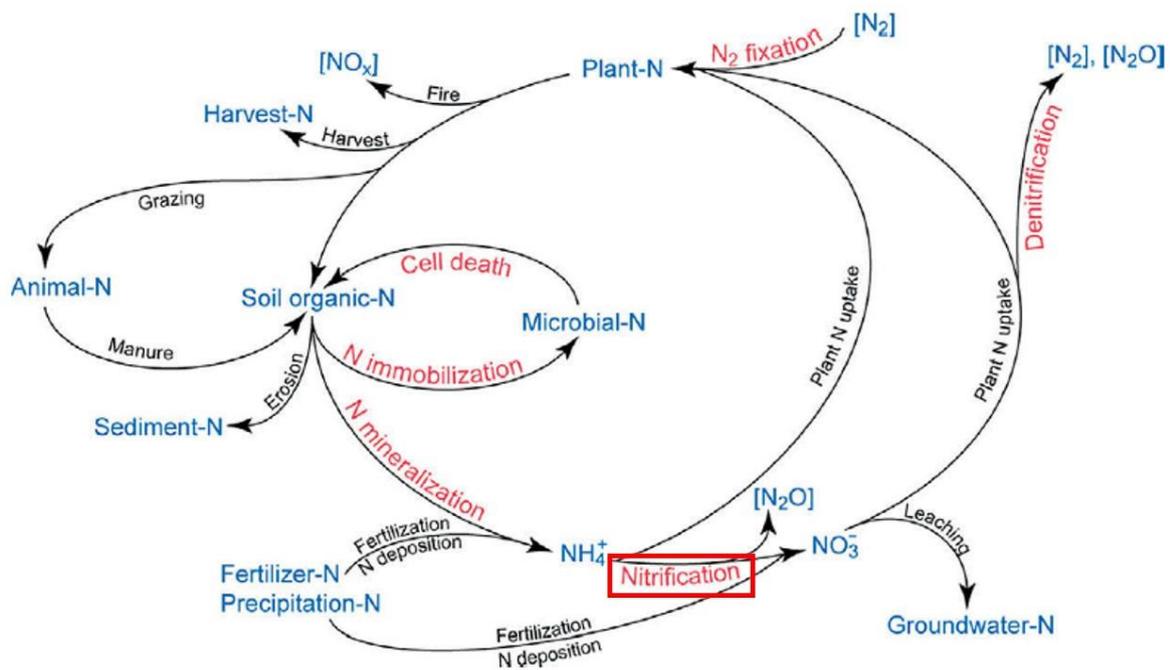


Figure 4. Représentation schématique du cycle terrestre de l'azote, avec l'indication (rectangle rouge) de l'importante place du processus de nitrification dans ce cycle. Les processus réalisés par les microbes du sol apparaissent en rouge. Les gaz apparaissent entre parenthèses (Robertson & Groffman, 2015).

3.1.2.3. Phosphore

Dans l'étude conduite par He et al. (2013), un changement dans la structure des communautés microbiennes (mesurées via l'analyse des profils d'acides gras phospholipidiques – PLFAs) de la rhizosphère des cultures associées a été observée, et les auteurs ont relié ce résultat à une augmentation de la disponibilité du P. En effet, les auteurs ont pu mettre en évidence une corrélation significativement positive entre un PLFA biomarqueur des champignons mycorhiziens arbusculaires et le P disponible dans le sol sous association. L'étude de He et al. (2013) a ainsi mis en avant que les interactions complexes ayant lieu au sein de la rhizosphère des associations céréales-légumineuses ont probablement induit un enrichissement sélectif d'espèces microbiennes impliquées dans la mobilisation de P. Cette étude est aussi intéressante car elle fait ressortir la pertinence des réseaux mycorhiziens dans les associations de cultures et leur potentielle contribution à l'augmentation de la disponibilité de P dans la rhizosphère des espèces associées. Pourtant, bien que les transferts directs de nutriments entre les espèces végétales en association via ces réseaux aient déjà été documentés pour N (Li et al., 2009), ce processus n'a pas encore été démontré pour P (Hinsinger et al., 2011).

3.2. La place des associations de cultures annuelles dans les rotations : prise en compte des concepts *Plant-Soil Feedback* ou *Plant Legacy*

La section précédente a permis de faire l'état des connaissances sur les effets des associations de cultures sur le fonctionnement des sols, ce qui ouvre également la discussion sur la persistance de ces effets au cours du temps. Dans le contexte des agroécosystèmes, la connaissance de l'effet du « précédent cultural » par les agronomes est essentielle pour concevoir des rotations optimales, dans lesquelles chaque culture ou association de deux ou plusieurs cultures bénéficie d'un héritage positif induit dans le sol par la(es) culture(s) précédente(s) (Hu et al., 2018; Mariotte et al., 2018). Bien que les effets sur les sols de la rotation entre une céréale et une légumineuse soient bien documentés dans la littérature, ceux issus d'une rotation intégrant les associations sont encore à approfondir, que ce soit dans le court ou le long-terme. Cette section propose ainsi d'aborder les effets potentiels des cultures associées sur les sols dans le temps, en considérant les concepts de *Plant-Soil Feedback* (PSF) ou *Plant Legacy* (PL).

3.2.1. *Plant-Soil Feedback* et *Plant Legacy* : définitions

Le terme *Plant-Soil Feedback* (PSF) a été introduit dans la littérature par les écologues (Bever et al., 1997; Hobbie, 1992; van Breemen, 1995; van der Putten, 1997) et est comparable au concept de rotations culturales des agronomes (van der Putten et al., 2013). Un PSF peut être défini comme le

résultat des changements induits par les plantes dans le fonctionnement des sols et qui impactent la performance i) des plantes à l'origine de ces effets ou de ii) celles qui se développeront après la disparition de ces dernières (van der Putten et al., 2013). Ainsi, en écologie, au cours de deux dernières décennies, le concept de PSF a été invoqué comme étant à l'origine de certains phénomènes écologiques tels que la succession de plantes, l'invasion par des espèces exotiques et l'organisation des communautés, avec une étendue récente à l'évolution des populations (Bailey & Schweitzer, 2016). Ce concept peut être également associé à celui de *Plant Legacy* (PL) ou effet d'héritage, mais ce dernier serait plus adapté lorsqu'on se réfère seulement à la persistance des effets des plantes dans les sols (van der Putten et al., 2013), sans fixer précisément le « récepteur » de ces effets (*i.e.* les plantes à l'origine des effets, les plantes suivantes ou l'écosystème dans son ensemble). De plus, PL peut être aussi utilisé seulement pour exprimer la durée de la présence des plantes permettant de voir cet effet d'héritage, associé ainsi aux expressions « court », « moyen » ou « long-terme ».

3.2.2. *Plant-Soil Feedback et Plant Legacy : les mécanismes en jeu*

Les effets des plantes sur le fonctionnement des sols pouvant affecter la croissance de ces mêmes espèces ou de celles qui leur succèdent peuvent être considérés d'une manière directe, via la rhizodéposition (Hu et al., 2018) ou leur profil d'absorption de nutriments comme N (de Vries et al., 2017; Moreau et al., 2015), et indirecte, via l'apport des litières (Vukicevich et al., 2016). Ainsi, les plantes modifient soit les i) propriétés abiotiques des sols, puisqu'elles jouent sur l'accumulation, l'immobilisation ou l'épuisement des nutriments, soit les ii) propriétés biotiques, à travers la sélection/attraction de microorganismes bénéfiques (*i.e.* mycorhizes, bactéries PGPR, etc.) ou nuisibles (*i.e.* pathogènes) au développement végétal (Xue et al., 2018). Par conséquent, la combinaison de différentes quantités et qualités de litières, ainsi que des profils distincts d'absorption et d'exsudation racinaires dans les systèmes diversifiés (Mariotte et al., 2018), joueront également sur la nature (positive ou négative) et l'intensité des effets PSF et PL. La manière dont les plantes influencent les sols (absorption/exsudation ou litières) affectera également le délai d'apparition ainsi que la persistance de l'effet PSF ou PL au cours du temps. En effet, on peut supposer que i) l'impact de l'entrée des litières sur le fonctionnement du sol soit évident seulement après un certain temps (temps de la décomposition de cette litière et réel effet sur la composante chimique et biologique des sols), en fonction de la quantité et de la qualité de ces litières (Eisenhauer et al., 2010; Vukicevich et al., 2016), tandis que ii) l'effet de la rhizodéposition puisse se produire dans des pas de temps plus courts, par exemple au cours d'un cycle cultural ou dès la disparition de la plante à l'origine de cet effet. La persistance de ces effets (*Plant Legacy* ou héritage, les termes gardés désormais au cours de cette synthèse) dans le temps peut aussi varier et dépend de la nature des changements produits dans les

sols (van der Putten, 2003) ainsi que des types de sols. En effet, en contexte agricole, pour la rotation culturale céréale/légumineuse, Alvey et al. (2003) ont évoqué : « *Although not well investigated, it can be presumed that, as a sequence of plant species are grown on a soil, the predominant bacteria associated with the previous crop species will exert at least some temporary influence on the rhizosphere bacterial communities in the rhizosphere of the subsequent species, particularly during early growth* ».

3.2.3. Application du concept *Plant Legacy* ou Héritage dans les systèmes prairiaux

Certains auteurs suggèrent que les effets positifs d'une plus grande diversité végétale sur les sols ne sont visibles qu'à long terme, après 4 ou 5 ans de croissance, d'après des expérimentations conduites sur le terrain avec des espèces typiques de prairies tempérées (Bartelt-Ryser et al., 2005; Eisenhauer et al., 2010). Bartelt-Ryser et al. (2005) ont signalé que les effets *Plant Legacy* persistant dans les sols, dans leur étude, sont probablement liés aux communautés microbiennes, et ils ont donc suggéré que cette persistance pourrait se prolonger au-delà d'une année. Cependant, une autre étude utilisant des mésocosmes en conditions de terrain, avec différents assemblages dominés soit par des espèces à croissance lente (CL), soit par des espèces à croissance rapide (CR), a mis en évidence un effet *legacy* dans un espace de temps beaucoup plus court, après 18 mois de croissance (Baxendale et al., 2014). Ces auteurs ont observé que les sols conditionnés par les assemblages dominés par les espèces CR ont présenté une plus grande disponibilité de N que ceux conditionnés par les espèces CL, et que ces effets ont influencé la croissance des plantes suivantes. Comparativement aux témoins en monoculture, Baxendale et al. (2014) ont aussi signalé que les effets *plant legacy* des mélanges ont été beaucoup plus forts. Enfin, Semchenko et al. (2017) ont conduit une expérience en pots avec i) soit le même génotype d'une espèce de graminée typique de prairies humides (*Deschampsia cespitosa*), ii) soit un mélange de plusieurs génotypes, et ont observé un effet positif du mélange après seulement 3 mois, en termes de recyclage de N. En effet, ces auteurs ont observé que le mélange de génotypes a produit des litières racinaires plus riches en N, lesquelles ont décomposé plus vite et ont provoqué une augmentation de l'absorption de N par les espèces suivantes. Ainsi, des effets de *Plant Legacy* à court terme sont évoqués dans la littérature, mais souvent via des expériences en micro- et mésocosmes en conditions contrôlées (Kulmatiski & Beard, 2011), ce qui démontre la nécessité de vérifier ces effets également en conditions de terrain.

3.2.4. Application du concept *Plant Legacy* ou Héritage dans les agroécosystèmes

L'étude conduite par Cong et al. (2015) a mis en évidence des « *positive plant legacy effects* » produits par des cultures associées (maïs-blé, maïs-féverole, blé-féverole) sur les stocks de N et de C

organique des sols après 7 ans d'une rotation biannuelle. Ces auteurs ont attribué ces résultats à la plus grande production de biomasse racinaire au sein des associations par rapport aux cultures pures, et au turnover de ces litières au cours du temps favorisant l'immobilisation de C et de N dans les sols. Oelbermann & Echarte (2011) ont également étudié l'effet d'héritage d'une association maïs-soja sur certains paramètres du sol en relation avec les cycles de C et N. Contrairement à l'étude précédente, après seulement un an de croissance, les auteurs n'ont pas observé d'augmentation des stocks de C et N organique. Les auteurs ont pourtant observé une augmentation significative des teneurs de C et N de la biomasse microbienne dans les sols ayant reçu l'association, comparativement aux cultures pures. Ainsi, pour certains paramètres du sol reconnus comme plus stables au cours du temps, nécessitant plusieurs années pour subir des changements perceptibles tels que le C organique des sols (Studdert & Echeverria, 2000), il n'est pas surprenant qu'un effet *plant legacy* ne soit mesurable qu'à long terme. Cependant les effets *plant legacy* des cultures associées sur les sols peuvent se produire à court terme, comme montré plus haut en termes de MBC et MBN (Oelbermann & Echarte, 2011), et pour tous les autres paramètres chimiques et microbiologiques discutés dans la section 3.

Une étude réalisée récemment en conditions contrôlées a également signalé l'importance de la prise en compte du concept d'héritage dans les associations de cultures pour réduire l'effet négatif d'une maladie dont les dégâts étaient originellement importants en raison des successions culturales peu diversifiées (Wang et al., 2016a). Le compartiment microbiologique des sols (*i.e.* microbiome) est mis en évidence comme le facteur central à être considéré pour assurer un héritage bénéfique aux cultures subséquentes, mais la compréhension de la dynamique de ce compartiment complexe du sol reste encore à clarifier (Mariotte et al., 2018). Ainsi, dans un contexte de changement climatique et de préoccupations globales croissantes autour des impacts d'évènements extrêmes (*i.e.* sécheresses, hautes températures...) sur le fonctionnement des écosystèmes (Bérard et al., 2015), la multiplication des effets PL positifs pour la conception de systèmes de cultures privilégiant des communautés microbiennes plus résistantes ou résilientes à ces perturbations est une piste à envisager mais encore peu étudiée.

4. Diversité végétale et impact sur la résistance et la résilience des sols

4.1. Les concepts de résistance et résilience : de l'écologie à la science du sol

4.1.1. Définitions de résistance et résilience face à des perturbations ou stress

De l'anglais, le terme « *disturbance* » correspond à tous les évènements biotiques et abiotiques pouvant affecter une communauté soit indirectement, à travers des effets sur leur

environnement immédiat, soit directement (Rykiel, 1985). Comme résultat d'une « *disturbance* », nous pouvons avoir une « *perturbation* », qui est plutôt liée à cet effet indirect, c'est-à-dire, la réponse d'un composant ou processus écologique, ainsi qu'un « *stress* », se référant à la réponse physiologique d'un individu ou la réponse fonctionnelle d'un système (Griffiths & Philippot, 2013; Rykiel, 1985). Dans la littérature, les termes sont parfois confondus et utilisés comme synonymes (Borics et al., 2013). Cependant, « *disturbance* » est assez difficile à définir puisque le concept peut varier en fonction de l'échelle et du contexte dans lesquels il s'insère (Shade et al., 2012). De ce fait, seuls les termes « *stress* » et « *perturbation* » seront gardés dans cette synthèse pour caractériser n'importe quel événement biotique et abiotique pouvant affecter l'équilibre d'une communauté ou d'un individu. Selon Shade et al. (2012), une perturbation peut être décrite en utilisant différentes échelles spatio-temporelles et en utilisant comme variables la fréquence, l'intensité, la proportion de l'écosystème touché, voire la périodicité. Ainsi, les perturbations peuvent être classifiées en *pulses* ou *presses*, en fonction de leur durée (Bender et al., 1984). Les stress de type *pulses* sont définis comme des stress discrets, de courte durée, tandis que ceux de type *presses* sont plutôt de longue durée et continus dans le temps (Shade et al., 2012) (Figure 5). Les échelles de temps peuvent cependant varier en fonction du contexte et de la communauté étudiée, comme par exemple lorsqu'on considère la chute d'un arbre dans une forêt, laquelle peut être considérée comme une perturbation de type *press* pour les microorganismes du sol mais de type *pulse* pour la végétation de sous-bois environnante (Shade et al., 2012).

La stabilité d'une communauté ou d'un individu détermine leur capacité à continuer à fonctionner dans des conditions de changement (Orwin & Wardle, 2004) et possède deux composantes : la résistance et la résilience (Pimm, 1984). La définition généralement évoquée pour la résistance est la capacité d'un système à résister à une perturbation (Griffiths & Philippot, 2013). Quant à la résilience, deux catégories peuvent être considérées : la résilience écologique et la résilience technique (Griffiths & Philippot, 2013). La résilience écologique prend en compte le degré de perturbation nécessaire pour déplacer le système d'un état stable à un autre (Botton et al., 2006). En revanche, la résilience technique considère le système comme un matériel pouvant se déformer et récupérer son état initial ou un nouvel état stable (Botton et al., 2006). Ainsi, la résilience technique, ou tout simplement, la capacité d'un système à revenir à son état initial après une perturbation (Pimm, 1984), constitue la définition la plus courante dans les études en microbiologie des sols (Allison & Martiny, 2008; Shade et al., 2012).

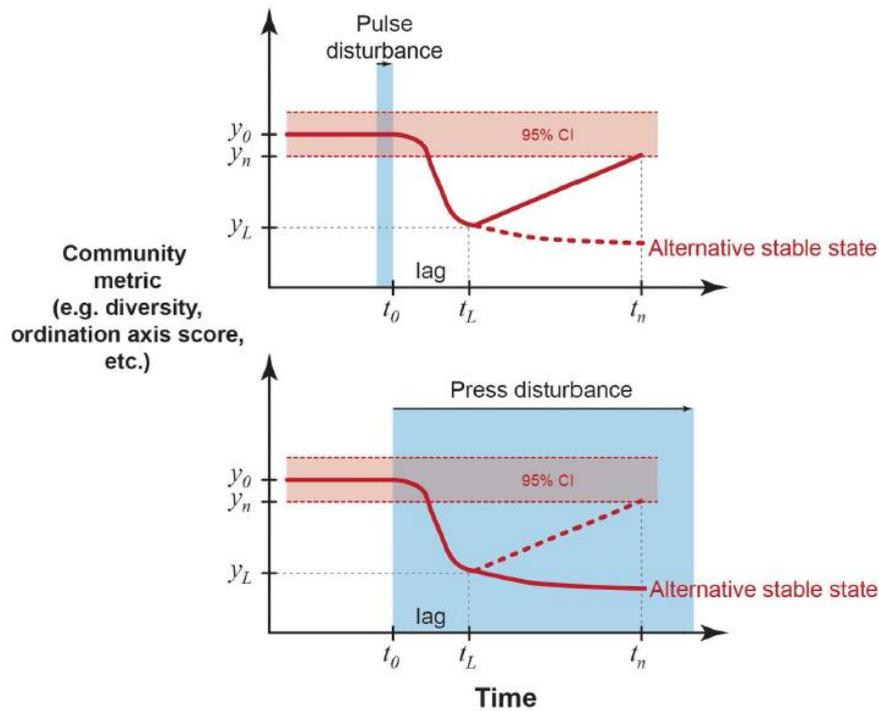


Figure 5. Exemples de définition quantitative de la résistance et de la résilience d'un paramètre microbien (y), ayant une valeur moyenne (y_0) et une variabilité temporelle (illustrée par l'intervalle de confiance de 95% autour de la moyenne), face à des stress de type pulse ou press. Un stress de type pulse fini (ou un press débute) au temps t_0 et le paramètre microbien change de ($y_0 - y_L$) après une période de latence ($t_L - t_0$). La résistance est un indice de magnitude de ce changement. La résilience est un indice du taux de retour à y_0 , après la période initiale ($t_L - t_0$). Pour le calcul de la résilience, la valeur du paramètre (y_n) au temps (t_n) est donc considérée. Un paramètre « récupère » lorsqu'il n'est plus statistiquement différent de la moyenne avant perturbation. Alternativement, le paramètre peut ne pas récupérer et, au lieu, stabiliser à une nouvelle valeur moyenne représentant un état stable alternatif. Cette dernière possibilité est plus probable en réponse à un stress de type press. Cela est un extrait du travail de Shade et al. (2012). Pour le détail des calculs, se référer à leur travail ou également à celui de Orwin & Wardle (2004).

4.1.2. Application en Science du Sol

Le terme « résilience des sols » n'a été introduit dans la littérature qu'en 1994, dans un contexte de prise en compte de l'écologie des sols et de la nécessité d'une gestion durable de cette ressource pour combattre sa dégradation (Blum, 1994). Seybold et al. (1999), en se basant sur la définition du concept de qualité des sols proposé par Karlen et al. (1997) sont les premiers à avoir mis en relation la qualité des sols avec les concepts de résistance et résilience définis précédemment. En effet, la qualité des sols est « la capacité d'un sol à fonctionner au sein des limites d'un écosystème pour supporter la productivité biologique, maintenir la qualité environnementale et promouvoir la santé des plantes et des animaux » et peut distinguer deux composantes, la qualité inhérente, liée au type de sol (*i.e.* ses propriétés inhérentes issues des processus de pédogénèse), et dynamique, liée à la gestion et à l'utilisation humaine (Doran & Parkin, 1994; Karlen et al., 1997). Pour tenir compte des aspects dynamiques de la qualité des sols, Seybold et al. (1999) relie la qualité des sols à la résilience selon la capacité d'un sol à retrouver ses fonctions et son intégrité après une perturbation, tandis que la résistance du sol est la capacité d'un sol à maintenir ses fonctions au cours d'une perturbation

(Figure 6). Certaines fonctions du sol n'étant pas mesurables, le recours aux indicateurs est parfois nécessaire. Seybold et al. (1999) évoquent surtout la nécessité de choisir un indicateur sur lequel des calculs de résistance et résilience peuvent être appliqués.

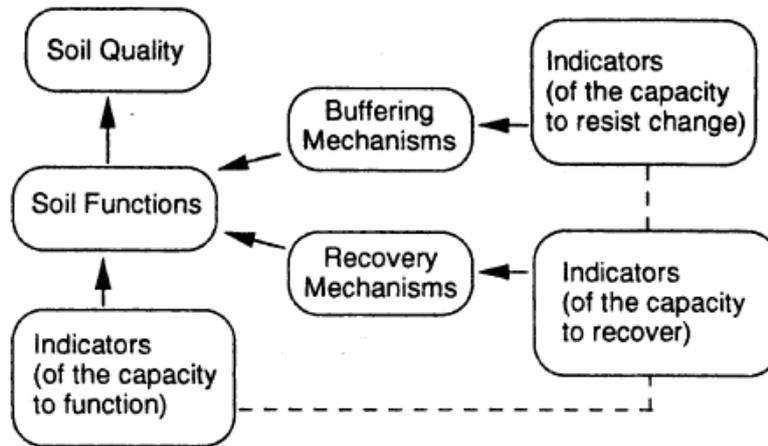


Figure 6. Schéma représentant comment la résilience et la résistance du sol sont liées à la qualité du sol à travers ses fonctions (Seybold et al., 1999).

4.2. Résistance et résilience des communautés microbiennes du sol

Les microorganismes du sol sont des acteurs majeurs de nombreuses fonctions du sol telles que le cycle biogéochimique d'éléments, la productivité végétale ou la régulation du climat (Griffiths & Philippot, 2013). Ainsi, la prise en compte d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de la résistance et de la résilience des sols devient indispensable dans un objectif de maintenance de l'intégrité des écosystèmes terrestres et de fourniture de services écosystémiques essentiels (Griffiths & Philippot, 2013) (

Figure 7).

4.2.1. Types de perturbations affectant les communautés microbiennes du sol

Plusieurs types de perturbations sont susceptibles d'affecter les communautés microbiennes du sol dans les agroécosystèmes où différentes natures de perturbations peuvent avoir lieu, tant naturelles que d'origine anthropiques (Griffiths & Philippot, 2013). Par exemple, le travail du sol est reconnu comme l'une des perturbations majeures affectant les microorganismes du sol (Jansa et al., 2003; Wardle, 1995), pouvant affecter la stabilité des communautés microbiennes face à d'autres perturbations (Steenwerth et al., 2005). D'autres pratiques comme la solarisation (Culman et al., 2006), l'apport d'amendements organiques (Fujino et al., 2008) ou la pollution par des métaux lourds dans le sol (Macdonald et al., 2011), sont aussi capables d'affecter la stabilité des communautés de

microorganismes du sol. Cependant, les perturbations telles que les incendies, la dessiccation et les cycles de gel-dégel sont celles les plus communément étudiées (Griffiths & Philippot, 2013). Or, dans le contexte actuel de changement climatique, les évènements extrêmes tels que les vagues de chaleur, *i.e.* des périodes de longue durée associant sécheresse intense et température élevée (Bérard et al., 2015) ou les fortes pluies (Liu et al., 2019) sont également étudiées. En effet, ces évènements peuvent modifier intensément les fonctions écosystémiques (Heisler & Weltzin, 2006; Placella et al., 2012), il devient alors essentiel d'étudier les effets de ces évènements sur le fonctionnement des sols et sa composante microbienne.

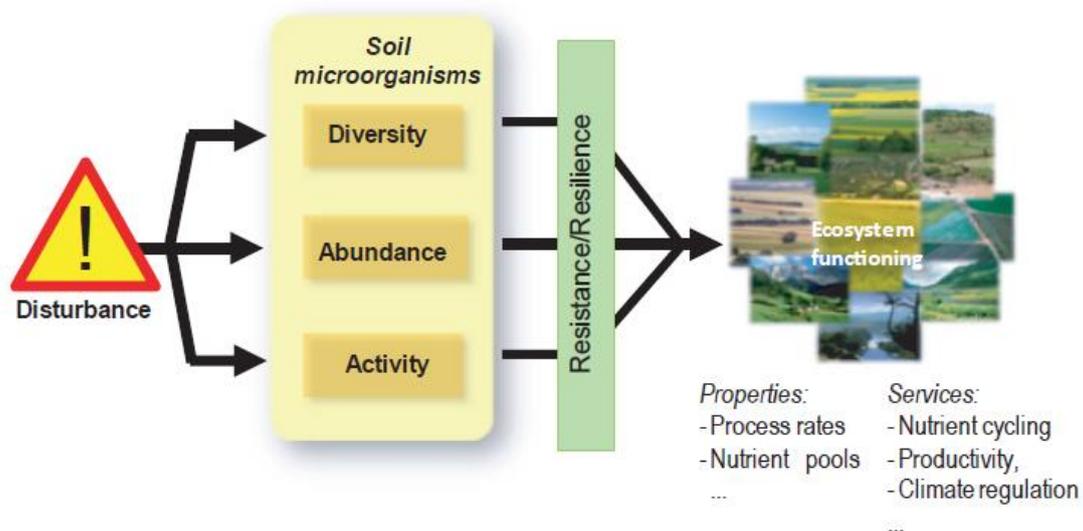


Figure 7. Schéma montrant que la réponse de l'écosystème sol à une perturbation est influencée par la résistance et la résilience de la communauté microbienne du sol (Griffiths & Philippot, 2013).

4.2.2. Mesures de résistance et résilience

Plusieurs indices de résistance et de résilience sont proposés dans la littérature (Tableau 1). Les indices répertoriés sur le Tableau 1 correspondent alors à trois types de mesure : i) changement par rapport au témoin non perturbé (Chaer et al., 2009; Griffiths et al., 2000; Kaufman, 1982; Sousa, 1980), ii) différences absolues entre les sols (Orwin & Wardle, 2004) et iii) mesures intégrées (Fujino et al., 2008; O'Neill, 1976; Zhang et al., 2010a). Les indices proposés par Orwin & Wardle (2004) sont particulièrement intéressants, car ils sont bornés entre -1 et +1, ce qui permet la comparaison de différentes études. Il est cependant important de noter que les indices de résilience permettent de voir la capacité de la variable réponse à revenir à son état non perturbé (témoin) suite à l'imposition

du stress. Ainsi, même dans les situations où l'échantillon perturbé n'atteindra jamais le niveau de l'échantillon contrôle (*i.e.* pas de résilience proprement dite), les termes « moins résilient » ou « plus résilient » comme évoqués dans le travail de Orwin & Wardle (2004) sont possibles d'être utilisés pour faire référence à un écart plus ou moins important de l'échantillon perturbé par rapport à l'échantillon témoin non-perturbé. En outre, les indices proposés par Orwin & Wardle (2004) peuvent permettre de calculer une vitesse de récupération des fonctions étudiées.

Tableau 1. Différents indices proposés dans la littérature pour la mesure de la résistance et de la résilience. C, variable mesurée dans le sol témoin (non perturbé) à l'instant 0 (immédiatement après la perturbation) ou au temps x après la perturbation ; D, variable mesurée dans le sol perturbé au temps 0 (immédiatement après la perturbation) ou au temps x après la perturbation ; NC, non calculé (Griffiths & Philippot, 2013).

Resistance	Résilience	Reference
$\frac{D_0}{C_0}$	$\frac{D_x}{C_0}$	Kaufman (1982)
$\frac{D_0}{C_0} \times 100$	$\frac{D_x}{C_0}$	Sousa (1980)
$\left(C_x - \frac{C_x}{D_x}\right) \times 100$	$\left(C_x - \frac{C_x}{D_x}\right) \times 100$	Griffiths et al. (2000)
$\left\ \left(\frac{D_x}{C_x}\right) - 1 \right\ \times 100$	NC	Chaer et al. (2009)
$1 - \left(\frac{2 C_0 - D_0 }{C_0 + C_0 - D_0 }\right)$	$\left(\frac{2 C_0 - D_0 }{ C_0 - D_0 + C_x - D_x }\right) - 1$	Orwin & Wardle (2004)
$\int_0^x f(t) \frac{dt}{x}$	$\int_x^j f(t) \frac{dt}{(j-x)}$	Zhang et al. (2010)
NC	$\sqrt{\sum_{i=1}^n (D_x)^2 / C_x}$	O'Neill (1976)

4.2.3. Résistance et résilience des communautés microbiennes liées aux cycles C et N

Un grand nombre d'études portant sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes du sol face à une perturbation donnée a été effectuée sur des paramètres microbiens en relation avec le cycle de C. Dans plusieurs travaux, les variables-réponse comme la respiration (Bérard et al., 2011; Hamdi et al., 2011; Stres et al., 2010), la biomasse microbienne (Guillot et al., 2019; Saison et al., 2006) ou certaines activités enzymatiques comme la β -glucosidase et la polyphénol-oxydase (Allison et al., 2010) ont été étudiées. La mesure de profils cataboliques, à travers la méthode CLPP (*Community-level physiological profiling*) est également utilisée dans les études de résistance et résilience des microorganismes du sol (Bérard et al., 2012; Brandt et al., 2010). Les perturbations

simulant les événements climatiques extrêmes deviennent de plus en plus courantes dans la littérature. Ainsi, Bérard et al. (2012) ont évalué, sur un sol agricole, l'effet d'une pré-perturbation (*i.e.* sécheresse intense) sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes à une perturbation subséquente combinant sécheresse et haute température. Dans l'étude réalisée par Chaer et al. (2009), la stabilité fonctionnelle d'un sol forestier et d'un sol agricole a été mesurée suite à des « chocs » thermiques allant de 40°C à 70°C. Dans ces études, la respiration du sol, la CLPP et l'activité d'enzymes ont été privilégiés. Chaer et al. (2009) ont observé que leurs sols montraient une résilience similaire en termes de FDA (*Fluorescein Diacetate Hydrolysis*), qui représente un large éventail d'activités enzymatiques (considérées des enzymes « *broad-scale* »), soutenant ainsi le concept de la grande redondance fonctionnelle pour ces activités enzymatiques, ou, une grande diversité d'enzymes du sol exprimant ce type d'activité. En revanche, le sol agricole a présenté une moindre résilience des activités laccase et cellulase (considérées des enzymes « *narrow-niche* »), suggérant une redondance fonctionnelle plus faible des microorganismes impliqués dans ces fonctions plus spécifiques, ou, une diversité relativement limitée des microorganismes capables de produire ces enzymes. Cette étude met ainsi en avant l'importance de considérer des fonctions assurées par un faible nombre d'espèces, comme la nitrification, dans les études portant sur la stabilité fonctionnelle des sols face aux perturbations climatiques actuelles. Or, les travaux portant sur la mesure de paramètres microbiens en lien avec le cycle de N sont moins nombreux que ceux portant sur le cycle de C. Particulièrement, certaines fonctions microbiennes de dénitrification et nitrification sont moins redondantes fonctionnellement, comparativement à des fonctions microbiennes assurées par une très large gamme de microorganismes du sol, comme la décomposition (Chaer et al., 2009; Wertz et al., 2007). Wertz et al. (2007) ont cherché à évaluer la résistance et la résilience de la dénitrification et de la deuxième étape de la nitrification (*i.e.* l'oxydation du nitrite) à un stress thermique (42 °C, 24h), après la manipulation de la diversité de ces communautés via des dilutions successives et réensemencement d'un sol stérile. Bien que la modification de la diversité de chaque communauté de nitrifiants ou des dénitrifiants semblent peu affecter leur résistance et résilience, les nitrifiants sont par contre plus impactés par le stress imposé. La meilleure aptitude des dénitrifiants à résister et être résilient peut être attribuée à la plus grande redondance fonctionnelle des dénitrifiants. D'après Thion & Prosser (2014), les communautés de nitrifiants AOA et AOB assurent l'étape limitante du processus de nitrification (oxydation de l'ammoniac) et peuvent être utilisées comme une guildes fonctionnelle modèle pour évaluer la réponse microbienne au changement climatique. Ainsi, ces derniers auteurs ont évalué la réponse de ces deux communautés nitrifiantes à une perturbation consistant en une séquence sécheresse-ré-humectation d'un sol de prairie habituellement non confronté aux stress hydriques. Ils ont ainsi mis en avant une faible résistance et résilience de ces communautés à la sécheresse en raison de la non-adaptation des sols à ces stress, mais des réponses différentes des AOA

et des AOB face à la perturbation imposée. En effet, les AOA ont été moins résistants et résilients que les AOB. Les auteurs ont suggéré que les meilleures performances en termes de résistance et résilience des AOB pourraient être attribuées à leur meilleure tolérance aux concentrations en ammonium plus élevées retrouvées dans le sol suite à la sécheresse. Plus récemment, la résistance et la résilience lors d'alternances de gel-dégel et d'alternance de températures contrastées (30°C maximum pour un témoin à 15°C) ont été aussi évaluées dans une étude portant sur les processus microbiens liés aux cycles C, N et P (Mooshammer et al., 2017). Ces auteurs ont signalé l'importance d'intégrer les interactions C-N-P des processus microbiens dans les études de stabilité des écosystèmes face aux événements climatiques extrêmes et de l'intérêt de pouvoir transposer ces études aux conditions de terrain.

4.2.4. L'influence de la diversité végétale sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes du sol

Comme évoqué dans la section 3, la diversité végétale est susceptible d'affecter profondément les communautés microbiennes du sol. En outre, la composition des communautés végétales peut affecter des facteurs abiotiques tels que la disponibilité de nutriments et le pH, lesquels sont des drivers de la résistance et de la résilience (Orwin & Wardle, 2005). Ces derniers auteurs signalent qu'il est donc raisonnable d'estimer que la présence de différentes espèces végétales peut entraîner des communautés microbiennes ayant différentes capacités de résistance et de résilience face à des perturbations. Cependant, jusqu'ici, très peu d'études ont été réalisées à propos de l'influence de la diversité végétale sur la stabilité des microorganismes du sol. L'étude menée par Orwin & Wardle (2005) a été l'une des pionnières à ce sujet. Ces auteurs ont ainsi évalué l'effet de la composition et de la richesse végétale (3 espèces prairiales cultivées seules ou en mélange de 2 ou 3) sur la résistance et la résilience de 3 activités microbiennes du sol (respiration basale, respiration induite par substrat – SIR et l'utilisation du glucose) face à un stress d'humectation-sécheresse. Les auteurs ont conclu que la composition ou l'identité des espèces, plutôt que la diversité, ont influencé la résistance et la résilience des activités microbiennes. Dans un système agroforestier méditerranéen associant noyer et pois, Guillot et al. (2019) ont comparé la résistance et la résilience de sols vis à vis de stress hydriques et combinés hydriques/thermiques en étudiant comme variable réponse la biomasse microbienne et la respiration, à partir d'échantillons de sols échantillonnés à différentes distances de la ligne d'arbres et en les comparant avec un témoin agricole conventionnel. Les auteurs ont observé l'effet du gradient spatial sur la résistance et la résilience des microorganismes. Cependant, les sols échantillonnés au milieu de l'interligne cultivée (le plus distant des arbres), ainsi que ceux issus de la parcelle agricole conduite en mode conventionnel, ont présenté la plus grande résistance au stress combiné. Cela a été

attribué à l'adaptation des microorganismes à ces conditions, car issus des sols les plus fréquemment exposés à de telles conditions sur le terrain, dans cette région méditerranéenne propice à un fort ensoleillement et à des conditions extrêmes de température et d'humidité printanière et estivale. Enfin, cette étude a également mis en évidence une grande flexibilité dans les ratios C :N, C :P et N :P de la biomasse microbienne quand les sols ont été uniquement exposés au stress hydrique, tandis que les changements des ratios ont été irréversibles quand les sols ont été exposés au stress combiné hydrique et thermique. Les auteurs ont donc souligné l'importance de la prise en compte de ces ratios stœchiométriques de la biomasse microbienne du sol en tant que proxy de conditions de stress. Tous les résultats exposés dans cette section montrent ainsi des dynamiques microbiennes contrastées dans des systèmes agricoles plus ou moins diversifiés.

5. Objectifs, stratégie de recherche et structure du manuscrit

5.1. Problématique et objectifs de la thèse

L'état de l'art a mis en évidence l'importance des associations céréales-légumineuses dans un contexte d'intensification écologique des agroécosystèmes. Les effets des associations de cultures annuelles sur la composante aérienne (*i.e.* biomasse et rendement) ont été jusqu'ici largement étudiés. Cependant, un intérêt croissant est porté également sur les effets de ces associations sur la composante souterraine (*i.e.* fonctionnement du sol), puisque les sols sont responsables de nombreux processus nécessaires à l'intégrité des écosystèmes. Ce dernier sujet a été pourtant moins exploré et nécessite d'être approfondi. En effet, il existe déjà quelques résultats dans la littérature à propos des impacts des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement des sols, mais ils sont en grande partie accompagnés de nombreuses autres questions qui restent encore à élucider, à savoir :

- i. Les associations céréales-légumineuses sont reconnues pour avoir un effet sur le fonctionnement des sols, notamment en termes chimiques et microbiologiques. **Cependant, en raison des résultats souvent contradictoires, plusieurs études sont encore nécessaires pour mieux appréhender ces effets, notamment en considérant i) différentes espèces et ii) différents types de sols ;**
- ii. Les effets observés des associations céréales-légumineuses en termes de biomasse et rendements sont modulés par la disponibilité en ressources du sol, notamment l'azote minéral. **Cependant, les résultats en termes de nutrition et de son lien à la production végétale restent encore controversés.** En parallèle, au sein de la rhizosphère des espèces associées, les interactions racinaires modulées par des changements de concentration de la ressource azotée affectent des

paramètres chimiques et microbiologiques en lien avec les cycles de C, N et P, **mais peu d'études ont été développées à ce sujet ;**

- iii. Dans les agroécosystèmes, les effets d'héritage à court terme (produits au cours d'un cycle cultural) des cultures annuelles sur les sols sont les facteurs majeurs qui orientent les agriculteurs dans le choix des espèces composant les rotations culturales. **L'intégration partielle ou complète des associations céréales-légumineuses dans les rotations culturales interroge ainsi sur leur effet d'héritage à court terme. Cet effet est fondamental dans un souci de maintenance des rendements des cultures suivantes aux niveaux souhaités par les agriculteurs, tout en préservant la ressource sol et son aptitude à fournir des services écosystémiques. Ainsi, plus d'études sur les effets à court terme des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement du sol s'avèrent nécessaires pour une intégration réussie de cette pratique aux rotations culturales ;**
- iv. Les communautés microbiennes des sols sont responsables de nombreuses fonctions du sol essentielles au fonctionnement des écosystèmes terrestres. Ainsi, dans un contexte de changement climatique et d'augmentation de la fréquence d'évènements extrêmes, il est fondamental d'étudier la réponse des communautés microbiennes des sols face à ces perturbations, en termes de résistance et de résilience. Or, la plupart des études sur le sujet sont basées sur la comparaison i) de différentes natures et durées de stress, ii) de pratiques agricoles ou iii) de sols appartenant à différents écosystèmes (forêt, prairie, agriculture). De plus, les paramètres microbiens évalués dans ces études sont surtout en lien avec le cycle du carbone et peu avec le cycle de l'azote. Les associations céréales-légumineuses sont supposées influencer les communautés microbiennes des sols. **Cependant, à notre connaissance aucune étude s'est intéressée à relier les effets des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement microbien du sol en termes de résistance et de résilience face à des perturbations environnementales. Enfin, il serait également intéressant de chercher à savoir si i) ces effets pourraient être perceptibles à court terme et ii) sur des paramètres microbiens liés au cycle de N, encore peu explorés dans ce contexte.**

L'objectif général de la thèse a donc été d'évaluer les effets d'une association céréale-légumineuse sur le fonctionnement du sol à court terme (au cours et consécutivement à un cycle de culture), en ciblant des paramètres en relation avec les cycles de C, N et P. L'hypothèse générale est que l'association céréale-légumineuse est capable, comparativement aux cultures mono-spécifiques, d'affecter différemment le fonctionnement du sol via des processus rhizosphériques au cours d'un cycle de culture.

Cette hypothèse générale a été déclinée en deux sous-hypothèses (Figure 8):

1. Au cours d'un cycle de culture, nous supposons qu'un gradient de N minéral dans le sol modulera les interactions rhizosphériques entre les deux espèces en association. Par conséquent, nous nous attendons à ce que les effets de l'association céréale-légumineuse sur des paramètres chimiques et microbiologiques du sol liés aux cycles de C, N et P soient différents en fonction du niveau de N et également par rapport aux cultures mono-spécifiques.
2. L'héritage produit à court terme par l'association céréale-légumineuse sur les communautés microbiennes du sol aura également une conséquence sur la résistance et la résilience de quelques paramètres microbiens en lien avec les cycles de C et N, face à une perturbation environnementale. Nous supposons ainsi que cet effet sera différent de celui exercé par les cultures mono-spécifiques.

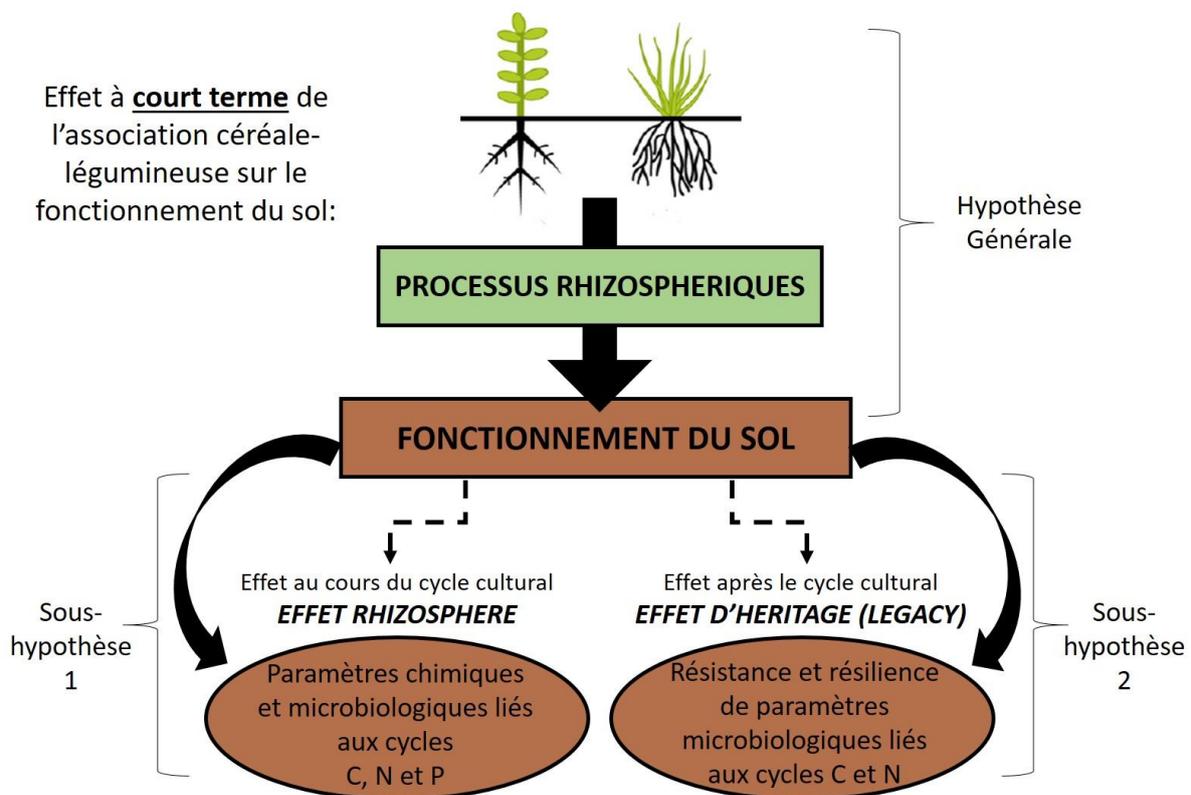


Figure 8. Représentation schématique des hypothèses de la thèse.

5.2. Stratégie de recherche

La stratégie adoptée a été essentiellement expérimentale, au moyen de deux expériences conduites en conditions contrôlées permettant de tester les deux sous-hypothèses de la thèse (Figure 9).

5.2.1. Le choix du sol

Le sol choisi pour la mise en place des deux expériences détaillées plus bas a été un sol Méditerranéen originaire du sud de la France. Ce sol présente la particularité de n'avoir jamais été en contact avec des associations céréales-légumineuses auparavant (avant son échantillonnage), tout en ayant fait l'objet depuis d'une étude au champ mettant en évidence des effets rhizosphères originaux de telles associations (Tang et al., 2014). De plus, ce sol présentait la particularité d'avoir une teneur en calcaire assez élevée (53 g kg⁻¹ de CaCO₃ ; pH_{eau} 8,2). Cette caractéristique inhérente confère aux sols de ce type un pouvoir tampon assez important face aux modifications qui peuvent y avoir lieu en conséquence de pratiques agricoles (Salomé et al., 2016), comme les cultures associées. Ainsi, l'évaluation des effets potentiels des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement d'un sol avec de telles caractéristiques inhérentes s'est montré intéressant pour cette thèse, au vu des besoins identifiés au début de cette section (« ... pour mieux appréhender ces effets, notamment en considérant i) différentes cultures et **ii) différents types de sols** »), en termes d'études supplémentaires à ce sujet.

5.2.2. Le choix des espèces

Notre modèle biologique a été l'association blé tendre (*Triticum aestivum*, variété Lennox – Saaten-Union) et lupin blanc (*Lupinus albus*, variété Feodora – Jouffray-Drillaud), toutes les deux des variétés de printemps qui avaient fait l'objet d'une expérience préliminaire encourageante sur des sols au niveau de phosphore contrastés (Boudsocq et al., en préparation). Bien que l'association blé-lupin blanc ne soit pas pleinement répandue en Europe, ce modèle biologique a été choisi en raison de la capacité du lupin i) à fixer l'azote atmosphérique à travers la symbiose rhizobienne commune chez les légumineuses et ii) à exsuder de larges quantités d'acides organiques via ses racines en « cluster », comparativement aux céréales et même à d'autres légumineuses, et mobilisant ainsi plus efficacement le P peu disponible du sol (Hinsinger, 2001; Watt & Evans, 2003).

5.2.3. Les expériences conduites

Une première expérience (Expérience 1) a été menée en serre, avec les espèces cultivées en cultures pures (mono-spécifiques) ou associée, et en utilisant un gradient de N dans le sol pour pouvoir manipuler les interactions entre les plantes et, par conséquent, les effets produits en termes de biomasse végétale et sur plusieurs paramètres chimiques et microbiologiques du sol au niveau de la rhizosphère. Le gradient de N a été créé via une solution à base d'urée enrichie en isotope ¹⁵N. Cette forme ammoniacale d'azote a été privilégiée afin i) d'éviter une éventuelle inhibition de la fixation de

N₂ atmosphérique par un excès de nitrate chez le lupin et ii) de favoriser davantage la nitrification dans les sols, contrairement à ce qui pourrait se passer avec la forme nitrique. En outre, le marquage de l'urée en ¹⁵N a été réalisé pour permettre i) une mesure plus aisée de la concentration en ¹⁵N dans les tissus végétaux via la spectrométrie de masse, et ii) l'utilisation de la méthode de dilution isotopique pour les calculs de %Ndfa chez le lupin. Les échantillons de plante et de sol permettant la mesure de toutes les variables nécessaires à la vérification de la première sous-hypothèse de la thèse ont été récoltés au stade floraison (Figure 9), puisqu'il est admis qu'à ce stade i) les plantes atteignent un métabolisme maximal, notamment en termes de fixation de N₂, et ii) les associations sont censées avoir l'effet le plus prononcé sur les communautés microbiennes du sol (Song et al., 2007b). Ensuite, l'Expérience 1 a été menée jusqu'à la maturation finale des cultures et les sols récupérés à ce stade ont ainsi servi à la conduite de la deuxième expérience de la thèse (Expérience 2).

L'Expérience 2 a été conçue afin de vérifier la deuxième sous-hypothèse de la thèse. Seuls les sols ayant reçu le traitement d'azote le plus faible lors de l'Expérience 1 ont été retenus pour cette expérience, puisque les interactions les plus fortes entre les plantes ont été initialement supposées avoir lieu à ce niveau de N. Ainsi, pour pouvoir évaluer l'effet *Short-term Plant Legacy*, i.e. héritage à court terme, de l'association blé-lupin sur la résistance et la résilience de certaines activités microbiennes, les sols de l'Expérience 1 ont été incubés pendant 28 jours à 28°C après avoir été exposés (sols perturbés) ou non (sols témoins) à un stress thermique de 48°C pendant 2 jours. Contrairement à d'autres études s'intéressant aux impacts des perturbations de type vagues de chaleur sur les microorganismes du sol (Bérard et al., 2011; Guillot et al., 2019), seul un épisode de stress thermique a été choisi comme modalité de stress pour notre étude. Cela est attribué à notre souhait d'étudier une activité microbienne encore peu explorée dans des études similaires, la nitrification. De ce fait, en plus des deux activités microbiennes liées au cycle de C choisies pour cette étude (*Basal Respiration – BR* et *Substrate-Induced Respiration – SIR*), nous avons également choisi d'étudier la nitrification via la mesure NEA (*Nitrification Enzyme Activity*), puisqu'il s'agit d'un processus carrefour essentiel au cycle de N. En effet, la nitrification relie la décomposition de la matière organique à la dénitrification, en complétant ainsi le cycle de N (Robertson & Groffman, 2015; Ward, 2013). De ce fait, le choix de la perturbation thermique unique (et non combinée à un stress hydrique) permettrait de s'affranchir de la combinaison de facteurs pouvant complexifier l'observation de la réponse d'une variable encore peu étudiée dans le contexte de notre étude. Enfin, au cours de l'incubation, la résistance et la résilience des activités de respiration (réelle et potentielle) et de nitrification potentielle ont été mesurées à travers i) des pourcentages de changement par rapport aux témoins (Bérard et al., 2011; Chaer et al., 2009), qui permettent d'avoir une vue aisée de la dynamique de retour à l'état non perturbé (témoin) des échantillons perturbés au cours du temps, et ii) des indices proposés par Orwin & Wardle (2004), qui consistent en l'obtention de valeurs comprises entre -1 et

+1, et qui présentent l'avantage d'être d'interprétation simple et facilement applicables à notre jeu de données.

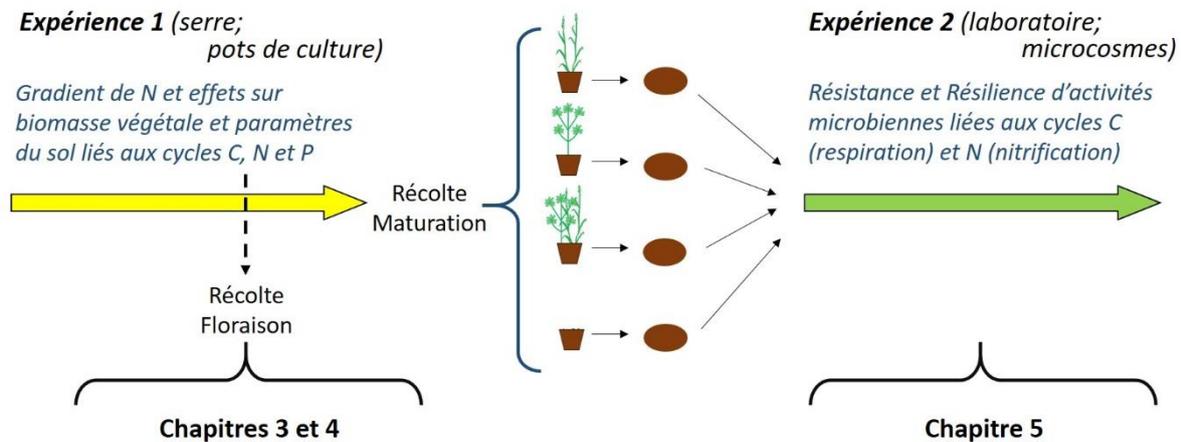


Figure 9. Schéma synthétisant la stratégie expérimentale de la thèse et les expériences ayant donné origine aux trois articles correspondant aux chapitres 3, 4 et 5 de la thèse.

5.3. Structure du manuscrit

A la suite de ce premier chapitre, le manuscrit de thèse s'articule autour de 4 autres chapitres, à savoir :

- CHAPITRE 2 : Matériel et Méthodes général de la thèse, comprenant les détails du sol étudié (origine, échantillonnage et propriétés) et de l'ensemble des expériences réalisées
- CHAPITRE 3 : Article en préparation pour la revue *Biology and Fertility of Soils*, comprenant les résultats de l'Expérience 1 obtenus au stade floraison, concernant toutes les variables en lien avec les cycles de N et P mesurées sur les compartiments plante et sol. Titre de l'article : **Soil rhizosphere functioning in a cereal-legume intercrop under a soil N mineral gradient**
- CHAPITRE 4 : Article en préparation pour la revue *Plant Physiology and Biochemistry* en format *short-communication*, comprenant les résultats de l'Expérience 1 (floraison) qui concernent seulement les données de nutrition des plantes pour des éléments majeurs autres que N et P. Titre de l'article : **Improved acquisition of potassium, calcium, magnesium and sulfur in wheat intercropped with white lupin as affected by nitrogen availability**
- CHAPITRE 5 : Article publié dans la revue *Ecological Indicators*, comprenant les résultats de l'Expérience 2. Titre de l'article : **Short-term plant legacy alters the resistance and resilience of soil microbial communities exposed to heat disturbance in a Mediterranean calcareous soil**

Ces 4 chapitres seront suivis d'une discussion générale et des conclusions de la thèse.

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

1. Origine et description du sol d'étude

Le sol d'étude provient d'une parcelle de 1,3 ha insérée dans une plateforme expérimentale de 20 ha dénommée 'Plateau OC' (Plateforme Organique/Conventionnel). Cette plateforme appartient à l'Unité Expérimentale INRA DiaScope située à Mauguio (département de l'Hérault), au sud de Montpellier (coordonnées : 3°59'6"E, 43°37'13"N) (Figure 10). Le sol de la zone est caractérisé comme un sol brun calcaire sur molasses (Aholoukpe, 2009), de texture limoneuse. Le climat régional est typiquement méditerranéen, avec des sols subissant régulièrement, en surface, des cycles de séchage et réhumectation en raison de la répartition irrégulière des pluies (Tang et al., 2014). Les moyennes de température et de pluviométrie dans la région entre 1988-2008 (avant l'échantillonnage du sol) sont représentées sur la Figure 11.

Ayant toujours été cultivée de manière conventionnelle avant l'échantillonnage, la parcelle d'étude (1,3 ha) a reçu, entre 2005 et 2008, les cultures suivantes : blé dur – colza – blé dur – pois. Une conversion en agriculture biologique a été initiée en 2009 sur la moitié sud du Plateau OC (environ 10 ha), en incluant ainsi la parcelle d'étude. En septembre 2008, avant la conversion en agriculture biologique, une grande campagne d'échantillonnage du sol de la parcelle de 1,3 ha a été réalisée : 6 m³ de sol ont été prélevés à une profondeur de 0-15 cm sur 15 points correspondant au croisement de trois lignes dans le sens de la longueur de la parcelle, et cinq lignes dans le sens de sa largeur (Figure 10). Le sol a été aussitôt tamisé sur place avec une maille de 1 cm et une partie a été conditionnée dans des containers fermés (1,20m X 1,00m X 0,78m) et stockée à température ambiante avant d'être utilisé pour cette thèse. Les résultats des analyses physico-chimiques réalisées sur ce sol avant la mise en place de l'Expérience 1 (voir section suivante) de la thèse sont présentés dans le Tableau 2.



Figure 10. Localisation de la parcelle d'étude et indication approximative des points de prélèvements du sol.

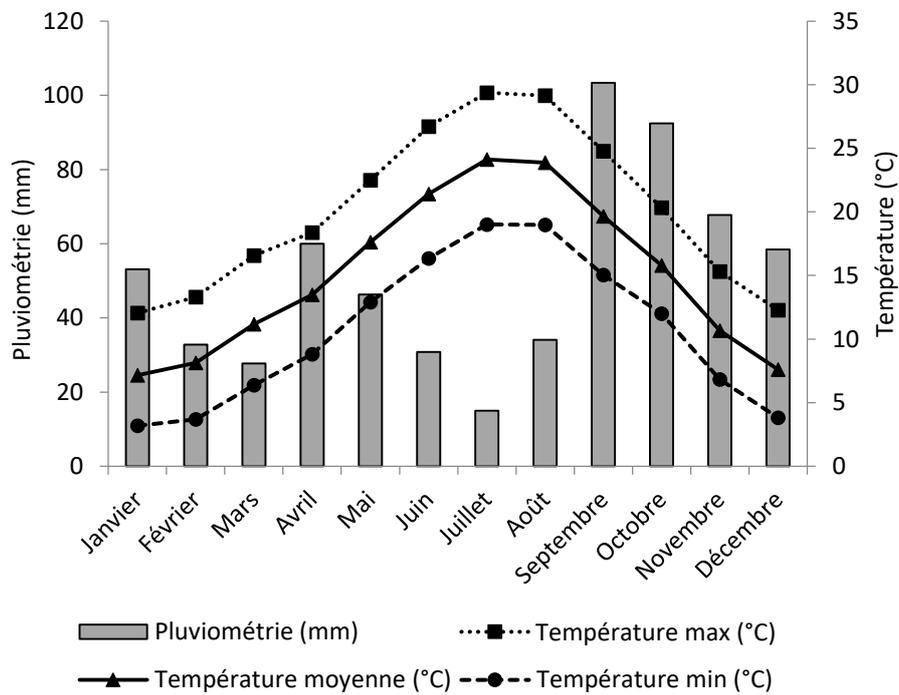


Figure 11. Moyennes mensuelles de pluviométrie et de température de Muguio entre 1988 et 2008 (avant l'échantillonnage du sol).

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques du sol d'étude avant expérimentation.

Paramètre	Méthode	Résultat
Argile	NF X 31-107 (avec décarbonatation)	309 g kg ⁻¹
Limon fin	NF X 31-107 (avec décarbonatation)	158 g kg ⁻¹
Limon grossier	NF X 31-107 (avec décarbonatation)	215 g kg ⁻¹
Sable fin	NF X 31-107 (avec décarbonatation)	156 g kg ⁻¹
Sable grossier	NF X 31-107 (avec décarbonatation)	104 g kg ⁻¹
Argile	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	294 g kg ⁻¹
Limon fin	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	200 g kg ⁻¹
Limon grossier	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	233 g kg ⁻¹
Sable fin	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	156 g kg ⁻¹
Sable grossier	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	118 g kg ⁻¹
CaCO ₃ total	NF ISO 10693	53 g kg ⁻¹
CaCO ₃ actif	NF X 31-106	26 g kg ⁻¹
C organique	NF ISO 14235	10,3 g kg ⁻¹
N total	NF ISO 13878	1,01 g kg ⁻¹
Rapport C/N	-	10
CEC Metson	NF X 31-130	15,9 cmol ⁺ kg ⁻¹
CEC Cobaltihexammine	NF ISO 23470	18,9 cmol ⁺ kg ⁻¹
pH H ₂ O	NF ISO 10390	8,2
pH KCl	NF ISO 10390	7,5
P ₂ O ₅ Olsen	NF ISO 11263	0,084 g kg ⁻¹
P total	NF X 31-147	0,55 g kg ⁻¹
N-NH ₄	NF ISO 14256-2	19 mg kg ⁻¹
N-NO ₃	NF ISO 14256-2	45 mg kg ⁻¹
K ₂ O échangeable	NF X 31-108	0,46 g kg ⁻¹
MgO échangeable	NF X 31-108	0,2 g kg ⁻¹
CaO échangeable	NF X 31-108	12,1 g kg ⁻¹
Na ₂ O échangeable	NF X 31-108	0,036 g kg ⁻¹
C microbien	Fumigation/extraction	23 mg kg ⁻¹

Analyses réalisées par le laboratoire SadeF - Pôle d'Aspach (www.sadef.fr)

2. Expérience 1 : conduite d'un cycle de culture associée en conditions contrôlées

2.1. Présentation générale du dispositif expérimental

Cette première expérience a été conduite de septembre à décembre 2017, dans la serre de phénotypage du CMI – Centre Mondial de l'Innovation – Groupe Roullier à Saint-Malo. Nous avons mis en place 3 modalités de culture notées **W** – culture mono-spécifique de blé (*wheat*) ; **L** – culture mono-spécifique de lupin (*white lupin*) ; et **WL** – association des deux espèces (*wheat + lupin*) croisées avec 3 traitements correspondant à 3 doses d'azote (**N1**, **N2**, **N3**) appliqués dans le sol sous la forme d'urée. Les combinaisons résultantes ont été répétées 7 fois aux 2 dates d'échantillonnage (floraison et maturité) (Figure 12). Pour la modalité de sol témoin sans plante (**U** – *unplanted soil*), 3 répétitions ont été faites, pour chaque traitement azoté et à chaque date d'échantillonnage. Nous avons donc au total 144 pots ou unités expérimentales. Les pots ont été distribués sur 6 lignes de cultures de la serre de phénotypage, dont 3 lignes correspondant aux pots à récolter à la floraison et 3 lignes correspondant à ceux à récolter à maturité (Figure 13). Les pots au sein de chaque groupe de 3 lignes ont été disposés de manière complètement aléatoire.

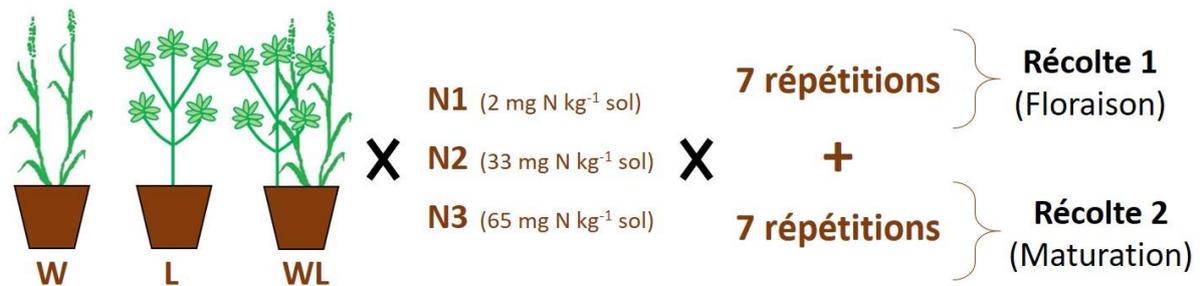


Figure 12. Schéma synthétique du dispositif expérimental de l'Expérience 1.

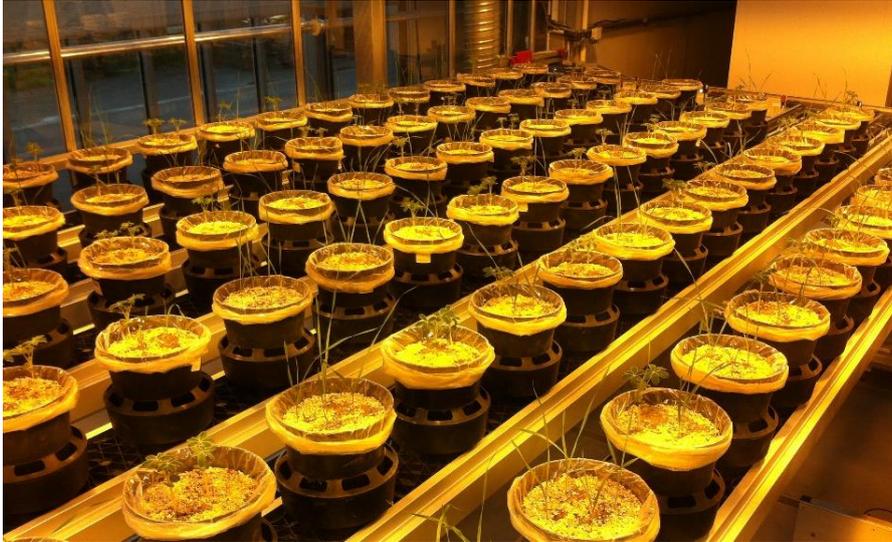


Figure 13. Disposition des pots dans la serre de phénotypage du CMI (Roullier) au début de l'Expérience 1.

2.2. Mise en place et suivi de l'expérience

Le sol d'étude a été tamisé à 4 mm avant d'être conditionné dans des pots de 4 dm³ (20,5 cm de diamètre et 16,5 cm de hauteur) avec fond scellé pour éviter toute perte d'eau et d'éléments minéraux pendant l'expérience. Le sol a été mélangé avec de la perlite à un ratio 50:50 (en termes de volume) afin d'obtenir un substrat final plus propice au développement des racines, soit 2 kg de sol et 0,2 kg de perlite, mélangés de manière homogène. Les caractéristiques physico-chimiques du mélange final sol + perlite sont présentées dans le Tableau 3. La capacité de rétention d'eau ou WHC (*Water Holding Capacity*) (pF 2) a été mesurée par la méthode NF ISO 11274 et évaluée à 28%.

La densité de plantes par pot a été déterminée sur la base d'un design substitutif (Tang et al., 2014), afin d'avoir une équivalence approximative en biomasse entre les deux espèces végétales. Ainsi, il a été estimé qu'une plante de lupin équivaut à environ deux plantes de blé en termes de biomasse totale. Les densités fixées pour le blé et le lupin cultivés seuls ont été de 4 et 2 plantes par pot, respectivement, tandis que pour l'association la densité de chaque espèce a été la moitié de celle en culture mono-spécifique, à savoir 2 et 1 plante(s) par pot, respectivement.

Avant le semis, les graines de lupin ont été stérilisées à l'hypochlorite de calcium à 3% (10 min de contact). Afin de garantir la germination du nombre d'individus souhaité par pot, 3 graines par individu ont été déposées au moment du semis pour les deux espèces. Les graines de blé et de lupin ont été enfoncées dans le sol à une profondeur de 2 cm et, dans le cas du lupin, 1 cm³ d'une solution d'eau osmosée contenant 10⁷ UFC/ml de la souche *Bradyrhizobium lupini* LL13 (produite par l'INRA de Dijon) a été déposée au-dessus de la graine. Pour chaque modalité de culture, les graines ont été disposées d'une manière à assurer la distribution la plus équidistante possible entre les individus au

sein du pot. Six jours après le semis, un éclaircissement des plants a été réalisé afin de maintenir la densité souhaitée au départ.

L'urée enrichie en isotope ^{15}N à 3% a été apportée en solution avec de l'eau osmosée, 13 jours après le semis. La méthode d'application a consisté en 10 cm^3 de solution distribuée uniformément avec une pipette à la surface du sol, suivi d'un arrosage avec un volume plus important d'eau (environ 300 cm^3) afin de limiter les pertes de N par volatilisation sous forme d'ammoniac – NH_3 (Le Cadre, 2004). Ainsi, trois solutions d'urée ont été préparées pour les modalités N1, N2 et N3, à partir du mélange d'urée constituée entièrement de ^{14}N et d'urée contenant 10% de l'isotope stable ^{15}N . Ces solutions ont été préparées de sorte à avoir, par volume de 10 cm^3 , la quantité totale de N souhaitée par pot en fonction du traitement. Ainsi, étant donnée les doses de N à apporter pour les différents traitements (2, 33 et 65 mg N par kg de substrat, pour N1, N2 et N3 respectivement), les quantités totales de N appliquées par pot (contenant 2,2 kg de substrat) ont été donc de 4,4 (N1), 73,7 (N2) et 142,9 (N3) mg d'azote. Le niveau N1 a été choisi pour avoir un marquage minimal en ^{15}N pour cette modalité, mais en raison des quantités infimes de N apportées à ce traitement, il pourrait être considéré comme un témoin non fertilisé.

Les pots ont été arrosés quotidiennement (avec de l'eau osmosée) via le système d'arrosage automatique de la serre du CMI, par pesée et comparaison avec un poids objectif fixé par l'expérimentateur, en vue de maintenir l'humidité du sol autour de 75% de la WHC.

Une solution de KCl (à une concentration de 200 mg de K par pot) a été appliquée sur l'ensemble des pots 3 jours avant la première récolte, avec une ré-application au moment de la première récolte seulement sur les pots qui seraient conduits jusqu'à maturité. Des contrôles biologiques réguliers ont été également réalisés contre les thrips et les mouches du terreau au travers des lâchers d'insectes prédateurs appartenant aux espèces *Orius laevigatus* et *Atheta coriaria*. Pendant la période de l'expérience, les conditions climatiques de la serre ont été les suivantes : température moyenne journalière de $22,7 \pm 2,1^\circ\text{C}$ et éclairage moyen de $200\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ pour une photopériode de 16 heures.

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques du mélange sol + perlite avant la mise en place de l'Expérience 1.

Paramètre	Méthode	Résultat
Argile	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	202 g kg ⁻¹
Limon fin	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	240 g kg ⁻¹
Limon grossier	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	214 g kg ⁻¹
Sable fin	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	161 g kg ⁻¹
Sable grossier	NF X 31-107 (sans décarbonatation)	182 g kg ⁻¹
CaCO ₃ total	NF ISO 10693	39 g kg ⁻¹
CaCO ₃ actif	NF X 31-106	23 g kg ⁻¹
C organique	NF ISO 14235	10,4 g kg ⁻¹
N total	NF ISO 13878	0,95 g kg ⁻¹
Rapport C/N	-	10
CEC Metson	NF X 31-130	15 cmol _c kg ⁻¹
CEC Cobalthexammine	NF ISO 23470	16,1 cmol _c kg ⁻¹
pH H ₂ O	NF ISO 10390	8,3
pH KCl	NF ISO 10390	7,6
P ₂ O ₅ Olsen	NF ISO 11263	0,079 g kg ⁻¹
P total	NF X 31-147	0,52 g kg ⁻¹
N-NH ₄	NF ISO 14256-2	20 mg kg ⁻¹
N-NO ₃	NF ISO 14256-2	39 mg kg ⁻¹
K ₂ O échangeable	NF X 31-108	0,41 g kg ⁻¹
MgO échangeable	NF X 31-108	0,2 g kg ⁻¹
CaO échangeable	NF X 31-108	12,2 g kg ⁻¹
Na ₂ O échangeable	NF X 31-108	0,067 g kg ⁻¹
C microbien	Fumigation/extraction	8,6 mg kg ⁻¹

Analyses réalisées par le laboratoire SadeF - Pôle d'Aspach (www.sadef.fr)

2.3. Récolte 1 : Stade Floraison

Une première récolte a été réalisée 2 mois après le semis, lorsque la plupart des individus des deux espèces se retrouvait au stade de pleine floraison (Figure 14). Des tests préliminaires ont permis de trouver l'humidité optimale pour l'échantillonnage du sol rhizosphérique, soit environ 45% de la WHC. Afin de permettre aux sols des pots d'atteindre cette humidité, le système d'arrosage automatique de la serre a été stoppé 30 heures avant la récolte.

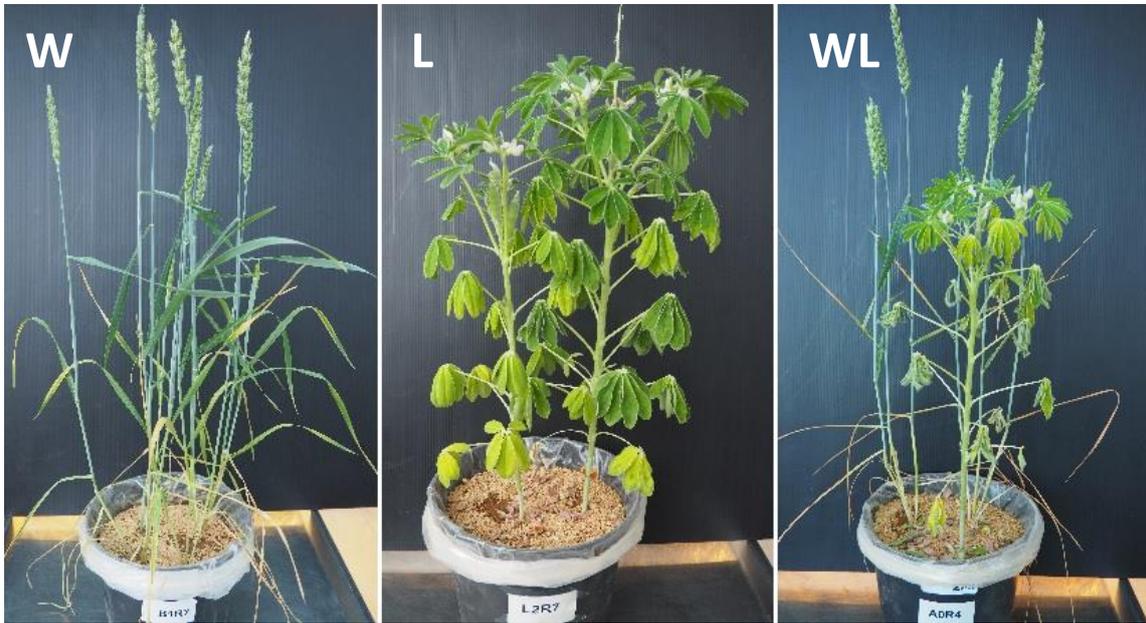


Figure 14. Les différentes modalités de culture au moment de la récolte 1 (stade floraison) de l'Expérience 1.



Figure 15. Sol rhizosphérique autour du système racinaire du lupin blanc.

2.3.1. Échantillonnage du sol et analyses réalisées

Le sol rhizosphérique a été considéré comme la fine couche de sol (< 3 mm, pour la mesure des paramètres en lien avec les nutriments N et P (Betencourt et al., 2012; Tang et al., 2014) persistant autour des racines après i) émiettement à la main de la motte les entourant et ii) secouage léger de la masse de sol restant sur les racines (Figure 15). Le volume de sol restant après échantillonnage du sol rhizosphérique a été aussi échantillonné. Des échantillons ont été également prélevés à partir des pots témoins sans plantes (sol considéré comme non rhizosphérique (*bulk soil*) – Chapitre 3), après mélange de l'ensemble du sol de chaque pot afin d'obtenir un échantillon homogène et représentatif de la totalité du pot. Les échantillons de sol rhizosphérique et bulk collectés après cette première étape ont été ensuite sous-échantillonnés au laboratoire de la manière suivante : 10 g pour la mesure de l'humidité pondérale, 10 g pour la mesure de l'azote minéral (N-NH₄ et N-NO₃), 500 mg pour les extractions d'ADN et réalisation des PCR quantitatives des gènes d'intérêt (16S, 18S, AOA et AOB), et 5 g X 4 pour les analyses de biomasse microbienne (*i.e.* échantillons pour la fumigation (5 g) ou non (5 g), pour la détermination de C et N d'une part, ainsi que de P de la biomasse microbienne, d'autre part). D'autres sous-échantillons de masse indéfinie ont été aussi conditionnés dans des petits contenants en plastique et stockés soit à -20°C, pour des analyses ultérieures d'activité enzymatique (phosphatases), soit à l'air ambiant pour séchage doux et mesure du pH. Pour les échantillons destinés à la mesure des phosphatases, le choix de la température de conservation (-20°C) a été fait en accord avec Kandeler (2007), pour des périodes de stockage supérieures à 3 semaines. Les échantillons destinés aux mesures de C, N et P de la biomasse microbienne et ceux ayant servi à la détermination de l'azote minéral ont été conservés à 4°C et -20°C, respectivement, et analysés 1 semaine après l'échantillonnage. La détermination de l'humidité pondérale des sols a été réalisée après séchage des échantillons pendant 48 heures à 105°C. La méthodologie utilisée pour chaque analyse est détaillée ci-après.

2.3.1.1. Azote minéral

La mesure de la concentration en nitrate (N-NO₃) et en ammonium (N-NH₄) dans le sol a été réalisée à l'UMR SAS selon la méthode ISO 14256-2 :2005. Après décongélation douce à l'air ambiant, les échantillons de 10 g de sol ont été extraits avec 20 cm³ de KCl 1M (rapport sol : extractant de 1 : 2) et ensuite agités à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 30 min à 140 tours par minute. Après 30 min de repos, le surnageant a été prélevé et filtré à 0,45 µm. Les concentrations en N-NO₃ et N-NH₄ dans les filtrats ont été mesurées avec un analyseur séquentiel (AQ2, SEAL Analytical, UK). Les résultats ont été exprimés en mg N-(NH₄ ou NO₃) kg⁻¹ de sol sec.

2.3.1.2. pH

Le pH du sol a été mesuré à l'UMR SAS selon la méthode ISO 10390 :2005. Brièvement, 2 g de sol séché à l'air ont été mis en contact avec 10 cm³ d'eau ultra pure (rapport sol : extractant de 1 : 5). L'ensemble a été agité pendant 60 min dans un agitateur rotatif et laissé reposer pendant 30 min. Ensuite, le mélange a été remis en agitation pendant 5 min, suivi d'une dernière phase de repos de 30 min. La mesure du pH a été effectuée sous agitation magnétique continue à l'aide d'une électrode pH modèle SenTix 41 et d'un pH-mètre modèle pH 330 (marque WTW).

2.3.1.3. C, N et P de la biomasse microbienne

Les mesures de MBC, MBN et MBP (*Microbial Biomass Carbon*, *Microbial Biomass Nitrogen* et *Microbial Biomass Phosphorus*) ont été effectuées à l'UMR Eco&Sols via la technique de fumigation-extraction (Vance et al., 1987). Cette technique consiste à quantifier le contenu en C, N ou P de la biomasse microbienne du sol une fois que celui-ci a été mis en contact avec des vapeurs de trichlorométhane (chloroforme). Le calcul se fait par la différence entre le dosage de C, N ou P obtenu sur des échantillons ayant subi ou non la fumigation (F et NF, respectivement). Ainsi, les 5 g de sol (échantillons F) préalablement pesés et conservés au réfrigérateur ont été placés dans une étuve contenant du chloroforme (100 cm³ préalablement lavé à l'eau déminéralisée) pour conduire la fumigation sous vide pendant 24 heures. Les échantillons F ont été ensuite récupérés et extraits en même temps que les échantillons NF, en présence de 25 cm³ de K₂SO₄ 0,025 M (rapport sol : extractant de 1 : 5) pour la détermination de MBC et MBN, et en présence de 100 cm³ de NaHCO₃ 0,5 M (rapport sol : extractant de 1 : 20, d'après la méthode Olsen (Olsen, 1954)) pour la détermination de MBP. Les extraits ont été agités pendant 45 min (pour C et N) ou 30 min (pour P) et ensuite centrifugés pendant 10 min à 4000 tours par minute. Le surnageant a été récupéré et filtré à 0,45 µm. Les concentrations de C et N dans les filtrats ont été mesurées par un analyseur TOC/TN (modèle ASI-V, TOC-Vcsh, TNM-1, Shimadzu, Japon). Pour le dosage de P, 3 cm³ de filtrat ont été utilisés pour une attaque acide sous hotte avec 100 mm³ de HCl 37%. Après un dégazage de 2 heures, le P a été dosé sur les filtrats par colorimétrie (à 630 nm) via la méthode du vert de malachite (Ohno & Zibilske, 1991). Les valeurs de C, N et P de la biomasse microbienne ont été finalement obtenues par la soustraction des concentrations en C, N et P des échantillons NF et F. Un coefficient de correction (0,45 pour C et N, et 0,4 pour P) a été appliqué pour obtenir les valeurs finales de MBC, MBN et MBP, en conformité avec la littérature (Jenkinson et al., 2004). Ces valeurs finales ont été exprimées en mg kg⁻¹ de sol sec.

Les concentrations en C obtenues pour les échantillons qui n'ont pas subi de fumigation ont été utilisées en tant que valeurs de Carbone Organique Dissous (ou DOC – Dissolved Organic Carbon),

tandis que les concentrations en P des échantillons NF ont été retenues comme valeurs de P inorganique du sol selon la méthode Olsen.

2.3.1.4. Activités phosphatases

L'activité des phosphatases acide et alcaline dans les échantillons de sol a été mesurée au CMI – Roullier selon la méthode proposée par Tabatabai & Bremner (1969). Le principe repose sur la mesure, par colorimétrie, de la concentration du produit (*p-nitrophenol* ou pNP) de l'hydrolyse du substrat *p-nitrophenyl phosphate* (pNPP) par les phosphatases du sol, dans des conditions optimales de pH et de température. Pour ce faire, deux solutions tampon 'MUB' (*Modified Universal Buffer*) ont été initialement préparées, une à pH 6,5 pour l'analyse des phosphatases acides, et une à pH 11 pour la mesure de l'activité des phosphatases alcalines. Ensuite, 1 g des échantillons de sol conservés au congélateur a été pesé directement dans les tubes (15 cm³) servant à la suite de l'analyse. Dans ces tubes, 0,2 cm³ de toluène a été ajouté et le tout (1 g de sol + toluène) a été laissé reposer pendant 15 min. Ensuite, 4 cm³ du tampon MUB correspondant (acide ou alcalin) a été additionné, suivi de 1 cm³ du substrat pNPP (à 50 mM) nécessaire à la réaction des phosphatases. Après cette période de repos, les tubes ont été légèrement agités (à l'aide d'un vortex) et tout de suite mis dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure. La réaction a été stoppée via l'ajout de 1 cm³ de CaCl₂ à 0,5 M et de 4 cm³ de NaOH à 1M. Les échantillons ont été ensuite ré-agités (vortex) et centrifugés à 4000 tours par minute pendant 5 min, avant récupération du surnageant et transfert en microplaques pour l'analyse colorimétrique. La mesure de la concentration du pNP dans les extraits a été effectuée à 415 nm à l'aide d'un spectromètre UV-Vis-Fluo (SpectraMax, Molecular Devices, USA). Les résultats d'activité des phosphatases (acide ou alcaline) ont été exprimés en mg de pNPP hydrolysés h⁻¹ g⁻¹ de sol sec.

2.3.1.5. Extraction d'ADN et qPCR des gènes 16S, 18S, AOA et AOB

Ces analyses ont été réalisées à l'UMR Eco&Sols (extraction d'ADN et qPCR des gènes 16S et 18S) et au CMI – Roullier (qPCR des gènes AOA et AOB). Afin de procéder à la quantification des gènes d'intérêt de la présente étude, l'extraction de l'ADN génomique des échantillons de sol (500 mg) conservés à -20°C a été réalisée selon la méthode proposée par Tournier et al. (2015) (Figure 16). Une étape de lavage des échantillons avec de la guanidine thiocyanate 5,5 M a été rajoutée au protocole (étape 17 de la Figure 16) afin d'éliminer les acides humiques potentiellement présents dans les particules de sol. Ces acides sont susceptibles d'inhiber la réaction en chaîne par polymérase (qPCR) nécessaire à l'amplification des gènes. A la suite de l'extraction, la qualité des extraits a été vérifiée sur gel d'agarose (1%) et la quantification de l'ADN a été effectuée par fluorimétrie via la méthode du

PicoGreen. Les paires d'amorces (ou '*primers*') utilisées pour la réalisation des qPCR sur les gènes 16S, 18S, AOA et AOB, ont été les suivantes, dans l'ordre respectif : 341F et 515R (López-Gutiérrez et al., 2004), FR1 et FR390 (Vainio & Hantula, 2000), Arch-amoAF et Arch-amoAR (Francis et al., 2005), et amoA1F et amoA2R (Rotthauwe et al., 1997). Le volume final (10 mm^3) du mélange réactionnel nécessaire à la qPCR, déposé dans chacun des puits des microplaques, a été composé par 2 mm^3 d'extrait d'ADN (à une concentration de 5 ng mm^{-3}), 5 mm^3 du mix Sso Advanced BioRad, 2 mm^3 d'eau de grade moléculaire et $0,5 \text{ mm}^3$ de chaque amorce. Les cycles de qPCR ont été réalisés avec un thermocycleur en temps réel modèle CFX96 (pour les gènes 16S et 18S) ou CFX384 (pour les gènes AOA et AOB), tous les deux de la marque BioRad (Hercules, CA, USA). Pour 16S et 18S, les cycles ont consisté en une phase initiale (2 min à 98°C) de dénaturation de l'ADN et d'activation enzymatique de haute efficacité, suivie de 39 cycles de PCR réalisés comme suit : 5 s à 98°C , puis 30 s à 60°C (pour 16S) ou à 58°C (pour 18S), et 30 s à 72°C . Pour AOA et AOB, les cycles ont débuté avec une phase initiale de dénaturation de l'ADN et d'activation enzymatique de 5 min à 95°C , suivie de 40 cycles de PCR déroulés de la façon suivante : 45 s à 95°C , puis 30 s à 55°C (pour AOA) ou à 56°C (pour AOB) et, finalement, 30 s à 72°C . Les courbes standards ont été obtenues par des dilutions en série de plasmides contenant des fragments clonés des gènes d'intérêt. Pour tous les gènes quantifiés les courbes standards étaient bien linéaires ($R^2 > 0,995$) et l'efficacité d'amplification n'a pas été inférieure à 90%. Les résultats d'abondance des différents gènes ont été exprimés en nombre (nb) de copies du gène d'intérêt par gramme de sol.

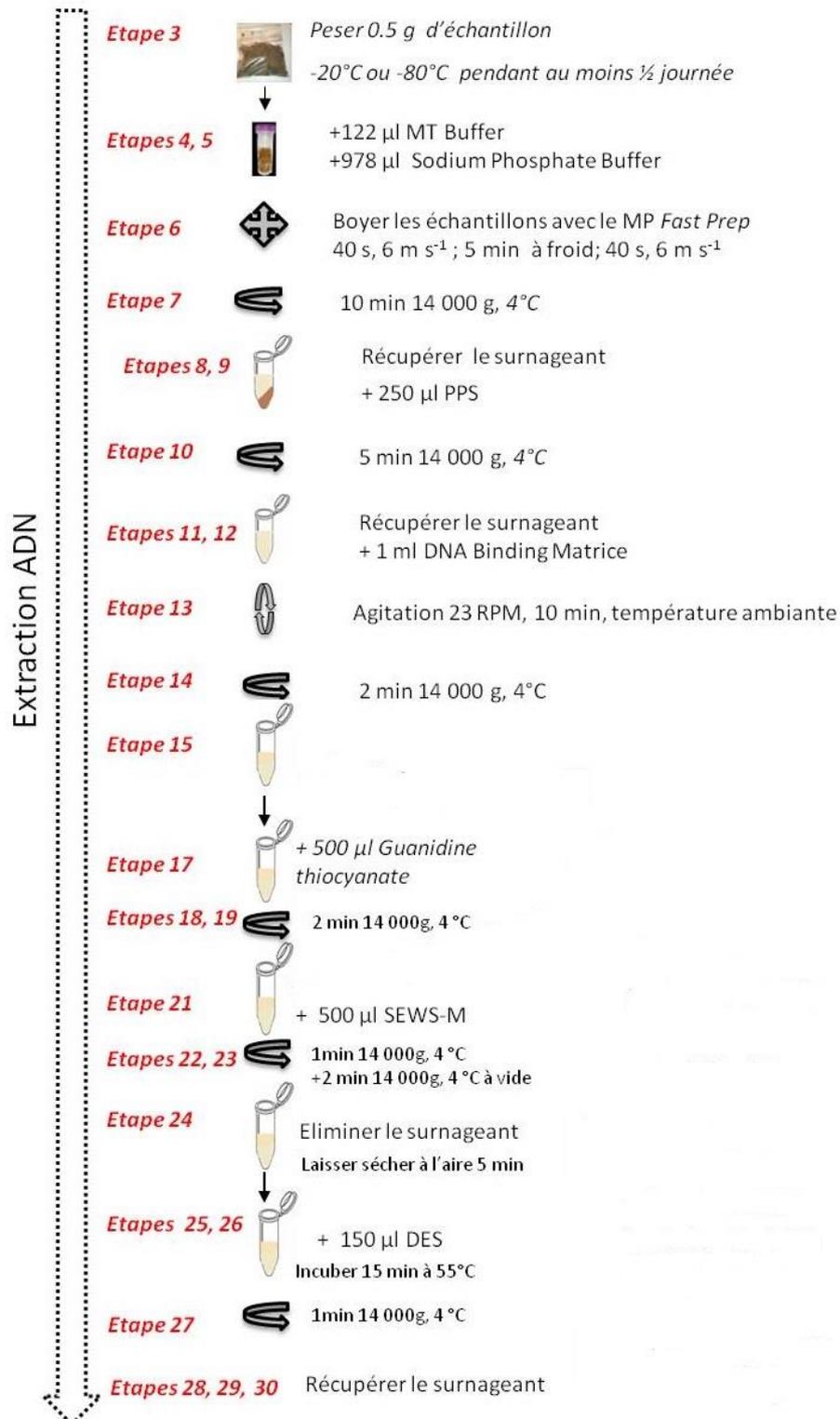


Figure 16. Les étapes du protocole d'extraction de l'ADN du sol - UMR Eco&Sols (adapté de Tournier et al., 2015).

2.3.2. Echantillonnage des plantes et analyses réalisées

Après l'échantillonnage du sol rhizosphérique, les plantes ont été coupées au niveau du collet afin de les séparer en deux compartiments (racines et partie aérienne). Au sein d'un même pot, le système racinaire ou la partie aérienne d'une même espèce a été rassemblé(e) pour constituer un seul échantillon racinaire/aérien par espèce. Les racines ont été soigneusement lavées à l'eau osmosée pour enlever toute particule de sol encore adhérente. L'ensemble des échantillons végétaux ont été ensuite séchés à 70°C pendant 72 heures et pesés à la sortie de l'étuve pour la détermination de leur biomasse sèche. Enfin, le matériel végétal sec a été finement broyé avec soit un broyeur à billes (modèle Retsch MM 400, pour les racines) soit un broyeur à couteaux (modèle Retsch RS 100, pour les parties aériennes), et stocké au sec jusqu'au moment des analyses détaillées ci-après.

2.3.2.1. Dosage de P, K, Ca, Mg et S

La concentration d'une large gamme d'éléments (P, K, Ca, Mg et S) dans les échantillons végétaux a été dosée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) au CMI – Roullier. Pour ce faire, 100 mg de matière végétale ont été digérés dans un four micro-ondes (modèle Multiwave PRO, Anton Paar) pendant environ 45 min (montée de la température jusqu'à 200°C en 15 min, palier de 200°C pendant 10 min, puis descente jusqu'à 70°C en 15 min) en présence de 2 cm³ de H₂O₂ et de 8 cm³ de HNO₃ 65%. Les extraits digérés ont été mélangés avec de l'eau déminéralisée afin d'atteindre un volume de 25 cm³ et ensuite analysés en ICP-MS.

2.3.2.2. Dosage de C total, N total et ¹⁵N

Des micro-pesées d'environ 2 mg de matériel végétal ont été réalisées dans des nacelles en étain et envoyées à la Plateforme PLATIN' de l'Université Caen Normandie pour dosage de C total, N total, ainsi que de l'isotope ¹⁵N, par spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS). Les résultats d'excès isotopique ¹⁵N dans les échantillons de lupin ont permis ainsi de calculer le pourcentage d'azote dérivé de l'atmosphère (% Ndfa) chez le lupin, selon la formule proposée par McAuliffe et al. (1958) : %Ndfa = (1 - (% excès ¹⁵N chez le lupin / % excès ¹⁵N chez le blé)) x 100.

2.4. Récolte 2 : Stade Maturation

La deuxième et dernière récolte a été réalisée 3 mois après le semis (soit 1 mois après la récolte 1) lorsque les plantes de blé étaient arrivées au stade de pleine maturité, tandis que les plantes de

lupin se retrouvaient au stade 4.5 (Walker et al., 2011), avec les gousses encore vertes et les graines bien formées (Figure 17). Puisque l'intérêt principal du sol récolté à ce stade était de servir à l'Expérience 2 (ayant pour but d'évaluer l'effet d'héritage à court terme de l'association blé-lupin sur le fonctionnement global du sol en termes de résistance et résilience), sa procédure d'échantillonnage a été simplifiée, et le sol entier des pots a été prélevé (sol rhizosphérique récupéré sans échantillonnage rigoureux, et mélangé au sol non-rhizosphérique). Après leur prélèvement, les sols ont été placés dans une chambre froide (4°C) et ainsi conservés (à leur humidité à la récolte) jusqu'au moment de la mise en place de l'Expérience 2 (soit 16 semaines).



Figure 17. Les différentes modalités de culture au moment de la récolte 2 (stade maturation) de l'Expérience 1.

2.5. Traitement des données / Analyses statistiques

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) générale sur l'ensemble des données sol (compartiments rhizosphère et bulk confondus) a été effectuée, suivie de quelques ACP plus spécifiques prenant en compte les compartiments rhizosphère et bulk séparément. Des ACP ont également été réalisées sur les données plantes, avec une ACP globale sur l'ensemble des données (biomasses aérienne et racinaire des deux espèces) suivie d'autres sur des jeux de données réduits (seulement sur partie aérienne, racinaire ou biomasse totale des plantes). Des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs (modalité culture X traitement N) ont été réalisées pour tester l'effet de ces deux facteurs sur toutes les variables mesurées, que ce soit pour le jeu de données sol ou plantes. En

absence d'interaction entre les deux facteurs, des ANOVA à un facteur ont été effectuées afin de tester i) les différences entre les modalités culture, tous traitements N confondus (ANOVA sur facteur culture), ou de tester ii) les différences entre les traitements N, toutes modalités culture confondues (ANOVA sur facteur azote). Quand nécessaire, les données ont subi des transformations (racine carrée ou logarithmique) pour assurer l'homogénéité des variances et la distribution normale des résidus. Les différences entre les moyennes ont été testées au moyen de tests de Tukey de comparaisons multiples des moyennes au seuil de 5% de signification.

Toutes les analyses mentionnées ont été réalisées sur le logiciel R, version 3.5.1 (R Core Team, 2018). Les packages utilisés pour les différentes analyses ont été les suivants : *car* (pour les ANOVA), *agricolae* (pour les tests de Tukey) et *FactoMineR* (pour les ACP).

3. Expérience 2 : résistance et résilience des communautés microbiennes du sol face à un stress thermique

Cette expérience a été conduite entre avril et mai 2018 dans le cadre d'un stage de Master 2 et d'une collaboration avec les UMR LEM de Lyon et EMMAH d'Avignon. L'incubation des sols et le suivi de la respiration basale (*Basal Respiration – BR*) au cours du temps, ainsi que les mesures de N minéral après chaque échantillonnage destructif, ont été réalisés à l'UMR SAS (Rennes). Les mesures de respiration (*Substrate-Induced Respiration – SIR*) et de nitrification (*Nitrification Enzyme Activity – NEA*) potentielles ont été effectuées à l'UMR LEM de Lyon. Ainsi, à chaque date d'échantillonnage destructif, les échantillons concernés étaient soigneusement prélevés, conditionnés dans des boîtes réfrigérées et aussitôt envoyés à Lyon pour les différentes analyses prévues.

3.1. Mise en place et suivi de l'expérience

Une pré-expérimentation réalisée en février 2018 (Annexe 1) a permis de déterminer la modalité d'application du stress thermique (48°C pendant 2 jours). Pour rappel, seuls les échantillons de sol correspondant au traitement N1 de l'Expérience 1 ont été pris en compte pour la présente expérience.

Des sept répétitions des échantillons de sol correspondant aux 3 modalités plantées (W, L, WL) au niveau N1 de l'Expérience 1, seulement quatre ont été retenues (R2, R3, R4 et R6) pour la présente expérimentation, après un tirage au sort effectué sur le logiciel R. Pour le sol témoin sans plante (U), les quatre répétitions ont été constituées à partir du mélange des 3 réplicats originellement utilisés pour l'Expérience 1 (ci-nommées également R2, R3, R4 et R6, par simplicité ; Figure 18). Chacun des

16 échantillons de sol venant de l'Expérience 1 (W, L, WL, U x 4 répétitions) a été sous-divisé en 11 échantillons de 50 g équivalent sol sec. Ces 11 sous-échantillons correspondaient à 5 dates de mesure définies pour l'expérience (T_0 , T_2 , T_7 , T_{16} , T_{28} – représentant les nombres de jours après la fin du stress) pour les 2 conditions de température ('contrôle' ou 'C' à 28°C, et 'stress' ou 'S' à 48°C), en plus d'une mesure avant l'application du stress à la date dénommée T_{-2} (Figure 18). Au total, 176 échantillons de sol (50 g) ont été constitués et placés dans des bocaux en verre de 1 dm³ hermétiquement fermés (Figure 19). Après une période de pré-incubation consistant à homogénéiser les conditions initiales de tous les échantillons (mise de la totalité des échantillons à la WHC et incubation des sols pendant 5 jours à 12°C), les 16 bocaux correspondant à la date de mesure T_{-2} ont été récoltés. Les 160 bocaux restants ont été répartis dans deux incubateurs, un premier réglé à 28°C (condition 'C') et un deuxième réglé à 48°C (condition 'S'). Au terme de la phase de stress (T_{-2} à T_0), l'ensemble des échantillons 'S' ont été placés à 28°C. Les bocaux ont été progressivement récoltés (32 à chaque fois) aux dates de mesure T_0 , T_2 , T_7 , T_{16} et T_{28} . La date T_2 a été choisie comme date de fin de stress. Pour éviter des effets d'assèchement-humectation, pendant toute l'expérimentation les sols ont été maintenus à 100% de la WHC (soit 28% d'humidité pondérale) en présence d'un pilulier d'eau. Suite à l'échantillonnage des bocaux correspondant à la date T_{-2} et pour chaque date de prélèvement, un pilulier de soude a été placé dans les bocaux de la date de récolte suivante pour le suivi de la respiration basale (BR) du sol, pour chacune des modalités 'S' ou 'C'. A chaque date de prélèvement, chacun des échantillons a été aliquoté en 4 parties pour les analyses ultérieures (SIR, NEA, N minéral et humidité pondérale) et les sous-échantillons pour les mesures de SIR et NEA ont été immédiatement conditionnées à 4°C et placés en boîte réfrigérée pour envoi à l'UMR LEM de Lyon.

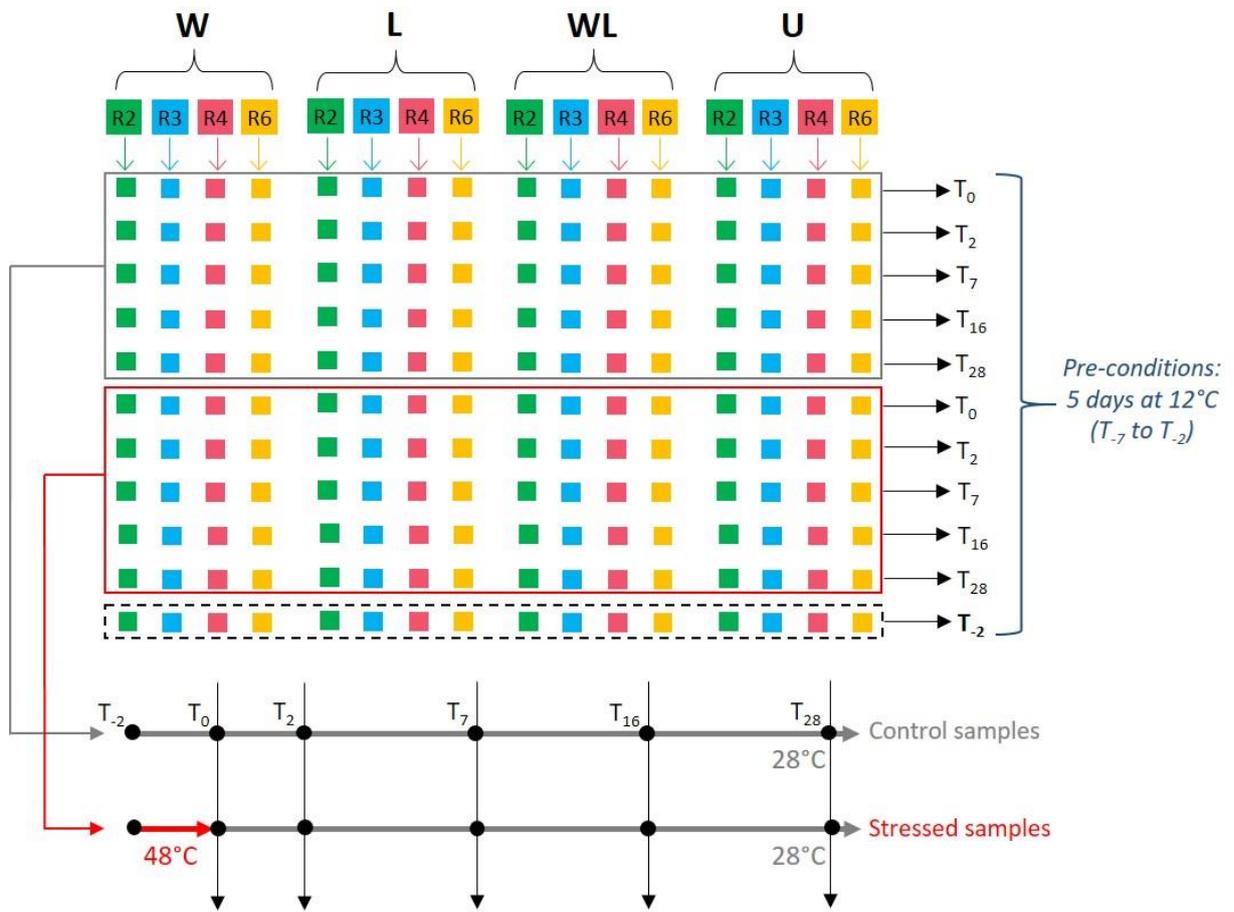


Figure 18. Schéma synthétique de l'Expérience 2 (les flèches noires représentent l'échantillonnage des sols).



Figure 19. Microcosmes contenant les échantillons de sol lors de l'Expérience 2.

3.2. Analyses réalisées

3.2.1. Azote minéral

Le même protocole détaillé dans la section 2.3.1.1. a été utilisé, mais cette fois-ci sur une base de 25 g de sol frais. Ainsi, les 25 g de sol ont été extraits avec 50 cm³ de KCl 1M (rapport sol : extractant de 1 : 2) et ensuite agités à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 30 min à 140 tours par minute. Après 30 min de repos, le surnageant a été prélevé et filtré à 0,45 µm. Les concentrations en N-NO₃ et N-NH₄ dans les filtrats ont été mesurées avec un analyseur séquentiel (AQ2, SEAL Analytical, UK). Les résultats ont été exprimés en mg N-(NH₄ ou NO₃) kg⁻¹ de sol sec.

3.2.2. Respiration Basale (BR)

Les mesures de BR ont été réalisées via un dosage en retour de la soude (NaOH) 1M n'ayant pas réagi avec le CO₂ dans les bocaux. Pour ce faire, 2,5 cm³ d'une solution de BaCl₂ à 30% et 1 goutte de phtaléine de thymol ont été ajoutés à 1 cm³ de la soude qui se retrouvait dans les piluliers au cours de l'incubation. Le dosage en retour a été donc effectué avec du HCl à 0,1 M. Les résultats de BR ont été exprimés en µg C-CO₂ jour⁻¹ g⁻¹ de sol sec.

3.2.3. Respiration Induite par Substrat (SIR)

Les mesures de SIR ont été effectuées sur 10 g d'équivalent sol sec d'après la méthodologie proposée par Patra et al. (2005). Brièvement, une solution de glucose (au taux de 1,2 mg de C-glucose g⁻¹ de sol sec) a été ajoutée sur chaque échantillon de sol. Les échantillons ont été ensuite placés dans une enceinte thermostatée à 28°C pendant 6 heures et la cinétique d'accumulation du CO₂ produit a été mesurée toutes les heures à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (µGC R3000, SRA instruments, France). Les résultats ont été exprimés en µg C-CO₂ h⁻¹ g⁻¹ de sol sec.

3.2.4. Nitrification potentielle (NEA)

Comme pour la SIR, la méthodologie utilisée pour la mesure de la nitrification potentielle a été également basée sur celle de Patra et al. (2005). Succinctement, une solution de (NH₄)₂SO₄ (50 µg de N-NH₄⁺ g⁻¹ de sol sec) a été ajoutée à 3 g d'équivalent sol sec. Les échantillons ont été ensuite placés dans une étuve agitatrice (140 tours par minute ; New-Brunswick scientific) à 28°C pendant 10 heures. La cinétique de production de NO₂⁻ et NO₃⁻ a été mesurée toutes les deux heures sur un volume de 1,5

cm³ (filtré à 0,22µm) à l'aide d'un photomètre (Smartchem 200, AMS Alliance, France). Les résultats de NEA ont été exprimés en N-NO₂⁻+ NO₃⁻ h⁻¹ g⁻¹ de sol sec.

3.3. Mesures de résistance et de résilience

La résistance et la résilience des activités microbiennes (BR, SIR et NEA) face au stress thermique ont été mesurées de deux manières : au travers des i) pourcentages de changement par rapport aux contrôles (d'après Bérard et al. (2011) et Chaer et al. (2009)), et des ii) indices proposés par Orwin & Wardle (2004).

Les pourcentages de changement ont été calculés, pour chaque date d'échantillonnage, de la manière suivante :

$$relative\ change\ (\%) = \left[\left(\frac{S_i}{C_i} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

où ***S_i*** et ***C_i*** représentent les valeurs obtenues pour la variable réponse (BR, SIR ou NEA) sur les échantillons stressés et contrôle, respectivement, à la date d'échantillonnage ***i*** (*i.e.* T₂, T₇, T₁₆ ou T₂₈).

Les indices de résistance (RS) et de résilience (RL) ont été également calculés comme suit :

$$RS = 1 - \frac{2 \times |D_2|}{C_2 + |D_2|} \quad (2)$$

où D₂ est la différence entre les valeurs obtenues pour la variable réponse sur les échantillons contrôle (C₂) et stressé (S₂), deux jours après la fin du stress (T₂ – date choisie comme 't0' pour la mesure de la résistance dans la présente étude), et :

$$RL = \frac{2 \times |D_2|}{|D_2| + |D_x|} - 1 \quad (3)$$

où D_x est la différence entre les valeurs obtenues pour la variable réponse sur les échantillons contrôle et stressé au jour 7, 16 ou 28 (T₂, T₁₆ ou T₂₈) après la fin du stress.

Afin de permettre une meilleure compréhension de ce que les indices RS et RL signifient en termes pratiques, Orwin & Wardle (2004) proposent quelques explications, ci-après adaptées au présent jeu de données. Tout d'abord, comme mentionné plus haut, ces deux indices sont bornés entre -1 et +1,

avec la valeur +1 représentant soit une pleine résistance (pas d'effet du stress sur la variable réponse) soit une résilience complète (mêmes valeurs de la variable réponse obtenues pour les échantillons contrôle et stress). Pour la résistance, si la valeur mesurée sur l'échantillon stressé se situe entre 0 et $2C_2$ (*i.e.* $|D_2| \leq C_2$), les indices obtenus seront alors compris entre 0 et 1. Toujours concernant la résistance, un indice de 0 signifie que la valeur de la variable réponse mesurée sur l'échantillon stressé est soit 100% plus petite, soit 100% plus grande que la valeur mesurée sur l'échantillon contrôle. Par contre, un indice négatif indique que l'échantillon stressé assume une valeur plus grande que $2C_2$ (*i.e.* $|D_2| > C_2$; pour les deux dernières situations, le sol présente donc une faible résistance). Concernant la résilience, un indice égal à 0 indique que l'échantillon stressé soit n'a toujours rien récupéré depuis le changement initial provoqué par le stress (*i.e.* $D_x = D_2$), soit la valeur mesurée sur l'échantillon stressé est la même, en absolue, que celle mesurée sur le contrôle, mais dans la direction opposée (*i.e.* $D_x = -D_2$). Enfin, un indice entre 0 et 1 signifie que l'échantillon stressé n'a pas encore atteint la valeur de l'échantillon contrôle, tandis qu'un indice négatif indique que la valeur absolue de D_x est plus grande que la valeur absolue de D_2 (*i.e.* le sol présente ainsi une faible résilience).

3.4. Traitement des données / Analyses statistiques

Comme pour l'Expérience 1, l'analyse des données issues de la présente expérience a initialement consisté en une ACP permettant d'avoir une vue d'ensemble du jeu de données complet (avec toutes les dates et conditions de température). Cette première ACP a été gardée dans le troisième article de la thèse (Chapitre 5). Six ACP supplémentaires ont également été réalisées, une pour chaque modalité plantée (W, L, WL) dans chacune des conditions de température (contrôle et stress), ce qui a permis de voir comment les groupes d'individus appartenant aux différentes dates se distinguaient d'une modalité à l'autre et quelles étaient les variables associées aux différentes dynamiques observées. Pour chacune des ACP mentionnées, les coordonnées des individus sur les axes ont été utilisées pour tester les différences entre les niveaux d'un facteur (*i.e.* différences entre les modalités culture ou entre les différentes dates ou entre stress et contrôle), soit par des ANOVA à un facteur, soit par des tests de Kruskal-Wallis (en cas de non-normalité des résidus).

A la suite des ACP, des analyses statistiques inférentielles ont été effectuées pour confirmer les différences observées. Les effets de l'héritage des modalités de culture (W, L, WL, U) et du stress thermique sur les différentes variables, au sein de chaque date, ont été évalués au moyen d'une ANOVA à deux facteurs (modalité culture X stress thermique). En absence d'interaction entre les facteurs, des ANOVA à un facteur ont été effectuées afin de tester i) les différences entre les modalités culture, avec contrôle et stress confondus (ANOVA sur facteur culture), ou de tester ii) les différences

entre les conditions stress et contrôle, toutes les modalités culture confondues (ANOVA sur facteur stress thermique). Au sein de chaque date de mesure, l'effet de l'héritage des modalités plantées (W, L, WL) sur les indices RS et RL, ainsi que l'effet de l'héritage de l'ensemble des modalités culture (W, L, WL, U) sur les pourcentages de changement a été aussi testé au moyen des ANOVA à un facteur. Lorsque nécessaire, les données ont été transformées (racine carrée ou logarithme) pour assurer l'homogénéité des variances et la distribution normale des résidus. Les différences entre les moyennes ont été testées i) soit via des tests de Tukey, ii) soit au moyen des tests non-paramétriques de Wilcoxon (après Kruskal-Wallis), tous les deux basés au seuil de 5% de signification. A la fin, une analyse de redondance (RDA) a été également réalisée pour évaluer l'effet des toutes les variables mesurées (BR, SIR, NEA, N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺) sur les indices RS et RL à T2 et T16, respectivement.

Toutes les analyses mentionnées ont été réalisées sur le logiciel R, version 3.5.1 (R Core Team, 2018). Les packages utilisés ont été les suivants : *car* (pour les ANOVA), *agricolae* (pour les tests de Tukey), *FactoMineR* (pour les ACP) et *vegan* (pour la RDA). La réalisation des tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis et Wilcoxon a été possible avec le package '*stats*' déjà intégré dans le logiciel R.

CHAPITRE 3

Soil rhizosphere functioning in a
cereal-legume intercrop under a soil N
mineral gradient

Ce chapitre correspond à un article en préparation pour soumission dans la revue *Biology and Fertility of Soils*, comprenant les résultats de l'Expérience 1 (récolte à la floraison).

- L'objectif de ce chapitre a été d'évaluer si un gradient de N minéral dans le sol pourrait induire différents effets de l'association blé tendre-lupin blanc, comparativement aux cultures mono-spécifiques, en termes de biomasse et nutrition végétales, mais également en termes de fonctionnement du sol rhizosphérique, évalué à travers différents paramètres liés aux cycles de C, N et P.

Soil rhizosphere functioning in a cereal-legume intercrop under a soil N mineral gradient.

Ana Beatriz de Oliveira^a, Philippe Hinsinger^b, Simon Boudsocq^b, Mustapha Arkoun^c, Jean Claude Yvin^c
Edith Le Cadre^{a,1}

^aUMR SAS, AGROCAMPUS OUEST, INRA, bâtiment 13, 65 rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042, Rennes Cedex, France. E-mail: ana-beatriz.de-oliveira@inra.fr

^bUMR Eco&Sols, Univ Montpellier, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Bâtiment 12, 2 Place Viala, 34060, Montpellier Cedex 2, France. E-mails: philippe.hinsinger@inra.fr; simon.boudsocq@inra.fr

^cCentre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, 18 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France. E-mails : mustapha.arkoun@roullier.com; jeanclaude.yvin@roullier.com

¹ corresponding author :

Bâtiment 8, UMR Sol Agro hydrosystème Spatialisation, 65 rue de Saint Brieuc, CS 84 215, 35 042 Rennes cedex, France

E-mail: edith.lecadre@agrocampus-ouest.fr

Tel.: +33 (0)2 23 48 54 74

Abstract

Intercropping effects on nitrogen (N) and phosphorus (P)-related soil-plant dynamics are still controversial in N-fertilized systems. In our study, we hypothesized that a soil N gradient would promote different responses of intercropping relative to sole crops in terms of plant growth and N and P-related soil chemical and microbial parameters. Accordingly, a greenhouse pot experiment was conducted with wheat (*Triticum aestivum*) and white lupin (*Lupinus albus*) grown as sole and intercrops along a soil mineral N gradient. At flowering, plant variables (dry weight – DW, N and P accumulation), as well as chemical and microbial variables in the rhizosphere and bulk soil were investigated. Total DW of wheat was significantly increased when intercropped with lupin, whatever soil N levels, while total DW of intercropped lupin was significantly decreased or remained unchanged. Intercropped wheat used N fertilizer more efficiently than sole wheat whatever N level. Whatever the soil N level, soil parameters in the intercropping rhizosphere were either i) maintained or ii) improved relative to wheat or lupin sole crops. The soil N gradient significantly altered intercropping effects on pH and phosphatases activities, while exerted some trends on N-NO₃⁻, dissolved organic carbon and total fungi (18S gene) abundance. We concluded that our rather high level of initial soil N mineral could have partly alleviated wheat-lupin interactions within the rhizosphere, but observed trends support to better investigate effects of N fertilization in intercropping to i) conciliate farmer's production goals and ii) generate positive plant-soil feedback for a successful crop rotation.

Keywords: diversification; intercropping; plant-soil feedback; soil quality; microbial indicators; nitrification; phosphorus

1. Introduction

As recently reviewed by Renard & Tilman (2019), a greater crop diversity (agrobiodiversity) can increase year to year national harvest face to fluctuations caused by climate change. Intercropping, the simultaneous cultivation of different crops in the same field during a significant part of their life cycles (Brooker et al., 2015; Willey, 1979), is one solution to introduce more plant diversity in agroecosystems. Advantages of intercropping compared to monocultures are numerous. Evidences from literature reported soil erosion prevention, preservation of C and N dynamics (Chapagain & Riseman, 2014; Oelbermann & Echarte, 2011; Thorsted et al., 2006) or soil quality (Cong et al., 2015). Authors also reported better yield stability (Pelzer et al., 2012), due to reduction of the incidence of pests and diseases, as a consequence of a more (i) efficient physical barrier, (ii) dilution effect and (iii) increase of natural enemies against causal agents (Ehrmann & Ritz, 2014; Lithourgidis et al., 2011; Trenbath, 1993; Zhu & Morel, 2018), and decrease smothering by weeds (Banik et al., 2006). In intercropping systems, crops share resources such as light, water, nitrogen (N) and phosphorus (P) (Brooker et al., 2015; Duchene et al., 2017; Ehrmann & Ritz, 2014). Intercropping non-fixing species like cereals with N-fixing species such as legumes provides complementarities in resource use or facilitation (Bedoussac et al., 2015; Hinsinger et al., 2011) and decreases competition by resource partitioning. Indeed, cereals and legume crops may only partly compete for soil mineral N at the same time and location because cereals grow roots faster and earlier and because legumes have access to another major source of N through symbiotic fixation of N₂ (Corre-Hellou et al., 2007; Génard et al., 2017). When intercropped with a cereal, legumes can achieve greater N₂-fixation (Jensen, 1996) due to the large N requirement of the cereal (Bedoussac et al., 2015), resulting in decreased soil mineral N concentrations and thus alleviating the limitation of N₂-fixation that can occur when nitrate concentration is high (Fan et al., 2002; Naudin et al., 2010). Hence, cereal-legume mixtures can exhibit higher yields and greater grain or forage quality in low-input systems (Bedoussac & Justes, 2010b; Hauggaard-Nielsen et al., 2008). Such cereal-legume mixtures are also promising in organic systems, and can enhance protein self-sufficiency in crop-livestock systems in developing countries (Hassen et al., 2017) or in Europe (Voisin et al., 2014). In contrast with N, facilitation processes can be involved for P in cereal legume intercrops (Hinsinger et al., 2011). Legumes are considered as P-mobilizing crops able to improve their own P nutrition but also that of the intercropped species through an increase of soil P availability in the rhizosphere (Li et al., 2014).

In addition to these direct effects of root activities on N and P availability, indirect effects of intercropping on soil microbial communities and activity (Dybzinski et al., 2008; Pivato et al., 2017; Zak et al., 2003) have been pointed out. Several authors (Chen et al., 2019; Latati et al., 2017; Tang et al.,

2016) have reported changes of rhizosphere microbial biomass and fungi:bacteria ratios as a consequence of intercropping or plant mixture. In particular, Granzow et al. (2017) estimated that soil bacterial richness and, to a lesser extent, fungal richness were more important in intercropped cereal compared to sole crop. Likewise, N-related communities are also susceptible to be affected by intercropping (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2015), in particular archaeal and bacterial ammonia oxidizers (AOA and AOB, respectively) involved in the first step of nitrification (Fan et al., 2011; Könneke et al., 2005). Plants are able to affect nitrifiers owing to specific plant traits (Cantarel et al., 2015) like different N-use strategies (Thion et al., 2016) and root exudation (Song et al., 2007a), and altering oxygen pressure (Philippot et al. 2013). Thereby, in a context of a greater plant diversity, changes in abundance and/or composition of ammonia oxidizers can be expected, as observed in some studies (Song et al., 2007a; Zhang et al., 2015). Management of N fertilization can affect intercropping performances (Pelzer et al., 2016; Pelzer et al., 2014b), which in turn will be able to influence N and P-related soil-plant dynamics. Different soil N levels have been reported to influence N-cycling-related microbial communities under intercropping systems (Chen et al., 2018; Yu et al., 2019; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2015). Zhao et al. (2015) observed that a moderate N fertilization promoted an increase in the biomass of total microbes and bacteria. Moreover, nitrogen forms (nitrate or ammonium) absorbed by plants have been reported to increase or decrease rhizosphere pH which in turn modifies nutrient availability (Hinsinger et al., 2003). Describing how plants mediate N cycling in the rhizosphere is beyond the scope of this study, but have been recently reviewed by Moreau et al. (2019).

Plant – microorganisms in the rhizosphere are involved in shifts of plant interactions under modification of resources availability (O'Brien et al., 2016). Indeed, rhizosphere interactions are partly mediated by the changes of root exudation patterns in response to nutrient availability (Canarini et al., 2019). According to Zhu et al. (2016), N mineral application rates modify the root exudation pattern and in turn the total abundance of bacteria in the rhizosphere of maize plants. More particularly, these authors found that increasing N fertilizer rates significantly improved carbon containing metabolites in root exudates resulting in a concomitant use by rhizosphere microbiome. Yang et al. (2015) demonstrated some changes in microbial communities structure in the rhizosphere of two temperate grassland species along a soil N mineral gradient in a field experiment (Yang et al., 2015). According to Hu et al. (2018), any modifications of the rhizosphere community may alter plant-soil feedback, which, depending of soil type and plant species, may contribute to a plant legacy for subsequent crops. It urges then to better understand the rhizosphere functioning under N-fertilized intercrops.

In this context, we hypothesized that different soil N levels will promote different responses of an intercrop relative to sole crops in terms of plant biomass and N and P-related soil chemical and microbial parameters in the rhizosphere. Accordingly, wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Lennox) and

white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Feodora) were grown alone or intercropped along a soil mineral N gradient generated with ^{15}N -labelled urea. Although not widespread in Europe, wheat-lupin intercropping is herein considered as a model of cereal-legume mixtures because of the i) ability of lupin to fix N_2 and promote P availability through exudation of organic anions by cluster roots (Watt & Evans, 2003) and ii) its high protein content when used as forage crop (Azo et al., 2012) in livestock-crop systems. At flowering, we measured dry weight, N and P contents in whole plants (shoots and roots), but also N- and P-related soil microbial parameters in rhizosphere and bulk soil. Finally, we calculated different ecological indices in order to characterise plant interspecific interactions, such as Relative Interaction Index based on plant variables, and Relative Mixture Effects (RME) based on soil parameters. RME indices were used to evaluate the effect of N gradient on soil rhizosphere functioning under cereal-legume intercropping. The studied soil chemical parameters were: pH, Dissolved Organic Carbon (DOC), soil N mineral pools (N-NH_4^+ , N-NO_3^-) and available P (Olsen-P). According to Schloter et al. (2018), we also measured soil microbial parameters related to activities (acid and alkaline phosphatases, C, P and N contents in the microbial biomass) and abundances (16S and 18S genes for total bacteria and fungi, respectively). Archaeal and Bacterial Ammonia Oxidizers (AOA and AOB, respectively) abundances were also investigated due to their sensitivity to N competition with plants (Kuzyakov & Xu, 2013).

2. Material and Methods

Experimental set-up

The soil originated from a plot of the INRA UE DiaScope experimental station localized at Manguio (3°59'6"E, 43°37'13"N, 12 m altitude) in Southern France. The soil is a calcareous cambisol with a clay loam texture (clay 294 g kg⁻¹, fine silt 200 g kg⁻¹, coarse silt 233 g kg⁻¹, fine sand 156 g kg⁻¹ and coarse sand 118 g kg⁻¹), which had developed on an alluvial calcareous parent material, typical of the plains of Southern France. The regional climate is typically Mediterranean, with the topsoil being regularly exposed to drying-rewetting cycles due to irregular rain events, mainly concentrated in Autumn and Spring. The annual average rainfall at this site during the growing season, from September to June, over the last 20 years was 598 mm. The soil (0-15 cm depth) was collected in September 2008, 3 months after pea harvest (*Pisum sativum* L.), sieved at 1-cm to remove any coarse organic material, air dried and stored in sealed buckets at ambient temperature until the establishment of the greenhouse experiment.

Before greenhouse experiment, the soil was re-sieved with a 4-mm mesh and then mixed with perlite to allow better conditions for root development. Pots (4 dm³) were filled with 2 kg of soil and

0.2 kg of perlite. This final soil+perlite mixture had the following properties: clay 202 g kg⁻¹, silt 454 g kg⁻¹, sand 343 g kg⁻¹, total CaCO₃ 39 g kg⁻¹, pH_w 8.3, CEC_{Metson} 15 cmol₊ kg⁻¹, organic C 10.4 g kg⁻¹, total N 0.95 g kg⁻¹, N-NH₄⁺ 20 mg kg⁻¹, N-NO₃⁻ 39 mg kg⁻¹, available P (Olsen extraction method) 33.9 mg kg⁻¹. The soil exhibited a rather high P content due to past fertilization, and was thus considered as non-limiting for plant growth. The greenhouse experiment was conducted at Centre Mondial de l'Innovation (Roullier Group – Saint-Malo, France) from September to November 2017 (61 days) using a full factorial design with three N treatments (N1 = 2, N2 = 33 and N3 = 65 mg N kg⁻¹ dry soil) and three crop treatments (wheat - *Triticum aestivum* L. cv. Lennox, grown as sole crop; white lupin - *Lupinus albus* L. cv. Feodora, grown as sole crop, and the two intercropped species), plus unplanted soils (control treatment). After sterilization (3% calcium hypochlorite, 10 min contact), seeds of white lupin were sown (2 cm depth) with 1 cm³ of a deionized water-based solution containing 10⁷ UFC cm⁻³ of *Bradyrhizobium lupini* (LL13 strain) as inoculant. For sole crop treatment, 12 seeds of wheat and 6 of white lupin were sown per pot and thinned to 4 and 2 individuals, respectively, after emergence. When intercropped, 6 seeds of wheat and 3 of lupin were sown and thinned to 2 and 1 individual(s), respectively, meaning half densities compared to sole crops. N treatments were applied 13 days after sowing (DAS) as 3% ¹⁵N-labelled urea diluted in 10 cm³ of deionized water. Pots were arranged in a complete randomized design with seven replicates for planted treatments and three replicates for unplanted control. Pots were automatically and daily watered in order to maintain water content at 75% of Water Holding Capacity of the soil+perlite mixture (WHC = 28%). The air temperature in the greenhouse was 22.7 ± 2.1 °C, and the incident photosynthetically active radiation was 200 μmol s⁻¹ m⁻² on average, with a 16 h photoperiod. Plants were harvested 61 DAS, when most individuals of both species were in full flowering stage. Preliminary tests allowed to determine the appropriate soil moisture (45% of WHC) for root and rhizosphere sampling. Hence, the watering system was stopped 30 hours before the harvest of plants and soil sampling. Rhizosphere soils were carefully collected after gently shaking the root system, followed by a gentle brush of roots in order to gather < 3 mm aggregates for measuring N and P contents according to Betencourt et al. (2012) and Tang et al. (2014). Unplanted soil (control treatment) was considered as bulk soil and was thus also sampled after homogenizing the whole of the pot. Hence, four types of soil samples were obtained from this experiment: i) sole wheat rhizosphere, ii) sole lupin rhizosphere, iii) intercropping rhizosphere and iv) bulk soil (unplanted control). Thereby, all these four modalities were considered for the “crop treatment” treated in *Statistical Analyses* section. Soil samples for microbial biomass (5 g) and mineral N (10 g) measurements were immediately placed at 4 °C and -20 °C, respectively, and analyzed one week later. Samples for phosphatases activities (1 g) and molecular analyses (500 mg) were stored at -20 °C, whereas the remaining soil for pH measurement was air dried for a week at room temperature until analysis.

Soil chemical and biological measurements

The N-NH_4^+ and N-NO_3^- measurements were performed on 10 g of soil extracted with 20 cm³ of a 1M KCl solution according to the standard ISO 14256-2:2005. The N-NH_4^+ and N-NO_3^- concentrations in the filtered aliquots were measured with an Analytical Discrete Multi-Chemistry Analyzer (AQ2, SEAL Analytical, UK). Soil pH was measured according to the standard ISO 10390:2005, in a 1:5 (v:v) soil:water suspension.

Microbial biomass C, N and P contents (MBC, MBN and MBP) were measured by the chloroform fumigation-extraction technique (Vance et al., 1987). Briefly, 5 g of soil was exposed to chloroform vapor for 24 h and then extracted with 25 cm³ of 0.025 M K_2SO_4 (for MBC and MBN) or with 100 cm³ of 0.5 M NaHCO_3 (for MBP). The extracts were shaken for 45 min (for MBC and MBN) or 30 min (for MBP), centrifuged (10 min at 2683 g) and then filtered through 0.45 μm filters. The concentrations of C and N in the extracts were quantified by a TOC/TN analyzer (ASI-V, TOC-Vcsh, TNM-1, Shimadzu, Japan), whereas P concentrations were determined colorimetrically with the malachite green method (Ohno & Zibilske, 1991). MBC, MBN and MBP were calculated from the difference between C, N and P concentrations in the chloroform-fumigated and non-fumigated samples. The estimates of microbial biomass were adjusted using experimentally-derived conversion factors of 0.45 for MBC and MBN, and of 0.4 for MBP (Jenkinson et al., 2004). Total C of non-fumigated samples was used to represent dissolved organic carbon (DOC), whereas P concentration of non-fumigated samples was used to represent inorganic available P extracted according to Olsen method (Olsen, 1954), hereafter called Olsen-P for simplicity.

Soil acid and alkaline phosphatase activities were determined according to Tabatabai & Bremner (1969) using p-nitrophenyl phosphate disodium (pNPP) as substrate. Briefly, p-nitrophenol (pNP) released by phosphatase activity was quantified colorimetrically at 415 nm after incubation (37 °C for 1 h) of 1 g of soil with 4 cm³ of a modified universal buffer (MUB) solution adjusted to a pH of 6.5 (for acid phosphatase) or 11 (for alkaline phosphatase). The reaction was stopped with 4 cm³ of 1M NaOH. Acid and alkaline phosphatases activities were expressed as milligrams of pNPP hydrolyzed per hour and per gram of dry soil.

Total soil genomic Deoxyribonucleic Acid (DNA) was extracted from 500 mg of soil according to the method described by Tournier et al. (2015). A washing step with 5.5 M guanidine thiocyanate was included in the protocol in order to remove humic acids from the soils, given that humic acids can inhibit the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Quantification of total extracted DNA was done using PicoGreen fluorescence. The abundances of the total bacterial and fungal communities (quantified by 16S rRNA and 18S rRNA genes, respectively) as well as of the archaeal and bacterial

ammonia oxidizers (AOA and AOB communities, quantified by archaeal and bacterial *amoA* genes, respectively) were determined by qPCR. The primers for 16S and 18S genes amplification were 341F and 515R (López-Gutiérrez et al., 2004), and FR1 and FR390 (Vainio & Hantula, 2000), respectively. For archaeal and bacterial *amoA* genes amplification, the primers used were Arch-*amoA*F and Arch-*amoA*R (Francis et al., 2005), and *amoA*1F and *amoA*2R (Rotthauwe et al., 1997), respectively. The qPCR reaction mixture (final volume of 10 mm³) comprised 2 mm³ of soil microbial DNA at 5 ng mm⁻³, 5 mm³ of Sso Advanced BioRad master mix, 2 mm³ of molecular grade H₂O and 0.5 mm³ of each primer. The cycles of qPCR were performed with a CFX96 (for 16S and 18S) or with a CFX384 (for AOA and AOB) Real time System Thermocycler (BioRad, Hercules, CA, USA). First, an initial DNA denaturation and high-efficiency enzyme activation of 2 min at 98 °C (for 16S and 18S) or of 5 min at 95 °C (for AOA and AOB) was performed. Then, for 16S and 18S, 39 cycles of PCR were performed as follows: 5 s at 98 °C, 30 s at 60 °C for 16S and 58 °C for 18S, and 30 s at 72 °C. Finally, for AOA and AOB, 40 cycles of PCR were performed as follows: 45 s at 95 °C, 30 s at 55 °C for AOA and 56 °C for AOB, and 30 s at 72 °C.

Plant sampling and measurements

After soil sampling, shoots were separated from roots. For intercropped treatments, the root systems of the two species were carefully separated to avoid excessive breakage. Within a pot, shoots or roots from all plants of a same species were assembled to constitute a unique shoot or root sample per species. Roots were gently rinsed with deionized water to eliminate remaining soil particles. Afterwards, shoots and roots were dried at 70 °C for 3 days, weighed for dry biomass determination and ground (Retsch MM 400 for roots and RS 100 for shoots) for subsequent analyses. Phosphorus (P) concentration in shoots and roots was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) after digestion of 100 mg subsamples in a microwave oven (Multiwave PRO, Anton Paar, Austria) with concentrated HNO₃ (65%) at 200 °C. Total nitrogen (N), as well as ¹⁵N isotope concentrations were measured on 2 mg subsamples by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) by the PLATIN' platform of the University of Caen Normandy (France).

N and P accumulated (*N* and *P acc.*) in total (shoot+root) dry weight (DW) (Dissanayaka et al., 2015) were calculated as follows:

$$N \text{ or } P \text{ acc.} = [(N \text{ or } P \text{ conc. in shoot}) \times (\text{shoot DW})] + [(N \text{ or } P \text{ conc. in root}) \times (\text{root DW})] \quad (1)$$

where *N* or *P conc.* is the concentration (mg g⁻¹) of N or P in shoot or root. Shoot or root DW is expressed in g plant⁻¹. Results of *N* and *P acc.* were expressed in mg plant⁻¹.

Percentage of N derived from air (%Ndfa) for white lupin (as intercrop or sole crop) was calculated using ^{15}N isotope dilution equation (McAuliffe et al., 1958), with the wheat plants (grown in the same conditions of white lupin) as reference:

$$\%Ndfa = \left[1 - \left(\frac{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N excess in white lupin}}{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N excess in wheat}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

where “atom% ^{15}N excess” means the ^{15}N enrichment above background in total DW of plants.

The percentages of N derived from fertilizer (%Ndff) and from soil (%Ndfs) were also calculated for each species (total DW basis) as follows (Ghaley et al., 2005) in order to perform a global nitrogen balance :

$$\%Ndff = \left(\frac{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N excess in wheat or white lupin}}{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N excess in urea}} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$\%Ndfs = 1 - \left[\frac{(Ndff \text{ (mg pot}^{-1}) + Ndfa \text{ (mg pot}^{-1}))}{\text{Total N acc. (mg pot}^{-1})} \right] \times 100 \quad (4)$$

Ecological indices: Relative Mixture Effect (RME) and Relative Interaction Index (RII)

We extended the indices initially proposed by Wardle et al. (1997) to express the effect of mixing litter from different species on litter decomposition rates (*i.e.* RME or Relative Mixture Effects) to test the relative effect of intercropping on each soil chemical and microbial parameter measured in our study, within each N treatment, as follows:

$$RME (\%) = \frac{O_i - E_i}{E_i} \times 100 \quad (5)$$

where expected values (E) correspond to the mean of a soil parameter (*i*) measured in the sole wheat and sole lupin rhizospheres, whereas observed values (O) correspond to the mean of a soil parameter (*i*) measured in the intercropping rhizosphere.

RME equals to 0 indicates an additive effect of the intercropping (*i.e.* the value of the variable measured in intercropping no differs from that expected based on the mean of the respective sole crops), whereas $RME > 0$ and $RME < 0$ indicate either synergistic or antagonist effects of the intercropping, respectively (*i.e.* the value of the variable measured in intercropping is either

significantly higher or significantly lower, respectively, than that expected based on the mean of the respective sole crops).

Relative Interaction Index (RII) (Armas et al., 2004) was also calculated for each species within each N treatment in order to characterize the intercropping effect on its total DW:

$$RII = \frac{Total\ DW_{IC} - Total\ DW_{SC}}{Total\ DW_{IC} + Total\ DW_{SC}} \quad (6)$$

RII index is calculated on a per plant basis and allows to verify if the referent species is more ($0 < RII < 1$) or less ($-1 < RII < 0$) productive in intercropping (IC) relative to sole crop (SC), or if the total DW is not changed in intercropping ($RII = 0$).

Statistical analyses

The effects of crop and N treatments on all soil and plant variables were tested by two-way ANOVA Type III to take into account unbalanced design of replicates between rhizosphere and bulk (unplanted) soil samples. For soil variables, in absence of interaction between factors (crop treatment x N treatment), one-way ANOVA was performed to test differences among crop treatments, all N treatments combined. For plant variables, in absence of interaction, one-way ANOVA was performed to test differences between crop treatments within a given N treatment or vice-versa. When necessary, data were squared root or log-transformed to cope with the ANOVA requirements. Significant differences between means were tested by Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$). Student's t-tests were performed to test whether RME or RII values were significantly different from zero. All statistical analyses were performed with R software v. 3.5.1 (R Core Team, 2018). The additional packages "car" and "agricolae" were used for ANOVA and Tukey's tests, respectively.

3. Results

Plant growth, nutrition and interspecific interactions

Total dry weight (DW) of wheat systematically increased (+36% on average) when intercropped with lupin, whatever the soil N treatment (Fig. 1; Table S1). For intercropped lupin, total DW significantly decreased (-16%) at N2, compared to sole lupin. Hence, RII was significantly positive for wheat whatever soil N treatments, while for lupin the RII was significantly negative only at N2 (Fig. 1). Among N treatments, significant differences in total DW were only observed for sole wheat, ranking as $N3 = N2 > N1$. N concentration of intercropped wheat was significantly greater than that of sole

wheat, whatever N treatments (Table 1). Among N treatments, N concentration significantly ranked as $N3 \geq N2 \geq N1$ for sole wheat, and as $N3 > N2 = N1$ for intercropped wheat. In contrast, for P concentration, no significant differences were noticed among crop or N treatments for wheat. In terms of P accumulation, intercropped wheat systematically accumulated more P than sole wheat (48% on average) with the lowest P accumulation being observed for sole wheat at N1. Likewise, intercropped wheat systematically accumulated more N than sole wheat (+68% on average) and ranked as $N3 > N2 > N1$. The N concentration of intercropped lupin was significantly lower than that of sole lupin at N1, whereas remained similar to that of sole lupin at N2 and N3. The P concentration of lupin did not vary between crop treatments at N1 and N2, but the intercropped lupin concentrated significantly less P than sole lupin at N3. On average, intercropped lupin accumulated 20% less P and 22% less N compared to the sole lupin. Furthermore, N and P accumulation tended to decrease with the increase of soil N treatments. Hence, N and P accumulation were the lowest for intercropped lupin at N3 and the highest for sole lupin at N1. The proportion of N derived from air (%Ndfa) in total lupin DW was significantly higher when intercropped with wheat, whatever the N treatment (Fig. 2; Table S1). Soil N treatments did not change the %Ndfa of intercropped lupin, but significantly reduced the %Ndfa of sole lupin. The lowest %Ndfa was observed for sole lupin at N3 (35%), which corresponded to a decrease of 40% compared to the %Ndfa of the sole lupin at N1 (59%). The amount of N derived from fertilizer per pot could be considered as negligible in intercropping ("Total IC" in Fig. 2) at N1, but sharply increased at N2 (46 mg pot⁻¹) and peaked at N3 (89 mg pot⁻¹). When reported to the total ¹⁵N-labelled urea applied, the intercropped plants used 62% of applied N at N2 and N3, whereas sole wheat used 66 and 65%, and sole lupin used 45 and 41%, respectively.

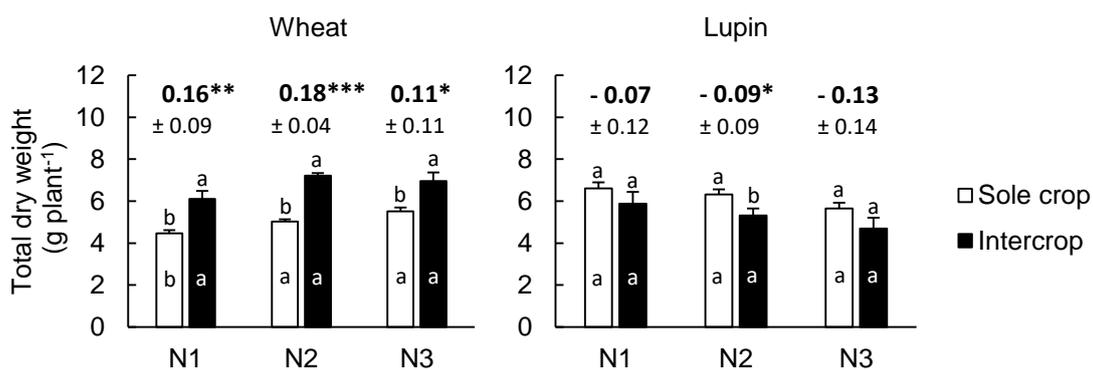


Fig. 1 Total dry weight (shoot+root) of wheat and lupin as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates. Error bars represent standard errors. Different letters above bars represent significant differences between crop treatments within each N treatment (Tukey's test at $p < 0.05$). Different letters inside bars indicate significant differences between N treatments within each crop treatment (sole or intercrop) for wheat or lupin according to a Tukey's test ($p < 0.05$). Values displayed above bars represent Relative Interaction Indices (RII) calculated for each species within each N treatment \pm SE (standard errors). Stars indicate that RII are significantly different from zero according to a Student's t-test ($p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, for *, ** or ***, respectively)

Table 1 Nitrogen and phosphorus concentrations (N conc. and P conc.) and accumulation (N acc. and P acc.) in whole plants (shoot+root) for wheat and lupin as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates \pm SE (standard errors). Values of probability (*p*-values) of two-way ANOVA (crop treatment x N treatment) are indicated on the bottom half of the table, and bold lowercase letters stand for significant differences in case of interaction between factors. In absence of interaction, different lowercase letters represent significant differences between sole and intercrop within each N treatment (one-way ANOVA with crop treatment as factor followed by a Tukey' test at *p* < 0.05), whereas different uppercase letters represent significant differences between N treatments within sole or intercrop (one-way ANOVA with N treatment as factor followed by a Tukey' test at *p* < 0.05)

N treatment	Crop treatment	Wheat				Lupin			
		N conc. (mg g ⁻¹)	P conc.	N acc. (mg plant ⁻¹)	P acc.	N conc. (mg g ⁻¹)	P conc.	N acc. (mg plant ⁻¹)	P acc.
N1	Sole crop	10.7 \pm 0.7 b B	2.1 \pm 0.1 a A	47.0 \pm 1.1 f	9.16 \pm 0.3 b B	27.7 \pm 0.5 a A	2.0 \pm 0.1 a A	182.6 \pm 6.8 a A	13.4 \pm 0.8 a A
	Intercrop	13.5 \pm 0.8 a B	2.3 \pm 0.2 a A	81.1 \pm 1.6 c	13.6 \pm 1.3 a A	25.7 \pm 0.4 b A	2.0 \pm 0.0 a A	151.5 \pm 15.4 a A	11.6 \pm 1.1 a A
N2	Sole crop	12.4 \pm 0.6 b AB	2.2 \pm 0.1 a A	62.0 \pm 1.5 e	10.9 \pm 0.4 b A	26.9 \pm 0.8 a A	2.0 \pm 0.0 a A	171.1 \pm 6.4 a A	12.9 \pm 0.3 a A
	Intercrop	13.9 \pm 0.2 a B	2.2 \pm 0.1 a A	100.5 \pm 1.5 b	15.8 \pm 0.6 a A	24.2 \pm 1.0 a A	2.0 \pm 0.1 a A	127.2 \pm 6.6 b AB	10.1 \pm 0.7 b A
N3	Sole crop	13.0 \pm 0.5 b A	2.2 \pm 0.1 a A	71.3 \pm 1.7 d	11.9 \pm 0.6 b A	25.9 \pm 0.7 a A	2.1 \pm 0.1 a A	145.3 \pm 6.5 a B	12.1 \pm 0.7 a A
	Intercrop	17.2 \pm 0.9 a A	2.6 \pm 0.3 a A	121.0 \pm 3.5 a	17.9 \pm 2.0 a A	23.7 \pm 1.2 a A	1.9 \pm 0.1 b A	109.3 \pm 8.0 b B	8.8 \pm 1.1 b A
		N conc. p-values	P conc. p-values	N acc. p-values	P acc. p-values	N conc. p-values	P conc. p-values	N acc. p-values	P acc. p-values
	Crop treatment	< 0.001	ns	< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.001	< 0.001
	N treatment	< 0.001	ns	< 0.001	< 0.01	ns	ns	< 0.001	ns
	Crop treatment x N treatment	ns	ns	< 0.01	ns	ns	ns	ns	ns

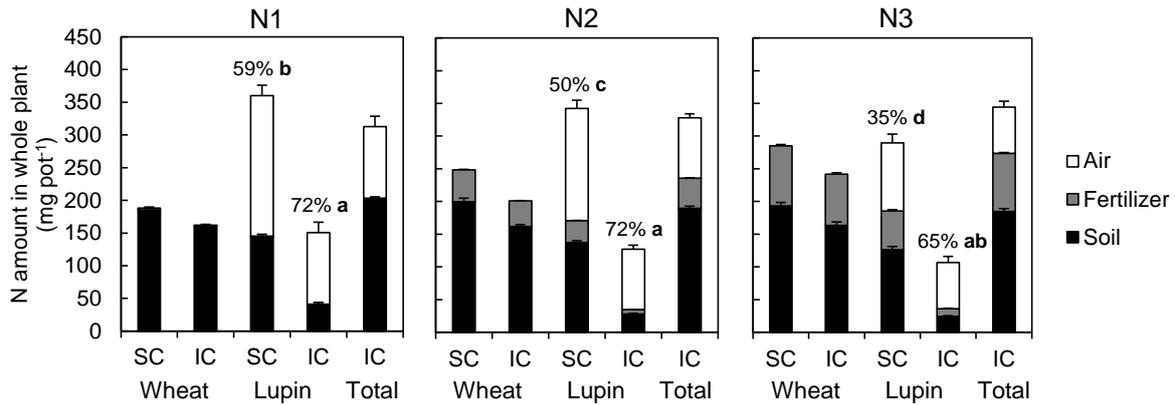


Fig. 2 Amount of nitrogen (N) derived from soil, fertilizer and air in whole plants (shoot+root) of wheat and lupin as sole crops (SC) or as intercrops (IC) within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates. Error bars represent standard errors. N amounts were calculated on a per pot basis considering 4 and 2 wheat plants in SC and IC treatments, and 2 and 1 lupin plants in SC and IC treatments. Percentages displayed above lupin bars represent the proportion of N derived from air (% Ndfa) on a per plant basis, within each N treatment. Different letters represent significant differences in %Ndfa between crop treatments along N1, N2 and N3 (Tukey's test at $p < 0.05$)

Rhizosphere chemical parameters

Nitrate ($N-NO_3$) concentration was significantly higher in the bulk soil compared to the rhizosphere, whereas less significant differences were found for ammonium ($N-NH_4$) (Table 2). Among crop modalities, $N-NO_3$ concentration in the lupin rhizosphere was 10-fold higher than that in wheat rhizosphere, and 3-fold higher than that of intercrop rhizosphere. For $N-NH_4$, intercrop and lupin rhizospheres were 2-fold higher than wheat rhizosphere. The DOC was significantly greater in the rhizosphere of lupin (Table 2). Indeed, DOC of lupin rhizosphere was 2-fold greater than that of intercrop rhizosphere and 17-fold greater than the mean of wheat rhizosphere and bulk soil. The Olsen-P concentration was significantly lower in the rhizosphere compared to the bulk soil, whatever the crop treatment (Table 2). Within the rhizosphere, wheat resulted in a significant increase (+26%) in Olsen-P compared to that of lupin, while it was not significantly different from that of intercrop. A systematic and significant alkalization of the rhizosphere compared to the bulk soil was observed (Fig. 3a), wherein lupin exhibited the lowest alkalization. The N treatments did not influence the pH values of the bulk soil nor those of the wheat rhizosphere. Conversely, within the rhizosphere, the pH of lupin was significantly lower than those of wheat and intercrop at N1 and N3, but not significantly different from that of intercrop at N2.

Table 2 N-NO₃, N-NH₄, Dissolved Organic Carbon (DOC) and Olsen-P concentrations in the rhizosphere of wheat, lupin and intercropping, all N treatments combined. Values were compared to bulk soil corresponding to unplanted control. Values are the mean of 21 or 9 replicates (for rhizosphere or bulk soil data, respectively) ± SE (standard errors). Within a column, different letters represent significant differences (Tukey's test at $p < 0.05$)

	N-NO ₃	N-NH ₄	DOC	Olsen-P
	mg kg ⁻¹ dry soil			
Wheat	0.80 ± 0.34 c	0.35 ± 0.07 b	28.94 ± 1.48 c	20.81 ± 0.59 b
Lupin	8.25 ± 1.51 b	0.67 ± 0.07 a	423.01 ± 34.40 a	16.55 ± 0.78 c
Intercropping	2.57 ± 1.13 c	0.71 ± 0.06 a	187.25 ± 25.68 b	18.81 ± 0.60 bc
Bulk soil	123.6 ± 9.19 a	0.45 ± 0.01 ab	21.40 ± 0.69 c	25.79 ± 0.41 a

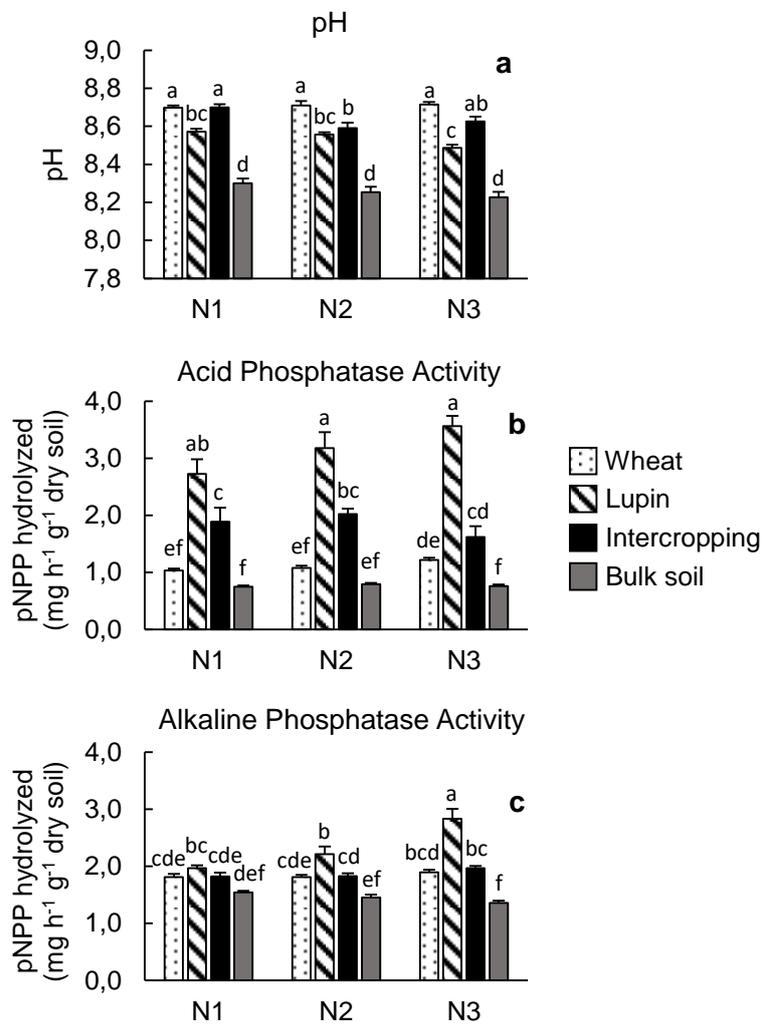


Fig. 3 Values of pH (a), acid (b) and alkaline (c) phosphatase activities measured in the rhizosphere of wheat, lupin and intercropping within different N treatments (N1, N2 and N3). Values were compared to bulk soil corresponding to unplanted control. Values are the mean of 7 or 3 replicates (for rhizosphere or bulk soil data, respectively). Error bars represent standard errors. Different letters represent significant differences between crop treatments along the three N treatments (Tukey's test at $p < 0.05$)

Rhizosphere microbial parameters and RME indices

Crop treatment had a significant effect on most soil microbial parameters (Table S2), whereas N treatment had a significant effect on MBN, AOB and AOA:AOB ratio. On average, all N treatments combined, acid phosphatase activity of lupin rhizosphere was 2.8-fold greater to that of wheat and 1.7-fold greater compared to that of intercrop (Fig. 3b). In the bulk soil, acid phosphatase activity was significantly lower than in the rhizosphere, except when compared to wheat rhizosphere at N1 and N2 (Fig. 3b). Within the rhizosphere, acid phosphatase activity ranked as follows: Lupin > Intercrop > Wheat. However, at N3, acid phosphatase activity in the rhizosphere of intercrop was not significantly different from that of wheat. Alkaline phosphatase activity exhibited less marked differences between crop treatments (Fig. 3c). As a general trend, alkaline phosphatase activity in the bulk soil was lower than in the rhizosphere, but this difference was only significant at N3. Within the rhizosphere, alkaline phosphatase activity of lupin was significantly higher than those of wheat and intercrop, except at N1. Alkaline phosphatase activities were similar between wheat and intercrop rhizospheres whatever the N treatments.

MBC was 2.4-fold higher in the rhizosphere relative to the bulk soil, but no significant differences were observed between crop treatments (Fig. 4a). In contrast, MBN was significantly higher in the bulk soil compared to the wheat rhizosphere, whereas no significant differences were found between bulk soil and the rhizosphere of lupin or intercrop (Fig. 4b). For MBP, no significant differences were observed between crop treatments (Fig. 4c). MBC : MBN and MBC : MBP ratios were significantly higher in the rhizosphere than in the bulk soil, except for MBC : MBN ratio of lupin rhizosphere (Fig. 4 d,e). Within the rhizosphere, MBC:MBN ratio of wheat was significantly higher than those of lupin and intercrop. No significant differences were observed between crop modalities within the rhizospheres for MBC : MBP ratio. The greatest abundances of bacterial (16S) and fungal (18S) genes were observed in the rhizosphere of lupin, while those observed in (i) wheat, (ii) intercropping and (iii) bulk soil were not different from each other (Fig. 4 f,g). Conversely, the 16S:18S ratio in the lupin rhizosphere was significant lower than that of wheat rhizosphere and bulk soil, yet similar to that of intercrop rhizosphere (Fig. 4h). Within the rhizosphere, the AOB abundance of lupin was significantly lower than those of wheat and intercrop, but that of the bulk soil was not significantly different from that of the rhizosphere (Fig. 4i).

The Relative Mixture Effects (RME) were significantly different from zero for 6 soil variables within some N treatments (Fig. 5) that allowed us to describe only trends of modification of rhizosphere functioning along N gradient. For all other variables and N treatments, a trend of additive effect of intercropping was found but not significantly different from zero enabling qualification of antagonism or synergistic. However, we noticed that the mixture effect on MBC is opposite to those

observed on MBN and MBP, shifting from an antagonistic trend to a synergistic one, with the same N1 to N3 rankings for the two latter variables. Significant antagonistic effect of the mixture was observed for N-NO₃ at N1 (-62%) and N2 (-74%), for acid and alkaline phosphatase activities at N3 (-32% and -16%, respectively), for total fungi abundance (18S) at N2 (-28%) and for DOC at N3 (-48%). Instead of the antagonistic behavior of the mixture for N-NO₃ at N1 and N2, a synergistic trend was observed at N3. For acid and alkaline phosphatases a significant antagonistic effect was estimated whereas trends were only noticed for other N levels. Except for the synergistic trend noticed at N1 for total fungi abundance (18S), antagonistic effect of the mixture was reported for the N3 and N2 treatments, although significant only for N2. A significant synergistic effect of intercropping was observed for pH at N1, with a positive RME of 0.75%.

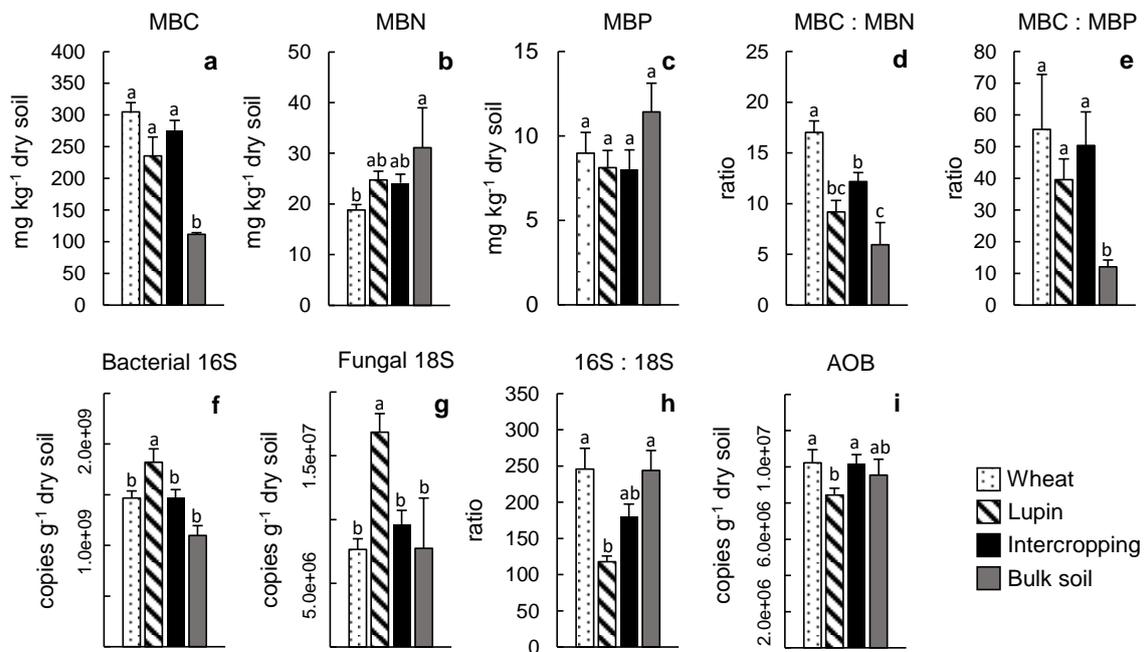


Fig. 4 Microbial biomass carbon (MBC) (a), microbial biomass nitrogen (MBN) (b), microbial biomass phosphorus (MBP) (c), ratios between C and N (d) and C and P (e) in microbial biomass, abundances of bacteria (16S) (f) and fungi (18S) (g), ratio between bacteria and fungi (h) and abundance of Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) (i) in the rhizosphere of wheat, lupin and intercropping, all N treatments combined. Values were compared to bulk soil corresponding to unplanted control. Values are the mean of 7 or 3 replicates (for rhizosphere or bulk soil data, respectively). Error bars represent standard errors. Different letters represent significant differences between crop treatments (Tukey's test at $p < 0.05$)

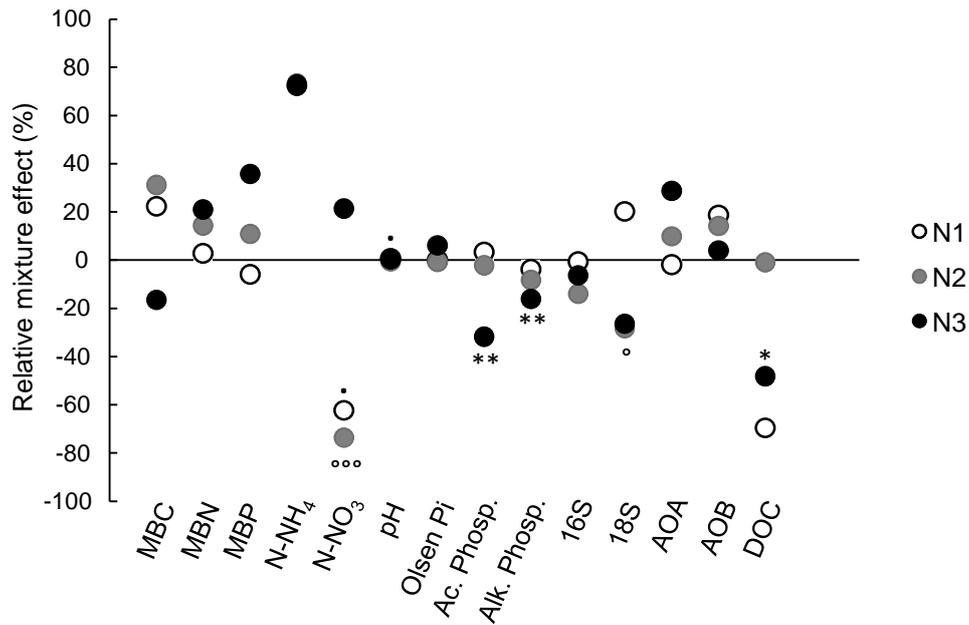


Fig. 5 Relative Mixture Effects (RME) on all chemical (N-NO₃, N-NH₄, Olsen-P, DOC, pH) and microbial (MBC, MBN, MBP, acid and alkaline phosphatases activities and abundances of 16S rRNA, 18S rRNA, AOA and AOB genes) parameters of rhizosphere according to different N treatments (N1 = white circle, N2 = grey circle, N3 = black circle). For the sake of clarity, mainly in the cases where circles were superposed, the following (·), (-) and (*) symbols indicate significant differences from zero (according to a Student's t-test) within N1, N2 and N3 treatments, respectively. Number of symbols (one, two or three) represents the significance of the test ($p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively)

4. Discussion

In our experiment, the total DW of the intercropped wheat systematically increased compared to the sole wheat whatever N treatments. Describing plant-plant interactions is essential to identify the drivers of plant communities on ecosystem functioning through above-below ground interactions. The Relative Interaction Indices (RII) revealed a positive effect of intercropping on total DW of wheat whatever soil N treatments. For lupin a negative effect was only observed at N2, while no effect occurred at N1 and N3. Thereby, these patterns depicted commensalism type of interactions between the intercropped species at N1 and N3, while antagonism was found only at N2. Observed plant interactions may be partly attributed to N fixation rates. Indeed, lupin exhibited important %Ndfa. However, %Ndfa varied according to N treatments highlighting influence of the N gradient on plant interactions influencing N fixation when intercropped. Indeed, N₂-fixation of sole lupin (%Ndfa) systematically decreased along the N gradient, reaching the minimum at N3 (35%), while N₂-fixation of intercropped lupin was not changed. Hence, intercropped lupin succeeded to maintain high %Ndfa compared to sole lupin in presence of ¹⁵N urea. As a consequence of the N resource partitioning in the wheat-lupin intercrops, intercropped wheat accumulated more N than sole wheat, in agreement with

previous studies (Bedoussac & Justes, 2010b; Betencourt et al., 2012), but also more P, in agreement with others studies (Dissanayaka et al., 2015; Li et al., 2016a), whatever the N treatment. Increasing total soil N level from N2 to N3 promoted a significant increase of N concentration in intercropped wheat, while the N concentration in sole wheat remained unchanged. Additional supply of N fertilizer (N2 to N3) was thus better used by the intercropped wheat compared to the sole wheat. One should note that, in our system device, plant density in intercrops is twice lower than that of sole crops. Accordingly, each intercropped wheat plant has potentially more nitrogen available while we noticed that lupin did not rely entirely on N₂ fixation to its nitrogen nutrition, competing with wheat plants.

Originated from plant ecology, the Stress Gradient Hypothesis has recently arisen to explain performances of intercropping in agroecosystems. Soliveres et al. (2015) recently reviewed the importance of the context to define a gradient of stressful environment. As our N gradient was relatively high, it was challenging to observe plant interactions. However, past studies have often concluded about benefits of intercropping at low-input conditions (Bedoussac et al., 2015) but our results were in line with other studies about intercropping benefits also occurring at high soil N levels (Li et al., 2011; Li et al., 2005; Stoltz & Nadeau, 2014). Betencourt et al. (2012) validated the Stress Gradient Hypothesis for P as facilitation was only observed at low P availability, while long term P fertilization did not result in such positive interaction in a cereal-legume intercrop. Improved acquisition of P has been reported in the context of cereal-legume intercrops (Dissanayaka et al., 2015; Latati et al., 2016). Soil P availability in such context is improved by direct and indirect chemical and biological processes occurring in the rhizosphere (Hinsinger et al., 2011). We also noticed intense rhizosphere processes related to P availability (Olsen-P) in the rhizosphere of our different crop modalities. Indeed, pH, phosphatase activities, MBC and DOC significantly and systematically increased in the rhizosphere compared to the bulk soil. In particular, the highest levels of acid phosphatase activity and DOC were systematically observed in the lupin rhizosphere. Hence, as fungal and bacterial communities were particularly more abundant in the rhizosphere of lupin, we estimated that phosphatases activities measured in our study could be attributed to these microorganisms, and especially to fungi (Tarafdar et al., 2001), rather than to direct secretion by lupin cluster roots (Wasaki et al., 2003). Indeed, high levels of DOC observed in the lupin rhizosphere could have promoted fungal growth as depicted by (Hannula et al., 2012) for some fungal communities in rhizosphere potatoes. Rhizosphere alkalization as a consequence of nitrate absorption by plant roots has also been pointed out as a main process to increase P availability (Devau et al., 2008; Devau et al., 2011). Interestingly, we systematically observed a moderate but significant alkalization of the rhizosphere compared to bulk soil, especially for wheat. In addition, we found a poor but positive correlation between pH and Olsen-P in the rhizosphere ($r^2 = 0.21$, slope = 18.05, $p = 0.0001$). These significant differences of pH between rhizosphere and bulk soil were not expected considering our soil type (calcareous) and

especially for lupin. Indeed, in our calcareous soil, pH-buffering capacity could be considered as important (Bache, 1984) limiting pH changes. One should note that N was applied as urea, considered as ammoniacal N form due to its rapid hydrolysis in soils. We then speculated that an intense nitrification in the rhizosphere may have occurred to cope with the nitrate-fed alkalization hypothesis to explain observed pH changes in sole wheat rhizosphere. Concerning lupin, our results were more surprising because combining N₂ fixation process and cluster roots are reported to contribute to pH decrease in the rhizosphere (Sas et al., 2002). However, white lupin has been reported to alkalize its rhizosphere when NO₃-N supply is dominant (Wang & Tang, 2017). In accordance, the reduced pH alkalization in the lupin rhizosphere may be attributed to lower nitrification activity due to lower AOB abundance in the rhizosphere of lupin compared to sole wheat rhizospheres while AOA abundance were not significantly different. As nitrification is an acidifying process (Bolan et al., 1991) and taking into account the values of %Ndfa in lupin indicated that soil mineral N was not the preferential N pool, we may have to consider with caution the nitrate fed hypothesis to explain alkalization in lupin rhizosphere. More complex geochemistry reactions in the rhizosphere of lupin have to be investigated as protonation of DOC or sulfates absorption by plants to fully explain such alkalization in the lupin rhizosphere. Our MBP results were not consistent with others results pointing out that intercropping promoted P storage in microbial biomass in the rhizosphere (Tang et al., 2014), which can be released in the vicinity of roots during microbial turnover (Irshad et al., 2012; Irshad et al., 2011). In our study, we estimated a significant and negative correlation between Olsen-P and MBP in the intercrop rhizosphere ($r^2 = 0.28$, slope = -0.34, $p = 0.015$) or bulk soil ($r^2 = 0.57$, slope = -0.19, $p = 0.011$), while no significant correlation was found in the rhizosphere of sole crops or when combining the rhizosphere of all crop treatments. Such results between rhizosphere and bulk soil suggested that microbes compete efficiently with plants for P. In addition, we systematically found that Olsen-P was significantly lower in the rhizosphere compared to bulk soil, which is not consistent with other studies (Tang et al., 2016; Tang et al., 2014) for similar soil type. As we measured higher total DW under intercropping compared to sole crops, we hypothesized that available P was depleted in the rhizosphere compared to bulk soils P in order to sustain crop growth or N fixation in the lupin sole crop (Schulze et al., 2006).

We can reasonably affirm that N fertilization rates altered rhizosphere processes such as pH modification or phosphatases activities which determines P availability in the rhizosphere. Our contrasted results relative to the existing literature pointed to different mobilizing processes in the rhizosphere in cereal-legume intercrops when fertilized in a calcareous soil. In accordance with Kuzyakov & Blagodatskaya (2015) and Wurst & Ohgushi (2015), we hypothesized that plants are able to generate some plant-soil feedback along their crop cycles through their zones of influence, *i.e.* the rhizosphere that may contribute to a plant legacy after disappearance of the causal plant. Accordingly, we calculated a relative mixture effect (RME) based on chemical and microbial soil quality indicators

(Schloter et al., 2018) to verify this hypothesis. Our hypothesis was partly verified considering positive and negative RME values while few were significantly different from 0. The soil N gradient significantly altered some intercropping effects on N-NO₃⁻, pH, phosphatases activities, DOC and 18S gene copies and tended to modify C and N microbial biomass and abundances of ammonia oxidizers. Indeed, the N3 treatment induced more significant antagonistic (negative values of RME, n=3) effects compared to N2 (n=2) and N1 (n=1). One should also note that calcareous soil type may have limited the effects of intercropping in the present study. We can therefore conclude that a N gradient promoted some effects of intercropping on the soil parameters investigated in our study that should be further studied to understand plant-soil interactions as discussed by in 't Zandt et al. (2019).

5. Conclusions

Our study showed that, whatever the soil N level, soil parameters in the intercropping rhizosphere were either i) maintained or ii) improved relative to wheat or lupin sole crops. Moreover, a high input N gradient was able to alter important soil variables such as pH and phosphatases in the rhizosphere under intercropping, while exerted some trends on N-NO₃⁻, dissolved organic carbon and total fungi (18S gene) abundance. Our results were unexpected for a calcareous soil type, especially for pH. Accordingly, fertilization of cereal-legume intercropping could be further investigated in order to trade off farmer's production goals for grain yield and grain protein content and design successful legacies for the consecutive crop.

Acknowledgements

The authors want to thank Centre Mondial de l'Innovation (Roullier) staff and in particular Amandine Nedellec and Bastien Billiot for their fundamental support during the conduction of the greenhouse experiment. We are also very grateful to the UMR SAS staff for their important participation to the harvests campaigns. Particularly, authors want to thank Béatrice Trinkler for her precious support throughout the experiment and very helpful assistance in the laboratory.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1 Results (*p*-values) of two-way ANOVA (crop treatment x N treatment) performed on total (shoot+root) dry weight of plants for each species (wheat and lupin), and on percentage of nitrogen derived from air (%Ndfa) for lupin.

	Total dry weight		% Ndfa
	Wheat	Lupin	Lupin
Crop treatment	< 0.001	< 0.01	< 0.001
N treatment	< 0.01	< 0.05	< 0.001
Crop treatment x N treatment	ns	ns	< 0.01

Table S2 Results (*p*-values) of two-way ANOVA (crop treatment x N treatment) performed on all chemical (N-NO₃, N-NH₄, Olsen-P, DOC, pH) and microbial parameters (MBC, MBN, MBP, MBC:MBN ratio, MBC:MBP ratio, Acid and Alkaline phosphatases activities, abundances of bacteria (16S), fungi (18S), AOA and AOB genes, as well as their ratios) measured in the rhizosphere of the three crop modalities and in the bulk soil.

	N-NO ₃	N-NH ₄	DOC	Olsen-P	pH	Ac. Phosp.
Crop treatment	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
N treatment	< 0.001	< 0.01	ns	ns	< 0.01	< 0.05
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	< 0.01	< 0.05
	Alk. Phosp.	MBC	MBN	MBP	MBC : MBN	MBC : MBP
Crop treatment	< 0.01	< 0.001	< 0.05	ns	< 0.001	< 0.01
N treatment	< 0.001	ns	< 0.01	ns	ns	ns
Crop treatment x N treatment	< 0.001	ns	ns	ns	ns	ns
	16S	18S	16S : 18S	AOA	AOB	AOA : AOB
Crop treatment	< 0.001	< 0.001	< 0.001	ns	< 0.05	ns
N treatment	ns	ns	ns	ns	< 0.001	< 0.001
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns

CHAPITRE 4

Improved acquisition of potassium,
calcium, magnesium and sulfur in
wheat intercropped with white lupin
as affected by nitrogen availability

Ce chapitre correspond à un article en format *short-communication* en préparation pour soumission dans la revue *Plant Physiology and Biochemistry*, comprenant les résultats de l'Expérience 1 (récolte à la floraison).

- L'objectif de ce chapitre a été d'évaluer si un gradient de N minéral dans le sol pourrait affecter la concentration et l'accumulation des nutriments K, Ca, Mg et S dans les parties aériennes et racinaires du blé tendre et du lupin blanc cultivés en culture mono-spécifique ou en association.

Improved acquisition of potassium, calcium, magnesium and sulfur in wheat intercropped with white lupin as affected by nitrogen availability.

Ana Beatriz de Oliveira^a, Philippe Hinsinger^b, Mustapha Arkoun^c, Jean Claude Yvin^c, Edith Le Cadre^{a,1}

^aUMR SAS, AGROCAMPUS OUEST, INRA, bâtiment 13, 65 rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042, Rennes Cedex, France. E-mail: ana-beatriz.de-oliveira@inra.fr

^bUMR Eco&Sols, Univ Montpellier, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Bâtiment 12, 2 Place Viala, 34060, Montpellier Cedex 2, France. E-mail: philippe.hinsinger@inra.fr

^cCentre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, 18 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France. E-mail : mustapha.arkoun@roullier.com

¹ corresponding author :

Bâtiment 8, UMR Sol Agro hydrosystème Spatialisation, 65 rue de Saint Brieuc, CS 84 215, 35 042 Rennes cedex, France

E-mail: edith.lecadre@agrocampus-ouest.fr

Tel.: +33 (0)2 23 48 54 74

Abstract

Cereal-legume mixture is a well-known successful intercrop model for an efficient use of soil nutrients. The effects of cereal-legume intercrops and soil nitrogen (N) management on plant nutrition have been widely investigated for N and phosphorus (P). Here we assessed the effects of a wheat (*Triticum aestivum*) / white lupin (*Lupinus albus*) intercrop and a soil mineral N gradient on the acquisition of other major nutrients: potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S). Accordingly, a greenhouse pot experiment was conducted with wheat and white lupin grown as sole crops and intercropped along a soil mineral N gradient obtained by N addition. Plants were harvested at flowering stage and concentrations and accumulation of K, Ca, Mg and S were measured in shoots and roots. Our results showed that, unlike lupin, wheat greatly benefited from the intercropping for acquisition of all macronutrients, but that a marked N fertilization gradient effect on nutrient acquisition between species was not evident.

Keywords: intercropping; plant nutrition; macronutrient; N fertilization; competition

1. Introduction

Intercropping, *i.e.* the simultaneous growth of two or more crops in the same field during a significant part of their life cycles (Willey, 1990), is an agroecological solution emerging as an alternative to decrease the excess use of fertilizers and the environmental impact of conventional agriculture (Brooker et al., 2015; Duchene et al., 2017). Yield gains or greater stability of yields of intercrops relative to sole crops at low inputs (Brooker et al., 2015), enhanced soil quality (Cong et al., 2015; de Oliveira et al., 2020) and provisioning of many ecosystems services (Martin-Guay et al., 2018) have been repeatedly reported in the literature. Positive interactions between intercropped species, such as facilitation and niche complementarity, have been shown to induce better utilization of resources such as light, water, and also major nutrients like nitrogen (N) and phosphorus (P) (Brooker et al., 2015; Duchene et al., 2017; Ehrmann & Ritz, 2014). In particular, cereal-legume mixture is a successful type of intercrop as legumes are able to access the additional pool of atmospheric N₂ through symbiotic fixation, while reducing the competition with the cereal for soil mineral N (Bedoussac et al., 2015; Bedoussac & Justes, 2010a; Hinsinger et al., 2011). In addition, facilitation of P uptake in cereal-legume intercrops has also been reported in the literature (Betencourt et al., 2012; Dissanayaka et al., 2015; Latati et al., 2016), owing to the capacity of legumes to exude large amounts of P-mobilizing compounds that in turn improve its own P nutrition but also that of the intercropped cereal (Hinsinger et al., 2011). Despite an increasing body of literature on the effects of cereal-legume intercrops on N and P nutrition, their impact on other major nutrients such as potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) have been seldom studied, although a few works suggested also positive effects of intercropped on such nutrients (Andersen et al., 2007; Hauggaard-Nielsen et al., 2009; Li et al., 2004a). In addition, the greater accumulation of those nutrients in intercrops is pointed out to affect overall crop yields and therefore the competitive ability for taking up and utilizing other resources such as light or water (Hauggaard-Nielsen et al., 2009) and ultimately grain yields. Finally, N fertilization is able to affect the acquisition of nutrients others than N and P in cereal crops (Hamnér et al., 2017). It is thus needed to further investigate how N management is affecting the acquisition of other macronutrients in intercropping systems. Accordingly, we aimed to assess the effect of a N fertilization gradient on K, Ca, Mg and S concentration and accumulation in above- and belowground plant tissues for intercropped wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Lennox) and lupin (*Lupinus albus* L. cv. Feodora) grown under greenhouse conditions.

2. Material and Methods

A calcareous cambisol was collected (0-15 cm depth) from the INRA experimental station located at Mauguio in Southern France (3°59'6"E, 43°37'13"N) three months after pea (*Pisum sativum* L.) harvest. The soil was sieved at 1-cm to remove any coarse organic material, air dried and stored in sealed buckets at ambient temperature until the establishment of the greenhouse experiment. Before greenhouse experiment, the soil was re-sieved with a 4-mm mesh and then mixed with perlite to allow better conditions for root development. Pots (4 dm³) were filled with 2 kg of soil and 0.2 kg of perlite. The final soil+perlite mixture exhibited the following mean properties: clay 202 g kg⁻¹, silt 454 g kg⁻¹, sand 343 g kg⁻¹, total CaCO₃ 39 g kg⁻¹, pH_w 8.3, CEC_{Metson} 15 cmol₊ kg⁻¹, organic C 10.4 g kg⁻¹, total N 0.95 g kg⁻¹, ammonium (N-NH₄⁺) 20 mg kg⁻¹, nitrate (N-NO₃⁻) 39 mg kg⁻¹, inorganic available P (Olsen extraction method) 33.9 mg kg⁻¹.

The greenhouse pot experiment was conducted at Centre Mondial de l'Innovation (Roullier Group – Saint-Malo, France) during 61 days, using a full factorial design with three N treatments (N1 = 2, N2 = 33 and N3 = 65 mg N kg⁻¹ dry soil added as a ¹⁵N-labelled urea) and three crop treatments: wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Lennox) grown as sole crop; white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Feodora) grown as sole crop; wheat-white lupin intercrop. In sole crop treatment, 12 seeds of wheat or 6 seeds of white lupin were sown per pot and thinned to 4 and 2 individuals, respectively, after emergence. For the intercrop treatment, seeds were sown at half the densities of those achieved for sole crops, *i.e.* 2 individuals of wheat and 1 individual of white lupin per pot. Pots were arranged in a complete randomized design with seven replicates. Throughout the course of the experiment, pots were automatically and daily watered to maintain water content at 75% of Water Holding Capacity (WHC = 28%) of the soil+perlite mixture. The air temperature in the greenhouse was 22.7 ± 2.1°C, and the incident photosynthetically active radiation was 200 μmol s⁻¹ m⁻² on average, with a 16 h photoperiod.

Plants (shoots and roots) were harvested at 61 days after sowing, when most individuals of both species were in full flowering stage. For intercropped treatments, the root systems of the two species were carefully separated by hands to avoid excessive breakage. Within a pot, shoots or roots from all plants of a given species were assembled to constitute a unique shoot or root sample per species. Roots were carefully rinsed with deionized water in order to eliminate remaining soil particles. The dry weights of shoots and roots were measured after drying at 70°C for 3 days. Potassium, Ca, Mg and S concentrations in shoots and roots were determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) after digestion of 100 mg of finely ground material in a microwave oven (Multiwave PRO, Anton Paar, Austria) with concentrated HNO₃ (65%) at 200°C.

The effects of crop and N treatments on K, Ca, Mg and S concentration and accumulation in shoots and roots were initially tested by two-way ANOVA. In absence of interaction between factors (crop treatment x N treatment; Table S1 and S2), one-way ANOVA was performed to test differences between crop treatments within a given N treatment. When necessary, data were squared root or log-transformed to cope with the ANOVA requirements. Significant differences between means were tested by Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$). All statistical analyses were performed with R software v. 3.5.1 (R Core Team, 2018). The additional packages "car" and "agricolae" were used for ANOVA and Tukey's tests, respectively.

3. Results and Discussion

Within each soil N treatment, intercropping systematically induced a positive effect on wheat and a negative effect on lupin, whether in terms of nutrient concentration or accumulation (Fig. 1 and 2; Table S3). These effects were however not always significant. Except for Mg in roots at N3, intercropped wheat systematically and significantly accumulated more K, Ca, Mg and S in both shoots and roots, whatever the N treatment (Fig. 1a). In contrast, for lupin, significant differences in nutrient accumulation between crop treatments were mainly observed for shoots (Fig. 1b). Except for Ca and Mg at N1, a systematic and significant decrease of K, Ca, Mg and S accumulation in shoots was observed for intercropped lupin, whatever the N treatment. For lupin roots, significant decreases between inter and sole crop treatments were only observed for S accumulation at N2 and N3. These patterns may be largely due to a i) systematically greater dry weight of shoots and roots of intercropped wheat, compared to sole wheat, whatever the N treatment, and to a ii) lower shoot dry weight of intercropped lupin at N2 and N3 (Fig. S1). These findings are supported by other studies in which the biomass of cereals was significantly increased by intercropping, while that of intercropped legumes was significantly decreased or remained unchanged (Latati et al., 2014; Li et al., 2008; Li et al., 2003a). Interestingly, the only significant differences between crop treatments for K concentrations in wheat were observed at N3 (Fig. 2a). In contrast, for all N treatments, K concentrations in lupin shoots systematically and significantly decreased when intercropped with wheat, whereas K concentrations in roots of intercropped lupin significantly decreased only at N3 (Fig. 2b). These results may be attributed to competition for K between the two species and suggest a lower competitiveness of lupin when intercropped, thus resulting in lower K accumulations and concentrations in shoots. Our results are partially consistent with those of Inal et al. (2007) who reported an increase in K concentrations in the shoots of both the cereal (maize) and the legume (peanut) when intercropped in a glasshouse experiment. However, in a field experiment with or without root barriers, Li et al. (2003b) observed

that maize-faba bean intercropping did not affect the K nutrition of the two species, which was explained by a sufficient supply of soil K for both species. We can assume that differences in K acquisition between the intercropped wheat and lupin in our study could rather be attributed to differences in root architecture between the two species. Indeed, as root length density of wheat can be two- to tenfold higher than that of lupin (Bramley et al., 2007), we suggest that this characteristic could be associated to a greater competitiveness of wheat for poorly mobile soil nutrients that are predominantly transferred by diffusion in the rhizosphere, such as potassium (Wendling et al., 2016). In addition, our results need to be interpreted accounting for our experimental set up which contained roots in a restricted soil volume exacerbating plant competition. The halved density of wheat in intercropping compared to sole crop also need to be taken into account. We also noticed some competition for S (Fig. 1b and 2b). Indeed, like for K, not only S accumulation but also S concentration was significantly reduced in lupin shoots and roots when intercropped with wheat, except for roots at N1 (Fig. 1b and 2b). Even if a significant effect of the intercropping on S concentration of wheat shoots was only observed at N3 (Fig. 2a), S accumulations in intercropped wheat were systematically greater than those of sole wheat at all N levels (Fig. 1a). These findings are opposite to those reported by Andersen et al. (2007) for barley intercropped with pea. As a result of the greater performance of pea, which dominated the intercrop, these authors found that S accumulation in pea was not changed by intercropping, while that of barley was reduced, on a per plant basis. Sulfur deficiency on nitrogen and carbon metabolism of legumes have been reported (Becana et al., 2018; Zuber et al., 2013) with consequences on N₂ fixation and yields. We could speculate that the S accumulation of intercropped wheat and dry matter for higher N fertilization altered in turn the S nutrition of lupin reducing the total DW of intercropped lupin. We agreed then the statement of Andersen et al (2007) about the pivotal role of nitrogen availability in nutrient dynamics of intercropped cereal – legume, especially sulfur. In terms of Ca concentrations, the only significant differences were observed for wheat roots, whatever the N treatment (Fig. 2a). For Mg concentrations, significant differences between crop treatments were only observed for wheat shoots at N2 and N3 (Fig. 2a), and for lupin shoots at N3 (Fig. 2b). As reported by Li et al. (2004a), we attributed the higher acquisition of Ca and Mg by intercropped wheat to its greater biomass relative to that of the intercropped lupin, enhancing water consumption by intercropped wheat and consequently a greater absorption of Ca and Mg via mass flow. Finally, like for K and S concentrations, Mg concentrations in shoots of intercropped wheat were significantly greater than those of sole wheat only at higher levels of soil mineral N. This suggests that enhancing N supply can, in addition to the increase of N nutrition, affect the demand of other nutrients that are also essential for crop growth (Hamnér et al., 2017). Therefore, extra attention need to be dedicated to monitoring the levels of the other macronutrients in soils, in order to ensure that plant nutrient demands are adequately met (Hamnér et al., 2017) in intercrops.

In conclusion, our results showed that wheat greatly benefited from the intercropping for acquisition of all macronutrients, at the expense of lupin with a particular insight on S nutrition. Even though our N fertilization gradient did not have a marked effect on nutrient acquisition between crop treatments, some trends pointed out that the N management should be carefully considered in cereal-legume intercrops, in order to optimize acquisition of macronutrients and avoid yield reduction due to unbalanced nutrition.

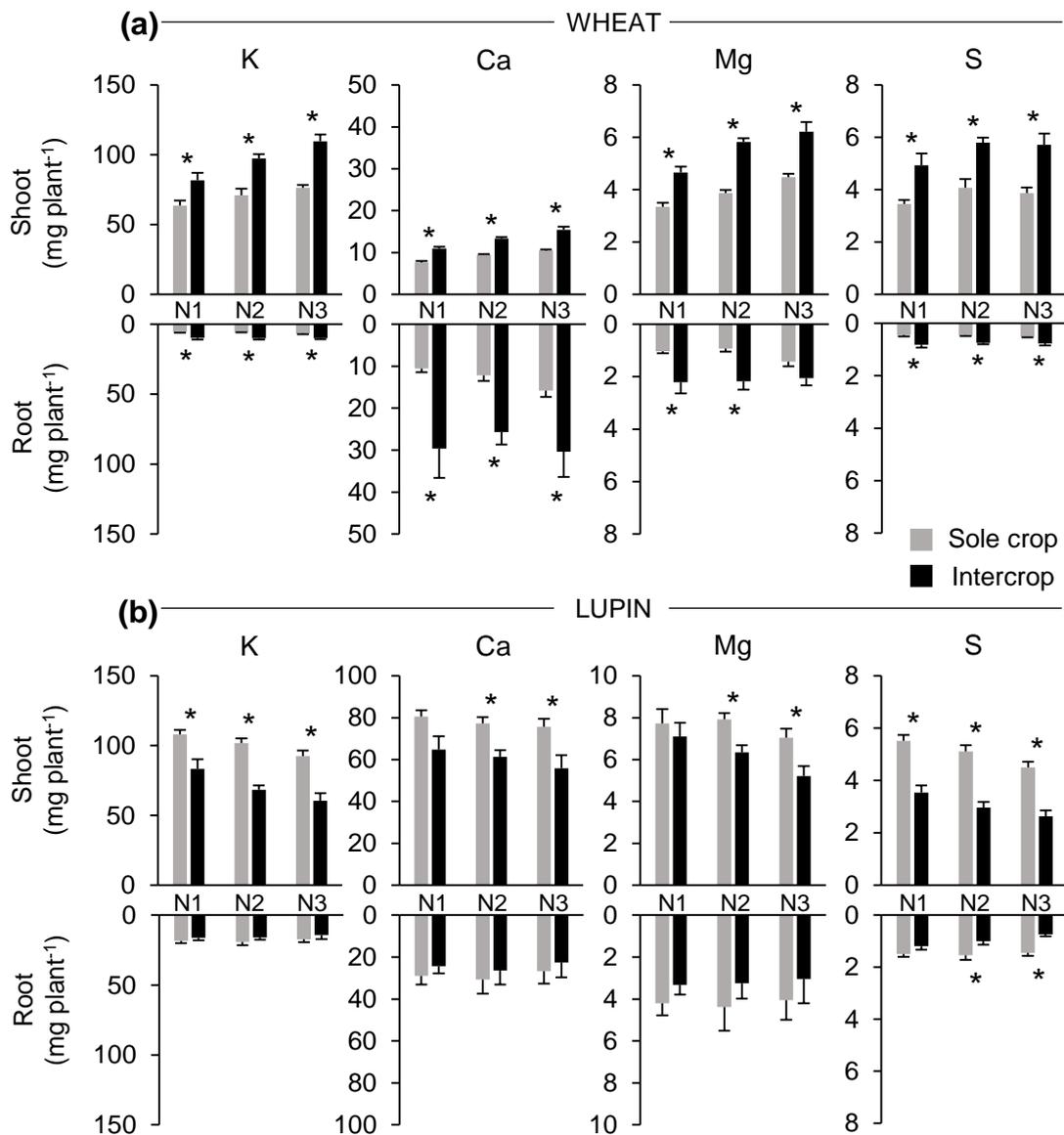


Fig. 1 Potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) accumulation (mg plant⁻¹) in shoots (upper bars) and roots (lower bars) of wheat (a) and lupin (b) as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates. Error bars represent standard errors. Stars stand for significant differences between crop treatments within each N treatment (Tukey's test at $p < 0.05$).

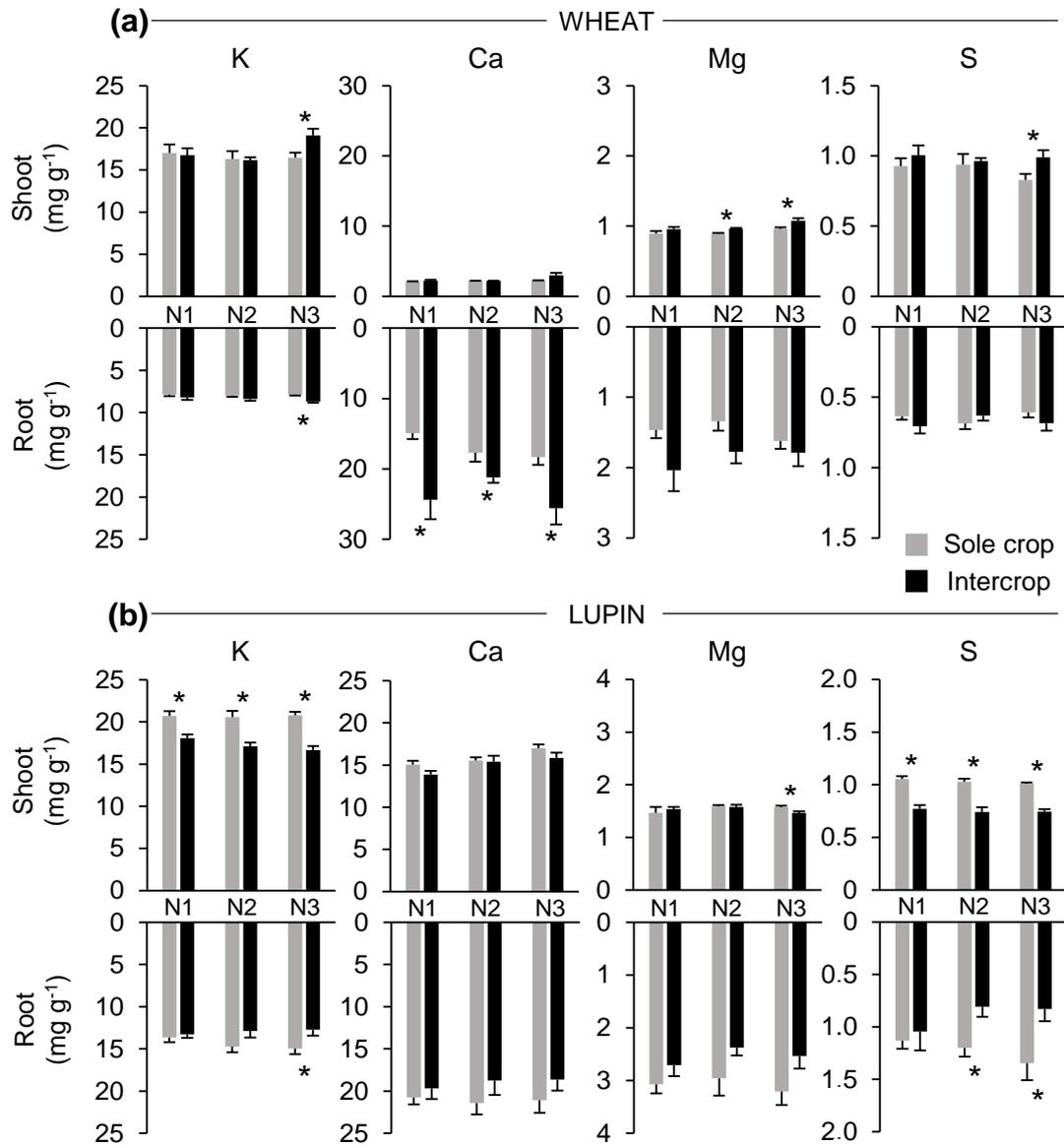


Fig 2. Potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) concentrations (mg g^{-1} of dry weight) in shoots (upper bars) and roots (lower bars) of wheat (a) and lupin (b) as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates. Error bars represent standard errors. Stars stand for significant differences between crop treatments within each N treatment (Tukey's test at $p < 0.05$).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1 Results (*p*-values thresholds) of two-way ANOVA (crop treatment x N treatment) performed on potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) accumulation in shoots and roots of wheat and lupin as sole crops or as intercrops.

SHOOT								
	K		Ca		Mg		S	
	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin
Crop treatment	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.05	< 0.001	ns	< 0.01	< 0.001
N treatment	ns	ns	< 0.001	ns	< 0.01	ns	ns	< 0.05
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ROOT								
	K		Ca		Mg		S	
	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin
Crop treatment	< 0.001	ns	< 0.01	ns	< 0.01	ns	< 0.001	ns
N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table S2 Results (*p*-values thresholds) of two-way ANOVA (crop treatment x N treatment) performed on potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) concentration in shoots and roots of wheat and lupin as sole crops or as intercrops.

SHOOT								
	K		Ca		Mg		S	
	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin
Crop treatment	ns	< 0.001	ns	< 0.05	< 0.001	ns	< 0.05	< 0.001
N treatment	ns	ns	ns	< 0.01	< 0.001	ns	ns	ns
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ROOT								
	K		Ca		Mg		S	
	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin	Wheat	Lupin
Crop treatment	< 0.01	< 0.01	< 0.001	< 0.05	< 0.05	< 0.01	ns	< 0.001
N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Crop treatment x N treatment	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table S3 Results (*p*-values) of one-way ANOVA (crop treatment as factor) performed on potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulfur (S) accumulation or concentration in shoots and roots of wheat and lupin as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Number of stars (one, two or three) indicates the test significance level ($p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively).

N treatments	WHEAT				LUPIN			
	Accumulation in Shoots				Accumulation in Shoots			
	K	Ca	Mg	S	K	Ca	Mg	S
N1	0.0155*	0.0001***	0.0005***	0.0104*	0.0067**	0.0603	0.5156	0.0001***
N2	0.0005***	0.0000***	0.0000***	0.0007***	0.0000***	0.0030**	0.0056**	0.0000***
N3	0.0000***	0.0000***	0.0008***	0.0022**	0.0005***	0.0167*	0.0155*	0.0001***
	Accumulation in Roots				Accumulation in Roots			
	K	Ca	Mg	S	K	Ca	Mg	S
N1	0.0051**	0.0134*	0.014*	0.006**	0.4238	0.4207	0.2601	0.1012
N2	0.0002***	0.0012**	0.003**	0.0005***	0.2706	0.6582	0.4204	0.0289*
N3	0.0063**	0.0379*	0.0805	0.0043**	0.406	0.6687	0.5083	0.0004***
	Concentration in Shoots				Concentration in Shoots			
	K	Ca	Mg	S	K	Ca	Mg	S
N1	0.8376	0.2246	0.1734	0.4021	0.0024**	0.0891	0.5795	0.0000***
N2	0.8984	0.7729	0.0004***	0.7582	0.0017**	0.8375	0.8536	0.0002***
N3	0.0183*	0.0808	0.0186*	0.0341*	0.0000***	0.1625	0.0279*	0.0000***
	Concentration in Roots				Concentration in Roots			
	K	Ca	Mg	S	K	Ca	Mg	S
N1	0.3414	0.0071**	0.1010	0.2144	0.6050	0.4989	0.2083	0.6677
N2	0.1674	0.0386*	0.0667	0.3359	0.0951	0.2421	0.1335	0.0091**
N3	0.0024**	0.0165*	0.4724	0.2552	0.0417*	0.2371	0.0776	0.0241*

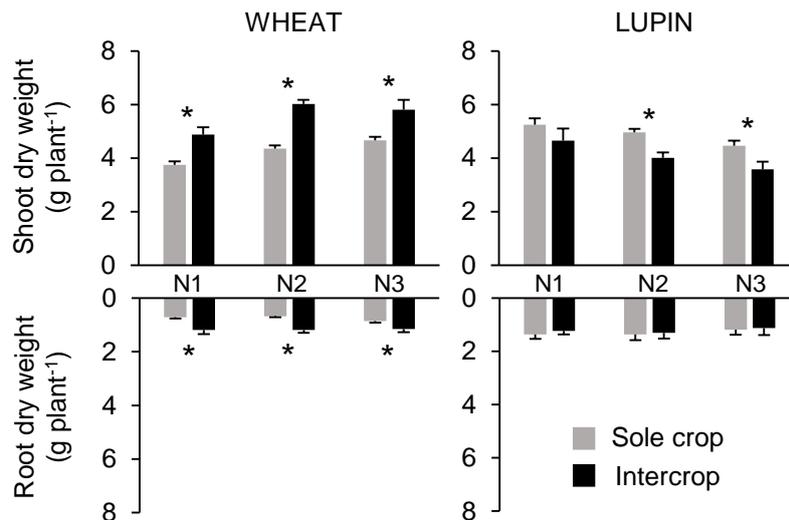


Figure S1 Dry weight of shoots and roots of wheat and lupin as sole crops or as intercrops within each N treatment (N1, N2, N3). Values are the mean of 7 replicates. Error bars represent standard errors. Stars stand for significant differences between crop treatments within each N treatment (Tukey's test at $p < 0.05$).

CHAPITRE 5

Short-term plant legacy alters the
resistance and resilience of soil
microbial communities exposed to
heat disturbance in a Mediterranean
calcareous soil

Ce chapitre correspond à un article **publié** dans la revue *Ecological Indicators*, comprenant les résultats de l'Expérience 2.

de Oliveira, A. B., Cantarel, A. A. M., Seiller, M., Florio, A., Bérard, A., Hinsinger, P., and Le Cadre, E. (2020). Short-term plant legacy alters the resistance and resilience of soil microbial communities exposed to heat disturbance in a Mediterranean calcareous soil. *Ecological Indicators* **108**, 105740.

- L'objectif de ce chapitre a été d'évaluer si après un cycle cultural l'association blé-lupin a induit un effet d'héritage différent de celui exercé par les cultures mono-spécifiques dans les communautés microbiennes du sol, se traduisant également en une résistance et une résilience différentes de ces communautés en termes d'activités liées aux cycles de C et N, face à un stress thermique (48°C, 2 jours).

Short-term plant legacy alters the resistance and resilience of soil microbial communities exposed to heat disturbance in a Mediterranean calcareous soil.

Ana Beatriz de Oliveira^a, Amélie A. M. Cantarel^b, Marie Seiller^a, Alessandro Florio^b, Annette Bérard^c, Philippe Hinsinger^d, Edith Le Cadre^{a,1}

^aUMR SAS, AGROCAMPUS OUEST, INRA, bâtiment 13, 65 rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042, Rennes Cedex, France. E-mails: ana-beatriz.de-oliveira@inra.fr; marie.seiller@agrocampus-ouest.fr

^bLaboratoire d'Ecologie Microbienne LEM, UMR INRA 1418, UMR CNRS 5557, INRA, CNRS, Université Lyon1, Université de Lyon, bâtiment G. Mendel, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. E-mails: amelie.cantarel@univ-lyon1.fr; alessandro.florio@univ-lyon1.fr

^cUMR EMMAH, INRA, 228 route de l'Aérodrome, Domaine Saint-Paul – Site Agroparc, CS 40509, 84914, Avignon Cedex 9, France. E-mail: annette.berard@inra.fr

^dUMR Eco&Sols, Univ Montpellier, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Bâtiment 12, 2 Place Viala, 34060, Montpellier Cedex 2, France. E-mail: philippe.hinsinger@inra.fr

¹ corresponding author :

Bâtiment 8, UMR Sol Agro hydrosystème Spatialisation, 65 rue de Saint Brieuc, CS 84 215, 35 042 Rennes cedex, France

E-mail: edith.lecadre@agrocampus-ouest.fr

Tel.: +33 (0)2 23 48 54 74

Abstract

Plant legacy is a concept representing the effects exerted by plants on soil once they are no longer growing. We hypothesized that plant species and mixture (intercropping) would induce different short-term legacy effects impacting carbon and nitrogen-related soil microbial activities and resistance and resilience after a heat disturbance. A microcosm experiment was conducted using a calcareous Mediterranean soil conditioned by a complete vegetative cycle in a greenhouse with four planting modalities (W = monoculture of Wheat (*Triticum aestivum* L.); L = monoculture of white Lupin (*Lupinus albus* L.); WL = both species intercropped; U = unplanted soil). Half of microcosms were incubated at 28°C (C = control conditions) whereas the remaining half were exposed at 48°C for 2 days (S = stress conditions), with an immediately return to control conditions. Microcosms were destructively sampled at 2, 7, 16 and 28 days (T2, T7, T16, T28) after the end of the heat disturbance and the following soil measurements were performed: Basal Respiration (BR), Substrate-Induced Respiration (SIR), Nitrification Enzyme Activity (NEA) and N mineral concentrations. Our results demonstrated that monocultures and intercropping promoted different legacy effects under control conditions especially for SIR. WL soils presented lower values of SIR than L and higher than W soils. For SIR, W and WL soils conferred greater resistance to the heat stress, whereas L and WL soils conferred higher resilience at T28. For NEA, no differences between soils were observed for resistance to heat stress, but at T16, soils having WL legacy were more resilient than L soils, but comparable to those having W legacy. Our results highlight that a short-term legacy effect is measurable but greatly differs between C- and N-related microbial activities. We estimated that intercropping had modified ability of soil microorganisms to face heat stress, suggesting that plant legacy effect has to be considered to mitigate extreme climatic events in Mediterranean soils.

Keywords: climate change; soil respiration; nitrification; crop mixture; plant soil feedback, heat stress.

1. Introduction

Substantial legacy effects on soil properties are induced by plants and can persist after the disappearance of those plants that were responsible for these effects (van der Putten et al., 2013). Plant legacy effects have been pointed out to influence carbon storage in soils (Lange et al., 2015), succession in plant communities (van der Putten et al., 2016) or plant invasions (Bailey & Schweitzer, 2016). Legacy effects of plants on soils are largely driven by shifts in soil microbial communities. Indeed, plant roots can directly alter soil microbial communities by releasing carbon compounds named rhizodeposits (Eisenhauer et al., 2017; Hunter et al., 2014; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). Rhizodeposits include a wide range of organic compounds including specific root exudates that shape microbial communities in root vicinity, *i.e.* the rhizosphere microbiome (Dennis et al., 2010; Li et al., 2018). Furthermore, composition of rhizodeposits is known to be plant specific (Hunter et al., 2014; Li et al., 2018), which suggests that a single species will affect differently soil microbial communities compared to a plant mixture (Chen et al., 2019; Eisenhauer et al., 2017; Tang et al., 2014; Tang et al., 2016). Plants are also able to alter soil microbial communities indirectly by modifying the abiotic properties of the soil, *i.e.* pH, nutrient availability, moisture or soil structure (Hinsinger et al., 2009). Several plant legacies were characterized in grasslands (Grman & Suding, 2010; Lange et al., 2015; Strecker et al., 2016; Zak et al., 2003), but debated in agroecosystems while recent publication pointed out its implication in shaping soil microbiome (Li et al., 2018). In agroecosystems, the frequency of perturbations due to annual practices and the low plant diversity barely support comparison to natural ecosystems. However, some agronomic practices such as intercropping are in rupture with conventional agriculture, as it consists to grow two or more species or genotypes in the same field during a significant period of their life cycle (Brooker et al., 2015). Intercropping is of great interest in many countries as a solution to replace synthetic inputs by ecological processes (Brooker et al., 2015; Doré et al., 2011; Malézieux et al., 2009). Long-term legacy effects of intercropping have been estimated by Cong et al. (2015), but within 1-year timespan authors are reluctant to expect a significant effect on soil communities. However, Pivato et al. (2017) estimated that after only 12 weeks of bi-species culture, N cycling-related microbial communities were strongly affected especially at low N level compared to each species in monoculture. Grman & Suding (2010) also estimated a short-term legacy effect pointing out the multiple drivers defining both plant legacy duration and intensity. Given the crucial role of soil microbial activities in ecosystem functioning, these plant legacy effects can contribute to agroecosystem stability in the context of climate change and particularly during extreme events. Several studies have been focused on resistance (capacity to withstand change) and resilience (capacity for recovering of function) of C-related soil microbial activities to environmental disturbances

(Bérard et al., 2012; Bérard et al., 2011; Chaer et al., 2009; Guillot et al., 2019; Hamdi et al., 2011; Mooshammer et al., 2017; Orwin & Wardle, 2005). However, studies about stability of more specialized soil microbial communities like nitrifiers are scarce (Mooshammer et al., 2017; Thion & Prosser, 2014; Wertz et al., 2007). Yet there are reasons to argue that plants are able to shape soil related N-cycle communities (Zak et al., 2003). Our rationale is to consider that diverse plant species yield different legacies, ultimately contributing to alleviate effects of extreme climatic events as heat waves in agroecosystems. We hypothesized that intercropped species promote a (i) different legacy effect on soil microbial processes in comparison to single species, and accordingly (ii) influence the resistance and resilience of soils. We focused on nitrification and respiration microbial processes (potential nitrification, substrate-induced respiration and basal respiration) as key processes of the N and C cycles in environmental and plant productivity issues. To achieve this goal, we generated a novel plant legacy in a calcareous cambisol, through a greenhouse experiment conducted with a soil collected in a Mediterranean site near Montpellier, France. Soil was collected 3 months after a pea crop, sieved at 1-cm to be homogenized and ridded of any coarse organic material, then air dried and stored at ambient temperature before use. In 2017, soil was mixed with perlite and conditioned by one complete vegetative cycle of two crop species grown as single crops (monocultures), (i) white lupin (*Lupinus albus* L.) and (ii) bread wheat (*Triticum aestivum* L.), as well as the mixture of both species (intercrop). Finally, we calculated the resistance and resilience indices (*sensu* Orwin & Wardle (2004)) after a heat disturbance.

2. Material and Methods

2.1. Soil origin and greenhouse experiment before heat stress experiment

Soil originated from a plot of the INRA experimental station localized at Mauguio (3°59'6"E, 43°37'13"N, 12 m altitude) in French littoral Mediterranean region. The soil was a calcareous cambisol with a clay loam texture according to USDA classification (clay 294 g kg⁻¹, fine silt 200 g kg⁻¹, coarse silt 233 g kg⁻¹, fine sand 156 g kg⁻¹ and coarse sand 118 g kg⁻¹), which had developed on an alluvial calcareous parent material, typical of the South East plains of Montpellier. The regional climate is typically Mediterranean with surface regularly exposed to drying-rewetting cycles due to irregular rain events mainly concentrated in Autumn and Spring. The annual average rainfall at this site during the growing season, from September to June, over the last 20 years was 598 mm. Recorded average soil temperatures at 10 cm depth since 2012 demonstrated that plot had never experienced temperatures higher than 38.4 °C. During the four months before soil sampling, 3 cycles of drought were recorded (*i.e.* 20 days with cumulative rainfall lower than 2mm, according to Tang et al. (2014)), while maximal

air temperatures ranged from 22.8 °C (in September) to 34.7 °C (in August). The last precipitation episode (4.8 mm) preceding soil sampling occurred 5 days earlier. Soil was collected (0-15 cm depth) 3 months after pea harvest, air dried and sieved at 1-cm to homogenize and remove coarse organic material, then finally stored at ambient temperature before use to preserve inherent soil quality (Salomé et al., 2014).

A pot experiment was then conducted in a greenhouse (Centre Mondial de l'Innovation – Roullier Group – Saint-Malo, France) from September to December 2017 with the soil previously described. Before being conditioned in the pots (4-dm³), the soil was re-sieved with a 4-mm mesh to remove any organic material and mixed with perlite to allow better conditions for plant root development. Pots were filled with substrate composed of 2 kg of soil and 0.2 kg of perlite. The characteristics of the substrate were clay 202 g kg⁻¹, silt 454 g kg⁻¹, sand 343 g kg⁻¹, total CaCO₃ 39 g kg⁻¹, pH_w 8.3, CEC_{Metson} 15 cmol₊ kg⁻¹, organic C 10.4 g kg⁻¹, total N 0.95 g kg⁻¹, ammonium (N-NH₄⁺) 20 mg kg⁻¹, nitrate (N-NO₃⁻) 39 mg kg⁻¹. The WHC of the substrate corresponded to 28% of gravimetric humidity. For simplicity, substrate will be named herein as soil. The planting modalities of this experiment were: (i) monoculture of wheat (W) (*Triticum aestivum* L. cv. Lennox) at a density of 4 plants per pot, (ii) monoculture of white lupin (L) (*Lupinus albus* L. cv. Feodora) at a density of 2 plants per pot, (iii) intercropping of both species (WL) at half of the density for each corresponding monoculture (2 wheat and one lupin plants), and (iv) an unplanted soil (U). Each planted and unplanted treatments was replicated 4 times. At maturity, plants (shoots and roots) were harvested and the soil was carefully separated from the roots by gently shaking followed by hand sorting and then kept at 4°C in the dark until microcosm experiment (16 weeks).

2.2. Heat stress microcosm experiment

A total of 128 microcosms were prepared (4 replicates x 4 planting treatments x 2 temperatures x 4 sampling dates) containing 50 g of equivalent dry soil from greenhouse experiment, and placed in 1-dm³ glass jars hermetically sealed by a rubber gasket. Soils of microcosms were rehydrated at 100% of the water holding capacity and pre incubated at 12 °C for 5 days in order to ensure uniform initial experimental conditions. Afterwards, half of the microcosms (64 samples) were incubated at 28°C and the remaining half at 48 °C, corresponding to control (C) and heat stress (S) conditions, respectively. All microcosms were placed into darkness in laboratory incubators (KBWF 720, Binder, Germany) with a precision of 0.4 °C. In order to i) avoid any drying-rewetting cycles during the experiment altering the C and N cycles including nitrification (Fierer & Schimel, 2002) and ii) ensure precise estimation of nitrification potential assays conducted with soil slurries (see section 2.3), we kept soil moisture at 100% WHC. To ensure no variations of water regime in microcosms, a 20-cm³

polypropylene container filled with water was placed in each sealed microcosm. Microcosms were regularly weighted to check any soil moisture changes. After two days of heat disturbance at 48°C, the stressed microcosms were transferred back at 28 °C. Each microcosm contained an 1M NaOH trap for basal respiration determination (see section 2.3). At each sampling date (T2, T7, T16 and T28 corresponding to 2, 7, 16 and 28 days after the end of the heat stress), samples were immediately split into 4 subsamples for all subsequent soil analyses (substrate-induced respiration (SIR), nitrification enzyme activity (NEA), soil NH_4^+ and NO_3^- measurements, and soil water content). Measurements of SIR and NEA were performed on fresh soils within 2 days after sampling, whereas soil samples for mineral N measurements were frozen (-20°C) until analysis.

2.3. Soil microbial and chemical analyses

Basal respiration (BR) traps were collected and replaced at each sampling date. An aliquot of 1-cm³ of NaOH was back-titrated with 0.1 M HCl, after adding 2.5-cm³ of BaCl₂ solution (30 %) to precipitate the Na₂CO₃ issued from soil CO₂ respiration. Results of BR were expressed in $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ day}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of dry soil. SIR measurements were performed on 10 g of equivalent dry soil according to Patra et al. (2005), in presence of glucose (1.2 mg C-glucose g^{-1} dry soil). A CO₂ accumulation kinetic was measured using a gas chromatograph ($\mu\text{GC R3000}$, SRA instruments, France) at 28°C. SIR was expressed in $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of dry soil. NEA was measured with 3 g of equivalent dry soil according to Patra et al. (2005). Briefly, a (NH₄)₂SO₄ solution (50 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ dry soil) was added to each soil sample. Samples were placed at 28°C, shaken at 140 rpm to ensure aerobic conditions during 10 hours, and NO₂⁻ + NO₃⁻ production was measured every two hours using a photometer (Smartchem 200, AMS Alliance, France). NEA was expressed in $\mu\text{g of N-(NO}_2^- + \text{NO}_3^-) \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of dry soil. Finally, soil ammonium (N-NH₄⁺) and soil nitrate (N-NO₃⁻) were extracted from a soil:solution ratio of 1:2 with 1M KCl solution after a 30 min of contact at 140 rpm, followed by 30 min of rest. Supernatant were filtered at 0.45 μm and mineral N concentrations were estimated with an Analytical Discrete Multi-Chemistry Analyzer (AQ2, SEAL Analytical, UK). Soil mineral N content were expressed as mg N-NH₄⁺ and mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ of dry soil.

2.4. Percentage change relative to control

In order to investigate recovery rate, percentage change of values in stressed samples relative to those in the controls, at each sampling date, were calculated as follows (Bérard et al., 2011; Chaer et al., 2009):

$$\text{relative change (\%)} = \left[\left(\frac{S_i}{C_i} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

where S_i and C_i are the variable values in the stressed and control soil samples, respectively, at sampling date i (*i.e.* T2, T7, T16 or T28).

2.5. Soil microbial resistance and resilience indices

To investigate only potential differences among soils with specific plant legacy (W, L, WL), unplanted (U) soil was not considered for calculation of resistance and resilience indices (see section 3.3). Resistance (RS) and resilience (RL) of soil microbial activities to a heat stress were assessed by the following indices (Orwin & Wardle, 2004):

$$RS = 1 - \frac{2 \times |D_2|}{C_2 + |D_2|} \quad (2)$$

where D_2 is the difference between the values of the response variable (BR, SIR or NEA) in control (C_2) and stressed conditions (S_2), 2 days after the end of the disturbance;

$$RL = \frac{2 \times |D_2|}{|D_2| + |D_x|} - 1 \quad (3)$$

where D_x is the difference between the control and disturbed soil on 7, 16 or 28 days after the end of the disturbance.

Both indices are bounded by -1 and $+1$, where an index of 1 indicates full resistance (no effect of the disturbance on the response variable) or full resilience (same values of the response variable in control and stressed conditions). For resistance, an index value of 0 indicates either 100% decrease or increase in the response variable compared to control, while a negative index represents a modification greater than 100% in the response variable compared to the control (*i.e.* the soil has low resistance). In regard to resilience, an index of 0 indicates that the disturbed soil has either not recovered after the end of the disturbance (*i.e.* $D_x = D_2$) or that the stressed soil is different to the control by the same amount, but in the opposite direction (*i.e.* $D_x = -D_2$). A resilience index between 0 and 1 indicates that the response variable has not fully recovered, whereas a negative index value

indicates that the absolute value of D_x is higher than the absolute value of D_2 (*i.e.* the soil has low resilience).

2.6. Statistical analyses

The effects of planting legacy (*i.e.* both planted (W, L, WL) and unplanted (U) modalities) and heat stress on all soil variables were tested for each sampling date by two-way ANOVA (planting legacy x heat stress). Afterwards, one-way ANOVA was performed in absence of interaction to test differences among treatments. The effect of specific plant legacy (*i.e.* only planted modalities – W, L, WL) on resistance and resilience indices, as well as the effect of planting legacy on percentages of change in microbial activities relative to controls were also tested by one-way ANOVA, within each sampling date. Significant differences between means were tested by Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$). Normality of residuals and homogeneity of variance were tested by the Shapiro and Levene's tests, respectively. When necessary, data for microbial activities were squared root-transformed. Principal component analysis (PCA) were performed with all chemical and microbial soil variables. Within a PCA, coordinates of the individuals on each axis were used for testing differences between groups (*i.e.* levels of a factor) by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests in case of non-normality. Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$) or Wilcoxon rank sum tests ($p < 0.05$) were then performed accordingly. Finally, a redundancy analysis (RDA) was performed to assess the effect of all soil microbial and chemical variables (SIR, NEA, BR, $N-NO_3^-$ and $N-NH_4^+$ contents) on resistance (at T2) and resilience (at T16) indices. Statistical analyses were performed with R software v. 3.5.1 (R Core Team, 2018). Packages used for the ANOVA, Tukey's test, PCA and RDA analysis were: *car*, *agricolae*, *FactoMineR* and *vegan*, respectively.

3. Results

3.1. Contrasted effects of planting and heat stress on microbial activities and soil mineral N content

The first two axes of the PCA performed on full data set (BR, SIR, NEA, $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ measurements for all sampling dates and stress conditions) explained 74.2% of the total variance (Fig. 1). BR, $N-NH_4^+$, NEA and $N-NO_3^-$ are the major variables contributing to the first axis while SIR was strongly and negatively correlated to the second axis (Table A.1). Both planting legacy (W, L, WL, U) and sampling dates combined with control (C) and stress (S) conditions had a significant impact on values of samples (Kruskal-Wallis $p < 0.001$; Table A.2 and A.3). Along axes 1 and 2, unplanted soil was significantly different from those with W, L and WL legacies (Wilcoxon test, $p < 0.001$), with centroids showing negative and positive values, respectively (Fig. 1a). Considering sampling dates combined with

control and stress conditions (Fig. 1b), earlier dates were significantly distinct between control and heat stress. However, at these earlier dates, the unplanted stressed soils were closer to their controls, suggesting a greater resistance to heat stress. Interestingly, during the period of resilience, the trajectories of the control and stressed soils evolved along the first axis, and at the later dates (T16, T28) stressed and control soils were not significantly different from each other. At all dates combined, a clear difference was observed between stress and control conditions along the second axis (Wilcoxon test, $p < 0.001$), with all centroids of the stressed samples showing positive values, whereas centroids of controls showed negative values.

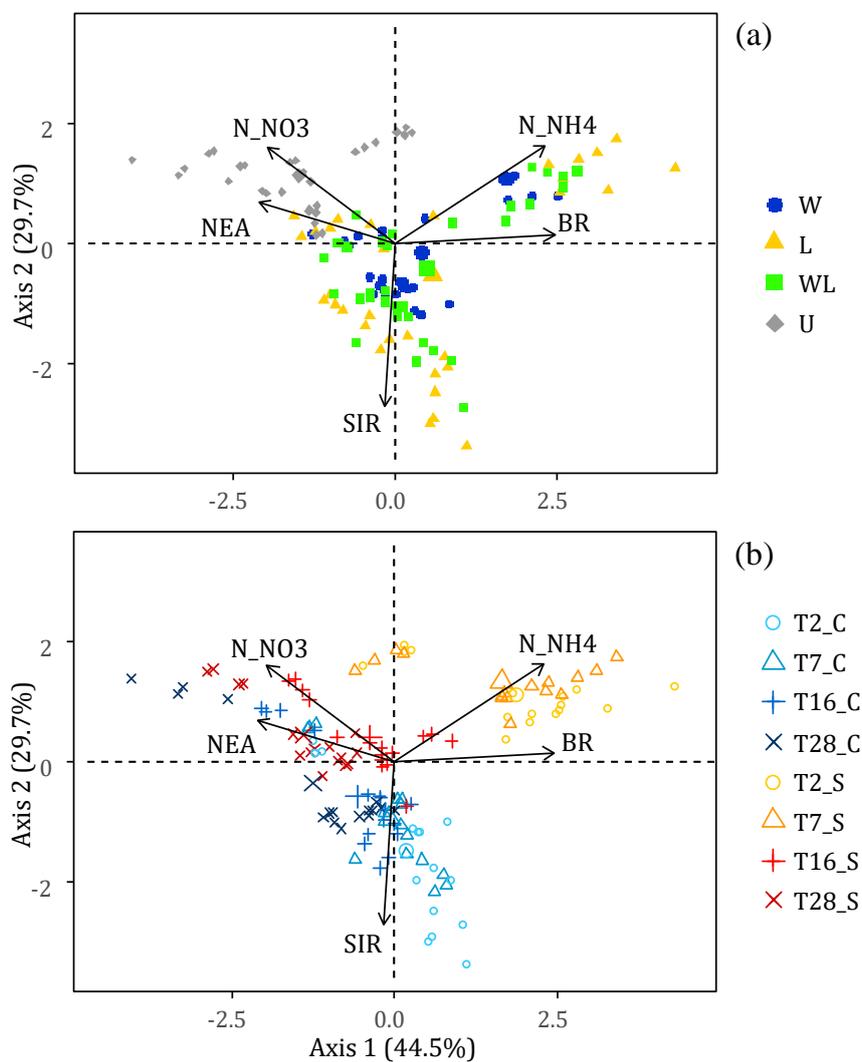


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) performed on basal respiration (BR), substrate-induced respiration (SIR), nitrification enzyme activity (NEA) and soil mineral N content as nitrate (N-NO_3^-) and ammonium (N-NH_4^+). Symbols stand for planting legacy (W – wheat, L – lupin, WL – wheat + lupin, U – unplanted) (a) and sampling dates (T2, T7, T16 and T28 – 2, 7, 16 and 28 days after the end of the heat stress) within control (C) and heat stress (S) conditions (b). Centroids are represented by larger symbols.

3.2. Legacy effect of planting on soil C- and N-related activities in response to heat stress

Planting legacy was significant for BR values at the first two dates of measure ($p < 0.001$; Table 1 and Fig C.1). At these dates, L soils clearly differed from unplanted soils, with L soils showing values 1.9-fold greater, when combining control and stress conditions. The planting legacy was still significant at T16, but no effect was observed at T28. An important effect of heat stress was also observed on BR values, particularly at T2 and T7 ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). At the two first dates, stressed soils presented values 1.35-fold greater than control soils on average. At T16 the difference between stressed and control soils was lower, whereas no significant difference between stressed and control soils was observed at T28.

In regard to SIR, planting legacy ($p < 0.001$), heat stress ($p < 0.001$) and planting x stress interaction ($p < 0.01$ at T28 and $p < 0.001$ at other dates) had a strong effect on SIR values (Table 1 and Fig. C.2). Significant differences between planting legacies of control soils were observed at all sampling dates. However, heat stress alleviated these differences. For instance, at T2 (control), SIR means ranked as follows: $L > WL > W = U$, whereas no differences were noticed after stress. One should note that L soils exhibited the greatest SIR values, while unplanted soils presented the lowest. Conversely to BR, stressed conditions exhibited a dramatic decrease of SIR activities compared to the controls, whatever the sampling date. The most important difference was observed at the first date, when stressed soils were 3.6-fold lower than controls. The L soils were particularly altered at the first date because SIR activity were 5-fold lower than controls. This difference between stress and control conditions was also present at the other dates, but decreased with time.

A very strong effect of planting legacy on NEA values was observed, whatever the sampling date ($p < 0.001$; Table 1 and Fig. C.3). Unplanted soils exhibited the greatest values compared to planted soils (2.2- to 3.8-fold greater than W, L and WL). The heat stress effect on NEA was particularly observed at T2 and T7 ($p < 0.001$). At these dates, a significant decrease in NEA values was observed between controls and stressed soils, but to a lesser extent than that observed for SIR. At T16, heat stress had no effect on NEA, whereas at T28, a significant effect of heat stress ($p < 0.05$) and interaction of heat stress and planting legacy ($p < 0.001$) were observed. An interesting dynamic was observed from T16 to T28, as NEA values increased particularly for stressed (S) soils, and to a lesser extent for control (C) soils. Indeed, at T28, there was a final ranking with L values becoming closer to U values ($U_C > U_S = L_S \geq L_C = W_S = WL_S > WL_C = W_C$).

CHAPITRE 5

Table 1. Basal respiration (BR – in $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ day}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dry soil), substrate-induced respiration (SIR – in $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dry soil) and nitrification enzyme activity (NEA – in $\mu\text{g N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dry soil) of each planting legacy (W – wheat, L – lupin, WL – wheat+lupin, U – unplanted), within control and stress conditions, for each sampling date after the end of the heat stress (T2, T7, T16, T28). Values are the means of four replicates (n=4). Thresholds of probability of the two-way ANOVA (Planting x Stress) are indicated at the top of each variable-related data set. When significant interaction between factors (Planting x Stress) is present, different bold letters represent significant differences between 8 means (i.e. control and heat stress conditions combined; Tukey post hoc test ($p < 0.05$)). Different lowercase letters represent significant differences within a single column, whereas different uppercase letters represent either significant differences between stress conditions (Control vs Stress), or between planting legacies with control and stress conditions combined (Tukey post hoc test ($p < 0.05$)).

Variable	Factor	T2		T7		T16		T28	
BR	Planting history	< 0.001***		< 0.001***		< 0.05*		ns	
	Stress	< 0.01**		< 0.001***		< 0.05*		ns	
	Planting x Stress	ns		ns		ns		ns	
		Control ^B	Stress ^A	Control ^B	Stress ^A	Control ^B	Stress ^A	Control	Stress
	W	32.82 ab	41.39 ab	21.52 b	29.79 bc	20.18 a	22.73 a	20.07 a	19.31 a
	L	41.61 a	63.79 a	37.91 a	48.14 a	21.79 a	24.76 a	20.19 a	23.88 a
	WL	39.32 a	43.41 ab	21.56 b	38.46 ab	20.99 a	24.37 a	15.78 a	18.37 a
	U	23.73 b	33.23 b	18.63 b	25.30 c	16.17 a	19.21 a	16.50 a	16.12 a
	Planting history	< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***	
	Stress	< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***	
Planting x Stress	< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***		< 0.01**		
SIR		Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress	Control	Stress
	W	5.77 c	2.01 d	4.33 c	1.65 e	4.21 bc	2.64 de	4.94 bc	3.15 de
	L	12.42 a	2.59 d	9.11 a	2.10 e	7.69 a	2.75 de	6.92 a	4.00 cd
	WL	9.24 b	2.78 d	6.56 b	2.20 de	5.38 b	2.41 de	5.38 b	3.43 de
	U	4.98 c	1.72 d	3.50 cd	1.71 e	3.47 cd	1.81 e	3.82 d	2.67 e
	Planting history	< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***		< 0.001***	
Stress	< 0.001***		< 0.001***		ns		< 0.05*		
Planting x Stress	ns		ns		ns		< 0.001***		
NEA		Control ^A	Stress ^B	Control ^A	Stress ^B	Control ^A	Stress ^A	Control	Stress
	W	0.54 b	0.16 b	0.40 b	0.15 b	0.59 b	0.30 b	0.65 c	2.69 bc
	L	0.54 b	0.17 b	0.57 ab	0.12 b	0.74 b	1.12 ab	2.83 bc	4.66 b
	WL	0.42 b	0.28 b	0.40 b	0.11 b	0.43 b	0.45 ab	1.28 c	2.63 bc
	U	1.44 a	1.21 a	0.91 a	0.49 a	1.99 a	1.36 a	8.63 a	5.38 b

3.3. Resistance and resilience of soil microbial activities

Recovery rates are illustrated in Fig. 2. Just after heat disturbance (T2), SIR activity was severely altered (-70%, on average) compared to NEA (-46%) and BR (+36%). The most important decrease at T2 was observed for L soils, with a reduction of 79% in SIR relative to control samples. At this date, L soil also exhibited the largest increase in BR (+59%) relative to control samples. Conversely, for NEA, T2 showed the lowest decrease for the unplanted soil (-15%). Focusing on the other dates for SIR, significant differences between percentages of change were only observed at T7, as follows: $U > W = WL > L$ (Table B.1). For NEA in T16, percentages of change for WL and L, but not for W soils, switched from negative to positive. Significant differences between values were observed for NEA at T28. The W soils exhibited greater NEA values in stressed soils relative to controls and compared to WL and L (Table B.1).

Indices of resistance (RS) and resilience (RL) are presented in Table 2. Significant differences in resistance between soils were only observed for SIR ($p < 0.05$). The W soils exhibited the highest RS index, which was significantly different from L, but not from WL. For resilience indices, significant differences between soils for NEA at T16 ($p < 0.01$) and for SIR at T28 ($p < 0.05$) were observed. The RL indices for NEA of both WL and W soils were greater than that of L soils. The RL indices of L soils were negative at T7, T16, and T28, meaning a very low resilience of NEA. For SIR at T28, the highest RL indices were found for L and WL soils.

The ordination plots of RDA performed on resistance (RS), at T2, and resilience (RL), only at T16, indices clearly discriminated the unplanted soil (Fig. 3 a,b). The resistance indices of NEA were positively associated to NEA and $N-NO_3^-$ concentrations in soils, and negatively to $N-NH_4^+$ contents. The RS indices of SIR were negatively associated to BR. Considering resilience indices of NEA, these latter were negatively linked to NEA and $N-NO_3^-$, whereas BR resilience indices were negatively linked to SIR and RL of SIR. Finally, considering soils with only specific plant legacies (W, L, WL), L soils slightly distinguished from the other soils on RDA plots for resistance, and strongly differed from the other soils for resilience. Thus, these results confirmed percentages of change (Fig. 2) and RS and RL indices (Table 2). The L soils were clearly different, being characterized by lower RS of SIR and RL of NEA (Fig. 3 a,b).

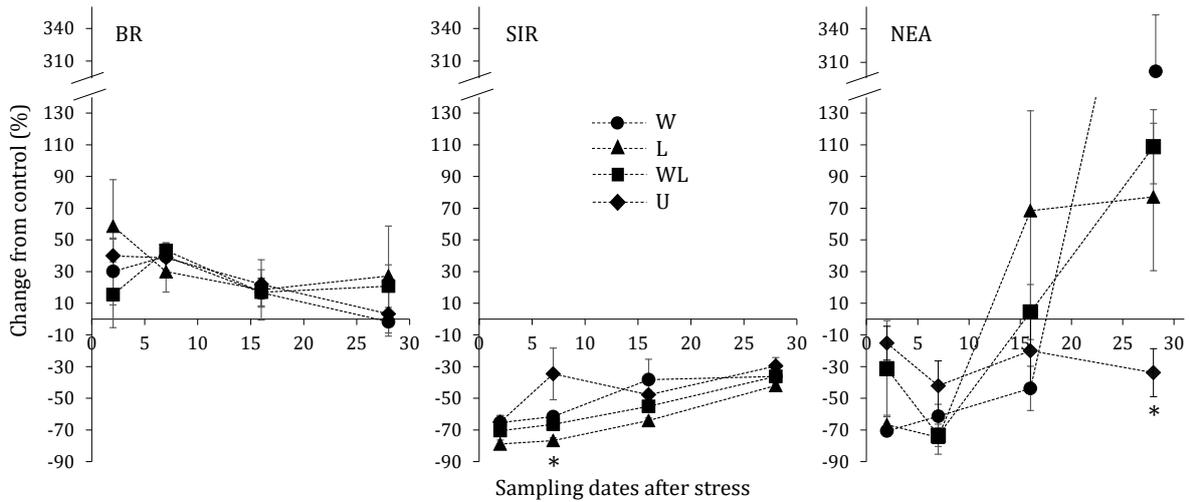


Fig. 2. Percentages of change in microbial activities (BR – basal respiration, SIR – substrate-induced respiration, NEA – nitrification enzyme activity) relative to controls along all sampling dates after the end of the heat stress (T2, T7, T16, T28). Symbols represent planting legacy (W – wheat, L – white lupin, WL – wheat + lupin, U – unplanted). Vertical bars indicate standard errors (n=4). Asterisks indicate significant differences between planting legacies within a sampling date (one-way ANOVA, followed by a Tukey post hoc test ($p < 0.05$)).

Table 2. Indices of resistance and resilience based on basal respiration (BR), substrate-induced respiration (SIR) and nitrification enzyme activity (NEA) for each specific plant legacy (W – wheat, L – lupin, WL – wheat+lupin). Resistance indices were calculated on T2 date (2 days after the end of the heat stress), whereas resilience indices were calculated on T7, T16 and T28 dates of measure (7, 16 and 28 days after the end of the heat stress). Values are the means of four replicates (n=4). Probabilities of the one-way ANOVA are indicated at the bottom of each variable-related data set. Different letters represent significant differences within a column (Tukey post hoc test ($p < 0.05$)).

Variable	Plant legacy	T2	T7	T16	T28
		(Resistance)	(Resilience)		
BR	W	0.52	- 0.00	0.27	0.48
	L	0.34	0.31	0.55	0.27
	WL	0.60	- 0.22	0.20	0.26
	<i>p-value (one-way ANOVA)</i>	<i>0.61</i>	<i>0.31</i>	<i>0.61</i>	<i>0.86</i>
SIR	W	0.21 a	0.16	0.47	0.35 b
	L	0.11 b	0.16	0.32	0.54 a
	WL	0.17 ab	0.19	0.37	0.53 a
	<i>p-value (one-way ANOVA)</i>	<i>0.05*</i>	<i>0.87</i>	<i>0.63</i>	<i>0.04*</i>
NEA	W	0.17	0.21	0.24 a	- 0.63
	L	0.20	-0.03	- 0.58 b	- 0.48
	WL	0.29	- 0.10	0.46 a	- 0.68
	<i>p-value (one-way ANOVA)</i>	<i>0.34</i>	<i>0.16</i>	<i>0.008**</i>	<i>0.56</i>

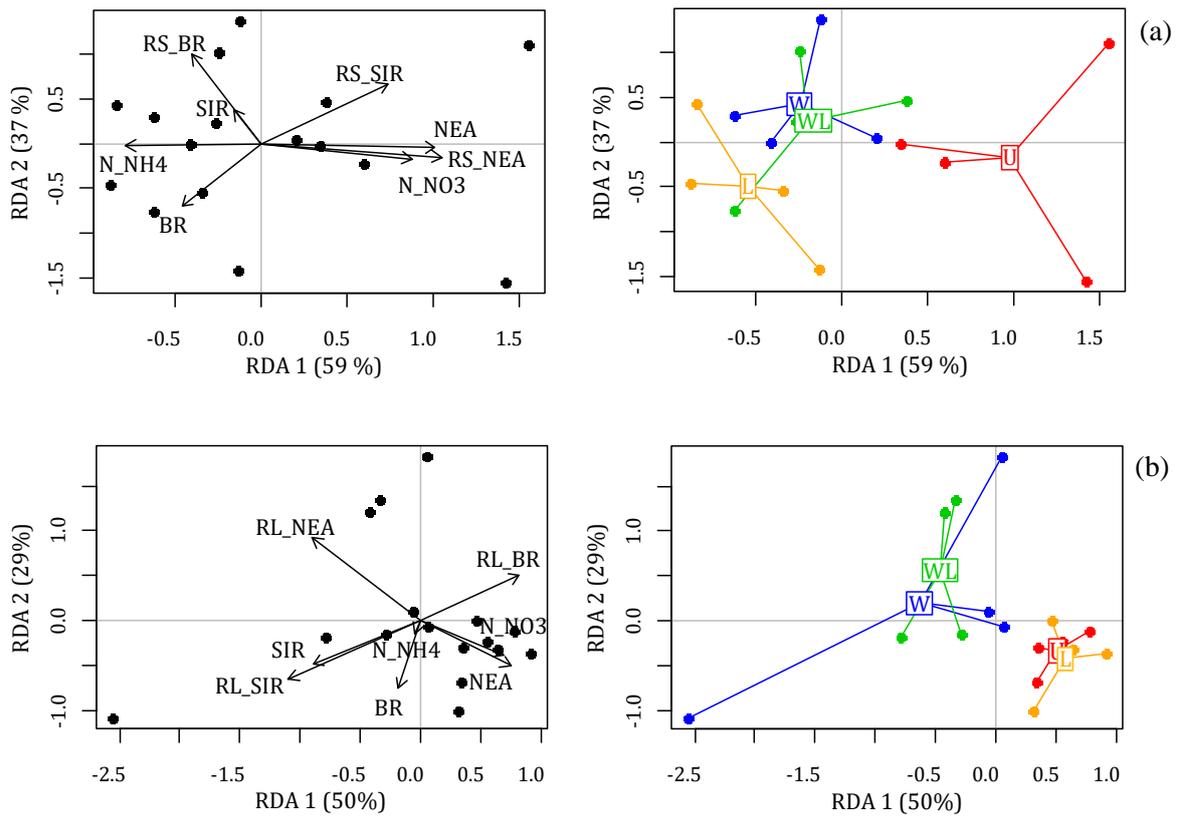


Fig. 3. Redundancy analysis (RDA) based on resistance (RS) (a) or resilience (RL) (b) indices of basal respiration (BR), substrate-induced respiration (SIR) and nitrification enzyme activity (NEA), constrained by BR, SIR, NEA, as well as soil mineral N content as nitrate (N-NO₃) and ammonium (N-NH₄⁺). Resistance indices were calculated for T2, whereas resilience indices were calculated for T16 (2 and 16 days after the end of the heat stress). Groups of planting legacies are represented by W (wheat) in blue, L (lupin) in orange, WL (wheat + lupin) in green and U (unplanted) in red. The RDA was performed on center-reduced matrix.

4. Discussion

4.1. Legacy effect of plants on soil microbial activities under control conditions

Marked differences were observed between unplanted and planted soils, suggesting that plants were responsible for a legacy effect. Unplanted soils always exhibited greater values of NEA than those for W, L and WL. As plants are able to shape N-related microbial communities (Moreau et al., 2015; Pivato et al., 2017), it occurred that all planted treatments had a negative legacy effect on the activity of nitrifiers. This negative legacy effect may be attributed to the competition between plants and microorganisms for N (Cantarel et al., 2015; Kuzyakov & Xu, 2013; Xu et al., 2011). According to Schimel & Bennett (2004) plants are effective competitors for ammonium which is also the substrate for nitrifiers, reducing their abundance and activity. Some plant morphological and/or

physiological characteristics can also affect the diversity of nitrifiers (Cantarel et al., 2015; Legay et al., 2014; Pommier et al., 2018), or inhibit nitrification (Subbarao et al., 2012). According to these recent results, one should hypothesize that nitrifiers community is shaped by the environment (Erguder et al., 2009; Prosser & Nicol, 2012; Zhalnina et al., 2012), or by plant N-use strategy (Thion et al., 2016). Thereby, we can reasonably suggest a plant legacy effect on nitrification. A great contrast between unplanted and planted soils was also observed for BR and SIR values, with lower values of U compared to W, L and WL. This is consistent with Orwin & Wardle (2005), who observed lower values of soil BR and SIR for bare soil compared to the planted grass treatments. As large amounts of C-compounds can be released by roots as rhizodeposits, e.g. sugars, organic acids, amino acids, mucilage, root or border cells (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015; Philippot et al., 2013), an increase in microbial biomass and activities (Tang et al., 2014) is expected in planted compared to unplanted soils.

Considering only planted soils, we also observed different legacy effects among the modalities (W, L, WL), which is consistent with our first hypothesis. Indeed, except for the first sampling date, greater values of NEA were observed for L soil, compared to W and WL, *i.e.* a stronger legacy effect for lupin than wheat. Le Roux et al. (2013) also reported a positive relationship between the presence of legumes and NEA, which was explained by the build-up of nitrifying communities in response to greater N-NH_4^+ availability in soils, probably due to the release of N derived from Rhizodeposition (NdfR) by legumes (Duchene et al., 2017). In addition, legumes are usually considered less competitive for soil mineral N compared to cereals, which could suggest a higher availability of mineral N in soils under legumes (Mallarino & Wedin, 1990). L soils were also remarkable regarding to C-related microbial variables, showing the greatest values of SIR whatever the date of measurement, as well as the highest values of BR at T2 and T7. White lupin is well known to exude large quantities of organic anions, like citrate (Dissanayaka et al., 2015; Veneklaas et al., 2003; Wang et al., 2010), compared to cereals and other legumes (Wang et al., 2016b). Such exudates may have promoted SIR and BR in our study. This positive legacy effect of white lupin on C-related microbial variables compared to intercropped wheat and white lupin is however not in agreement with the commonly observed positive effect of plant diversity on soil microbial biomass and respiration (Chen et al., 2019; Eisenhauer et al., 2017; Tang et al., 2014). Accordingly, one should note that legume legacies may be further investigated in agroecosystems in order to decipher their potential role in rotation or in intercropping.

4.2. Effects of experimental conditions on C-related microbial activities: Basal respiration and Substrate-Induced Respiration

Amongst response variables, SIR was the most affected by heat stress (T2). Samples affected by stress presented reductions varying from 65% to 79% relative to controls. As SIR may be considered

as a proxy of the active microbial biomass (Anderson & Domsch, 1978; Orwin & Wardle, 2005), these results suggest a dramatic decrease in microbial biomass by the disturbance. The mortality of temperature-sensitive microbes has been observed in other studies where heat and combined heat-drought stresses were applied (Bérard et al., 2011; Guillot et al., 2019; Hamdi et al., 2011). The effect of temperature on SIR activities was also evident when comparing the heat stress responses of planted soils. In our study, L soils presented the highest values of SIR activity under control conditions, but after heat stress, SIR activity decreased to levels comparable to the other treatments. Then, we concluded that an important microbial biomass in L soils did not confer a better resistance to the heat disturbance. This finding was consistent with Guillot et al. (2019), who observed that Mediterranean soils exhibiting the highest microbial biomass were not systematically associated with a higher resistance. Conversely, W soils which exhibited the lowest values of SIR, presented the greatest resistance index (Table 2), which suggests a greater proportion of more heat-tolerant microbes within this modality. A weaker plant legacy effect on C-related microbial activities due to inherent quality of this type of soil (Salomé et al., 2014) was expected. However, recent studies pointed out that combined heat and drought stresses were able to significantly alter the microbial biomass (Bérard et al., 2011; Guillot et al., 2019), or acclimate of soil communities to heat waves (Bérard et al., 2012) in Mediterranean soils. In our study, the plant-induced effects may be partly due to a soil microbes protection by plant liberation of exopolysaccharides (Kumar & Verma, 2018). Soils with L and WL legacies presented the highest resilience indices and recovery rates for SIR. The rapid progression of L and WL soils over time reduced final differences between these soils and W at T28 (Fig. 2). Despite strongly affected by heat stress, the better resilience of L and WL suggest that heat tolerant microbes rapidly proliferated. The greater resilience of L soils could be attributed to a greater C availability derived from death of the most sensitive microorganisms (Bérard et al., 2015), but also by transformation of soil organic matter as induced by the elevated temperature (Bérard et al., 2011; Hamdi et al., 2011). It should be noted that a positive priming effect due to lupin legacy may also contribute to C availability in L soils conferring a greater resilience of L and WL (Wang et al., 2016b).

4.3. Effects of experimental conditions on N-related microbial activities: Nitrification Enzyme Activity (NEA)

NEA was affected by heat stress, but to a lesser extent than SIR, while comparable to BR (Fig. 2). Both temperature and moisture are considered as major environmental factors affecting microbial activities and structure. Considerable debate stands in literature about optimal temperature for soil nitrifiers (Taylor et al., 2017) with scarce studies dealing with the effect of nitrification rate at temperatures higher than 40°C. Indigenous nitrifiers have different optimal temperatures depending

on native region (Avrahami & Conrad, 2003). Albeit $> 40^{\circ}\text{C}$ temperatures may be experienced in Mediterranean regions, the duration of continuous heat stress, *i.e.* 2 days, is not reproducible under Mediterranean field conditions. French regulation for Mediterranean region defines severe heat waves as a period lasting 2-3 days, and characterized by elevated temperature $> 35^{\circ}\text{C}$ and $> 21^{\circ}\text{C}$ during day and night respectively. Thus, night cooling decreases temperature stress even during severe heat waves, which was not the case during our experiment. Then, 2 days on continuous applied 48°C temperature have to be considered as a stress while not fully realistic of field conditions. One should note our moisture content of soils (100% of WHC) during the experiment. Nitrification rate is affected by drying-rewetting cycles (Fierer & Schimel, 2002) such as mineralization (Zhang et al., 2017). Fierer & Schimel (2002) depicted an increase of nitrification potentials in frequently drying-rewetting stress treatments. In their experiment, they do not succeed to attribute any changes of nitrification rates when soil moisture increased from 35% to 50% WHC. Mathieu et al. (2006) estimated no significant differences of nitrification rates using ^{15}N tracer under 150% WHC (saturated) and 75% of WHC (unsaturated conditions) in soil incubations with 2 mm aggregates. We thus assumed that our uncommon WHC did not alter potential nitrification rates. However, possible restricted oxygen availability due to O_2 consumption by mineralization during the incubation period could be pointed out. A O_2 restriction may finally alter nitrifier's community growth rate and activity at earlier dates of our experiment. As nitrification potentials are estimated under shaking to provide aeration, oxygen limitation at earlier dates (T2 and T7) may have been less pronounced than at T16. One should note that our goal was to test if planted treatments conferred different legacy effects on potential NEA in response to a heat disturbance. Despite discussed limitations of our experiment, we discussed significant differences while keeping in mind potential limitations of field transposition of our results. We demonstrated that WL legacy exhibited comparable resistance and resilience than those with W legacy. The WL soil was the less affected by the heat stress initially (T2), with a reduction by only 31% in NEA relative to the control (Fig. 2), but this trend was not reflected on resistance indices, probably due to the high variability among replicates. However, in terms of resilience, at T16, significant differences between indices were verified, with WL and W soils exhibiting the highest resilience indices. Pivato et al. (2017) estimated a greater abundance of nitrifiers in soils from plant associations, whereas Le Roux et al. (2013) and Zhang et al. (2015) reported a negative effect of plant richness on the abundance of ammonia oxidizers. These latter articles suggested that plant identity rather than plant diversity can affect nitrifier community abundances. Considering gene-based associated groups of nitrifiers namely Ammonia Oxidizing Archaea and Bacteria (AOA and AOB), Thion et al. (2016) estimated greater AOA abundance in the rhizosphere of exploitative grass species, like wheat. Moreover, Taylor et al. (2017) considered that AOA nitrifiers are more tolerant to higher temperatures. Thus, better resilience in planting modalities containing wheat could be attributed to these published

results. Finally, one should also note the interesting NEA dynamic observed at later stages in our study. A strong increase in NEA activities of all soils was observed at T28, compared to T16, for both control and heat stress conditions (Table 1). Such increase in NEA at this final date could be explained by a “boost” in the activities of nitrifiers after 30 days of incubation in optimal conditions. Since the growth rates of nitrifiers are recognized to be relatively slow (Robertson & Groffman, 2015; Wertz et al., 2007), the interpretation of NEA resilience is then highly dependent of the final experimental dates. Accordingly, one should note that individual properties of microorganisms like dormancy, plasticity and growth rate (Shade et al., 2012) are also important components of resistance and resilience of soil microbial communities.

5. Conclusions

Adaptation to climate change of Mediterranean soils regularly exposed to heat waves may be possible through plant legacy effects. Intercropping confers more stability of soil microbial activities compared to single crop species when both C and N are investigated together due to individual benefits of each plant type. Finally, additional studies are essential to investigate if, i) prolonged plant presence will allow a more persistent effect on soils, and if ii) longer period of incubation would be able to detect full recovery of soil microbial activities over time. These results can provide useful information for designing cropping systems, in particular crop rotations and/or intercropping to capitalize on different legacy effects of various crops.

Acknowledgements

This work was supported by Centre Mondial de l’Innovation - CMI (Roullier Group). Authors warmly acknowledge Dr. Jean-Claude Yvin and Dr. Mustapha Arkoun from CMI for their support during this project. Authors want to thank Mrs. Béatrice Trinkler for her technical support during incubation period and for soil chemical analyses. We also thank the “Activités Microbiennes dans l’Environnement” platform (AME platform, Université Lyon1, UMR 5557) and particularly Mr. Jonathan Gervais for supervising and measuring SIR and NEA microbial activities with Ms. Marie Seiller. We are also grateful to the anonymous reviewers for their comments improving our article.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Appendix A

Table A.1. Correlations between variables and the two first axes of the principal component analysis (PCA) performed on full data set (BR basal respiration, SIR substrate-induced respiration, NEA nitrification enzyme activity, N-NO₃⁻ nitrate, N-NH₄⁺ ammonium).

Variable	Axis 1	Axis 2
N-NH ₄ ⁺	0.774	0.552
N-NO ₃ ⁻	-0.664	0.536
SIR	-0.055	-0.915
NEA	-0.709	0.229
BR	0.824	0.050

Table A.2. Kruskal-Wallis and post-hoc Wilcoxon rank sum tests performed on the coordinates of the individuals on the two first axes of the full PCA to assess differences between planting legacies (W – wheat, L – white lupin, WL – wheat + lupin, U – unplanted). The *p*-values of the Kruskal-Wallis test are indicated. Different lowercase letters represent significant differences between coordinate means (centroids) along each axis.

Axis	<i>p</i> -value	Centroids ranking		
1	<i>p</i> < 0.001	L	0.58	a
		WL	0.48	a
		W	0.38	a
		U	-1.48	b
2	<i>p</i> < 0.001	U	1.14	a
		W	-0.14	b
		WL	-0.42	b
		L	-0.54	b

Table A.3. Kruskal-Wallis and post-hoc Wilcoxon rank sum tests performed on the coordinates of the individuals on the two first axes of the full PCA to assess differences between sampling dates combined with control and stress conditions (T2, T7, T16 and T28 within C – control and S – stress conditions). The p -values of the Kruskal-Wallis test are indicated. Different lowercase letters represent significant differences between coordinate means (centroids) along each axis.

Axis	p-value	Centroids ranking		
1	$p < 0.001$	T2_S	1.88	a
		T7_S	1.66	a
		T2_C	0.17	b
		T7_C	-0.09	b
		T16_S	-0.38	bc
		T16_C	-0.57	bc
		T28_C	-1.26	c
		T28_S	-1.41	c
2	$p < 0.001$	T7_S	1.34	a
		T2_S	1.13	ab
		T28_S	0.45	bc
		T16_S	0.41	bc
		T28_C	-0.35	cd
		T16_C	-0.59	de
		T7_C	-0.96	de
T2_C	-1.50	e		

Appendix B

Table B.1. Percentages of change in microbial activities (BR basal respiration, SIR substrate-induced respiration, NEA nitrification enzyme activity) relative to controls, for each planting legacy (W – wheat, L – white lupin, WL – wheat + lupin, U – unplanted) and sampling date (T2, T7, T16 and T28 – 2, 7, 16 and 28 days after the end of stress). Values are the means of four replicates (n=4). Thresholds of probability of the one-way ANOVA are indicated at the top of each column, when significant effect of the planting legacy was detected. Different letters represent significant differences within a column (Tukey post hoc test ($p < 0.05$)).

Variable	Planting legacy	T2	T7	T16	T28
		ns	ns	ns	ns
BR	W	30.07	39.46	16.73	-1.76
	L	58.64	29.89	18.44	27.21
	WL	15.39	43.30	16.87	20.78
	U	39.89	33.35	21.93	3.23
		ns	$p < 0.001$	ns	ns
SIR	W	-65.36	-61.58 b	-38.22	-36.24
	L	-78.92	-76.67 c	-64.04	-41.99
	WL	-70.46	-66.44 b	-55.11	-36.19
	U	-65.02	-50.85 a	-47.81	-29.63
		ns	ns	ns	$p < 0.001$
NEA	W	-70.71	-61.33	-43.78	301.94 a
	L	-66.70	-74.66	68.38	77.08 b
	WL	-31.35	-73.38	4.49	108.80 b
	U	-15.23	-35.76	-19.99	-33.79 b

Appendix C

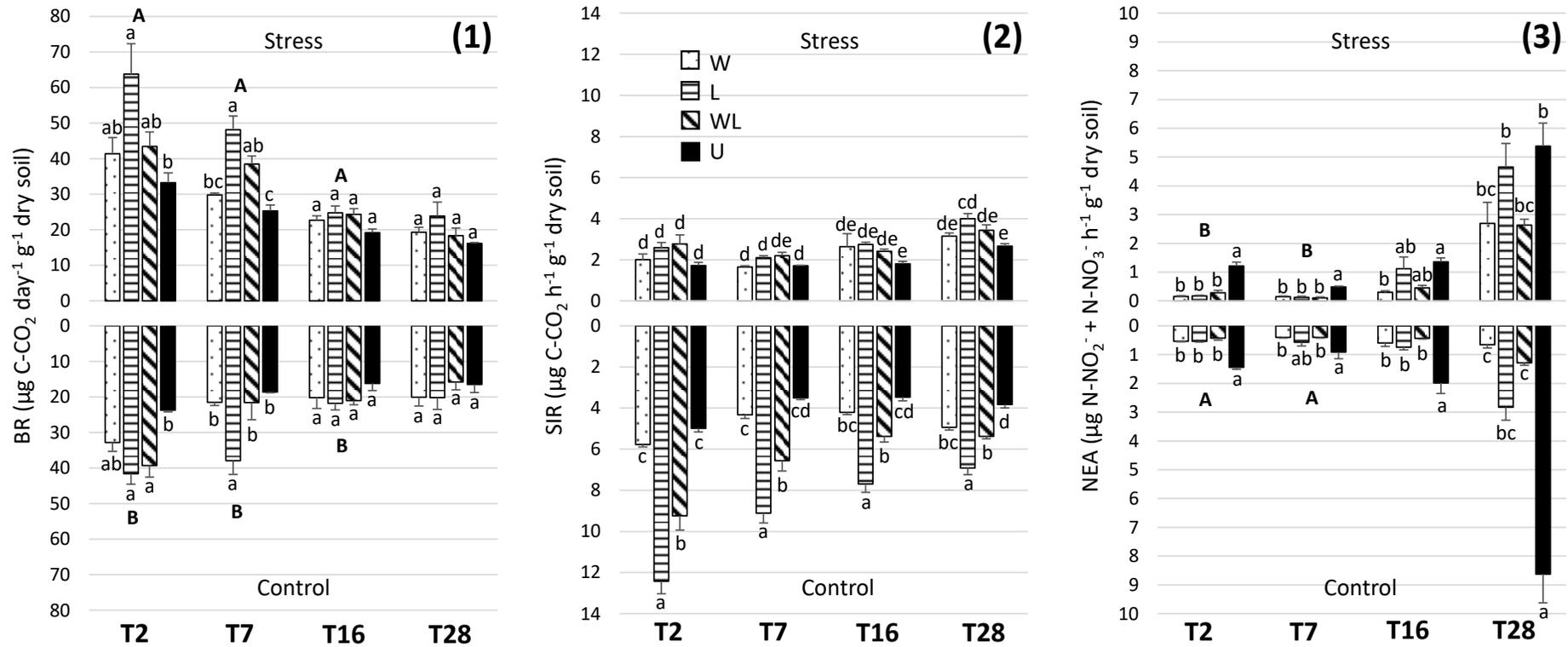


Figure C. Basal respiration (BR appendix C.1), substrate-induced respiration (SIR, appendix C.2) and nitrification enzyme activity (NEA, appendix C.3) for each planting legacy (W – wheat, L – lupin, WL – wheat+lupin, U – unplanted), under stress (top) and control (bottom) conditions, at each sampling date (T2, T7, T16 and T28 – days after the end of the heat stress). Values are the means of four replicates (n=4). Error bars represent standard errors. For BR (all dates) and NEA (except at T28), different lowercase letters represent significant differences between planting legacies (4 means) within each date and stress condition (stress or control) according to Tukey post hoc test ($p < 0.05$). For SIR (all dates) and NEA at T28, different lowercase letters represent significant differences between planting legacies (8 means) within each date but with stress and control conditions combined (Tukey post hoc test ($p < 0.05$)). Different uppercase letters, when existing, represent significant differences between stress and control conditions, within each date, all planting legacies combined (Tukey post hoc test ($p < 0.05$)).

DISCUSSION GENERALE

6. Rappel du contexte, des objectifs de la thèse et de la stratégie de recherche

L'agroécologie repose en partie sur l'augmentation de la diversité, notamment végétale, dans les agroécosystèmes (Altieri, 1999; Duru et al., 2015b; Kremen et al., 2012). L'agriculteur peut, par ses choix de cultures, promouvoir cette biodiversité appelée « planifiée » et permettre, par le développement d'une biodiversité « associée » à la première, remplacer les intrants via des interactions écologiques favorisant différents services écosystémiques (Duru et al., 2015b). Or, selon le dernier rapport du GIEC (IPCC, 2019), le changement climatique a entraîné, lors des dernières décennies, une augmentation de la fréquence, de l'intensité et de la durée d'évènements extrêmes tels que les hautes températures. Ces évènements peuvent exacerber les processus de dégradation des sols (IPCC, 2019), démontrant le besoin d'adapter les pratiques agricoles afin de préserver la ressource sol et d'augmenter sa résistance et sa résilience face à ces évènements extrêmes (Griffiths & Philippot, 2013). L'une des pratiques agricoles permettant d'introduire plus de diversité végétale dans les agroécosystèmes est l'association céréale-légumineuse (Brooker et al., 2015). Cette pratique, qui trouve de plus en plus d'intérêt en Europe et notamment en France, permet de répondre à la fois à des enjeux de production et de réduction d'intrants (Bedoussac et al., 2015; Corre-Hellou et al., 2013; Pelzer et al., 2012), de stabilité face à des aléas biotiques (Corre-Hellou et al., 2014), d'autonomie protéique dans les élevages (Carof et al., 2019), de diminution des impacts environnementaux (Pelzer et al., 2012) et enfin, d'augmentation de la qualité des sols (Cong et al., 2015; Lithourgidis et al., 2011; Oelbermann & Echarte, 2011). En parallèle, cette pratique agricole innovante interroge également l'industrie des fertilisants, qui doit s'adapter à ces systèmes et concevoir des produits innovants, mais également des conseils, en accord avec le fonctionnement des cultures en association.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une association céréale-légumineuse sur le fonctionnement du sol à court terme (au cours et consécutivement à un cycle de culture) pouvant contribuer à une meilleure résistance et résilience des communautés microbiennes face à des stress environnementaux comme ceux induits par le changement climatique. En outre, nous avons choisi de nous intéresser à l'effet à court terme car il est essentiel de prendre en compte les conséquences d'une association sur les performances de la culture suivante afin de contribuer à la promotion de ce type de diversification dans les territoires agricoles. C'est pourquoi les concepts de « *plant-soil feedback* » (boucles de rétroaction sol-plante), « *plant legacy* » (effet d'héritage), (van der Putten et al., 2013) ou effet précédent (Sebillotte, 1990), très similaires, sont importants d'être considérés dans ce contexte car ils orientent les choix des agriculteurs dans la conception de leurs successions culturales. Cependant, nous considérons que le terme « *plant legacy* » ou effet d'héritage

est plus approprié lorsque nous nous référons à la persistance de l'effet des plantes dans les sols au cours du temps.

D'après notre analyse de l'état de l'art, les effets des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement des sols ne sont pas encore pleinement décrits, notamment en conditions agricoles non limitantes, comme dans les systèmes sous fertilisation azotée. De plus, il est supposé qu'un gradient de N minéral dans le sol peut moduler les interactions rhizosphériques entre les espèces en association, se traduisant par différents effets sur le fonctionnement du sol, mais ces effets n'ont pas encore été pleinement étudiés. Nous avons donc posé comme première sous-hypothèse de cette thèse qu'à travers des processus rhizosphériques, l'association céréale-légumineuse pourrait produire dans le sol des effets différents de ceux produits par les cultures pures correspondantes, et que ces effets varieraient en fonction de la disponibilité en N minéral dans le sol. Cette première sous-hypothèse est ainsi centrée sur le potentiel effet rhizosphère susceptible d'être produit par l'association blé-lupin au cours d'un cycle cultural. La deuxième sous-hypothèse était que cet effet rhizosphère créé lors d'un cycle cultural par l'association blé-lupin pourrait perdurer dans les sols une fois les plantes récoltées (effet d'héritage ou *plant legacy*) et se traduire en une résistance et une résilience des communautés microbiennes différentes de celles des sols issus des cultures mono-spécifiques de blé et de lupin.

L'approche utilisée pour tester ces deux sous-hypothèses a été expérimentale, à travers la réalisation de deux expériences interdépendantes (Expériences 1 et 2) à l'origine des trois jeux de données constituant cette thèse (Chapitres 3, 4 et 5). Le modèle biologique choisi a été l'association blé tendre (*Triticum aestivum*) – lupin blanc (*Lupinus albus*), cultivée pendant un cycle cultural dans des pots en serre expérimentale et avec un gradient de N minéral dans le sol, pour permettre : i) au stade de floraison, l'évaluation des changements dans le fonctionnement du sol provoqués par l'effet rhizosphère des espèces en question, modulé par le gradient de N, et ii) à maturité, la collecte des sols en vue de l'évaluation de l'effet d'héritage à court terme de l'association blé-lupin sur la stabilité (résistance et résilience) de certaines communautés microbiennes du sol face à un stress thermique.

Dans la suite de ce chapitre, organisés en 3 grandes thématiques (parties 2, 3 et 4), nous discuterons des résultats majeurs tirés de cette thèse au regard des hypothèses formulées au départ, mais aussi des limites rencontrées lors de l'acquisition de ces résultats. Seront également présentées, au sein de chacune de ces 3 parties, les perspectives envisagées pour la poursuite des études (rédigées *en italique*). A la fin, seront également développées quelques perspectives pour le partenaire privé.

7. L'effet rhizosphère de l'association blé lupin au cours d'un cycle cultural

Notre première sous-hypothèse a été partiellement vérifiée puisque nous avons observé, lors de l'Expérience 1, que le gradient de N a modulé l'effet des traitements de cultures (association *versus* cultures mono-spécifiques) notamment sur l'activité des phosphatases acide et alcaline, ainsi que sur le pH (Fig. 3, Chapitre 3). Certaines tendances pour d'autres variables ont pu être également observées à travers les indices RME, pour lesquels l'effet de l'association, comparativement à ce qui aurait pu être attendu via la moyenne des deux cultures pures (simple effet additif), s'est montré significativement différent en termes de N-NO₃ aux niveaux N1 et N2, d'abondance fongique (gène 18S) au niveau N2 et de DOC au niveau N3 (Fig. 5, Chapitre 3). Ces résultats sont assez originaux car relativement peu de travaux se sont intéressés aux effets de l'association céréale-légumineuse, en présence d'un gradient de N minéral allant de la quasi absence de fertilisation (niveau N1) jusqu'à des niveaux assez élevés d'apport de N (N2 et N3), sur un grand nombre de paramètres chimiques et microbiologiques du sol en relation avec les nutriments N et P. En effet, les études récentes (Chen et al., 2018; Yu et al., 2019; Zhao et al., 2015) ont surtout comparé des niveaux différents de fertilisation azotée dans un contexte d'agriculture intensive ayant pour objectif la réduction d'intrants, mais n'ont pas considéré des témoins non-fertilisés qui correspondraient à l'extrémité basse du gradient, pour laquelle des interactions intéressantes et pertinentes sont susceptibles d'avoir lieu entre les espèces cultivées en association. Notre étude a également mis en avant le bénéfice tiré par le blé de l'association avec le lupin, avec un gain systématique de biomasse à n'importe quel niveau de N dans le sol, comparativement au blé pur, tandis que la biomasse du lupin n'a pas été modifiée par l'association, sauf au niveau N2, où elle a été réduite (Fig. 1, Chapitre 3). Le gradient de N a modulé les réponses du blé en termes d'accumulation de N dans la biomasse totale (augmentation significative de l'accumulation de N tant pour le blé associé que pour le blé seul en fonction du gradient, avec toujours une supériorité du blé associé par rapport au blé seul) et les réponses du lupin en termes de taux de fixation de N₂ atmosphérique (diminution significative du taux de fixation de N₂ du lupin seul en fonction du gradient, tandis que le taux de fixation du lupin associé n'a pas significativement changé, avec toujours une supériorité du lupin associé par rapport au lupin seul) (Fig. 2, Table 1, Chapitre 3). Ce dernier résultat est très important car il traduit l'effet bénéfique de l'association avec le blé pour atténuer l'effet inhibiteur de l'augmentation de la teneur de N minéral dans le sol sur le taux de fixation de N₂ atmosphérique chez le lupin ; en effet, ce taux n'a pas varié le long du gradient pour le lupin associé, en plus d'être maintenu à un niveau assez élevé. Enfin, notre étude a également mis en avant que, contrairement au lupin, l'association a également eu un effet positif et significatif

sur la nutrition du blé en ce qui concerne d'autres macronutriments essentiels comme le K, Ca, Mg et S (Fig. 1 et 2, Chapitre 4). Ces résultats positifs de l'association avec une légumineuse sur la croissance (biomasse et/ou nutrition) de la céréale confirment ce qui a été observé dans d'autres études (Bedoussac et al., 2015; Betencourt et al., 2012; Latati et al., 2014; Li et al., 2008; Tang et al., 2016).

Pris dans l'ensemble, nos résultats en termes de fonctionnement du sol (qui est au cœur de cette thèse), mettent en avant que les modifications des différents paramètres mesurés au sein de la rhizosphère de l'association blé-lupin ont été au moins similaires à celles mesurées dans la rhizosphère de l'une des deux cultures pures (Chapitre 3). En d'autres mots, l'association blé-lupin n'a engendré, en aucun cas, un effet négatif (*i.e.* paramètre présentant une valeur inférieure en culture associée par rapport à une culture pure) sur le fonctionnement du sol, comparativement aux cultures pures, comme également observé dans l'étude de Pivato et al. (2017), en termes d'abondance de plusieurs communautés bactériennes dans la rhizosphère des associations bispécifiques de 4 monocotylédones (*Alopecurus myosuroides*, *Apera spica-venti*, *Vulpia myuros* et *Triticum aestivum*) cultivées en pots. Cela signifie ainsi que, comparativement à l'une des deux cultures mono-spécifiques, l'association blé-lupin a permis, pour nos conditions expérimentales, de i) maintenir le fonctionnement du sol (pour P-Olsen, MBC et MBN, relativement aux deux cultures pures ; et pour NO₃, abondances des gènes 16S et 18S, et activité des phosphatases alcalines, relativement au blé pur), voire ii) de l'améliorer (pour NH₄, activité des phosphatases acides et DOC, comparativement au blé pur ; et pour l'abondance du gène AOB, comparativement au lupin pur) (Fig. 3 et 4, Table 2, Chapitre 3). Ces résultats mettent donc en exergue que l'association blé-lupin, en plus d'avoir permis un gain de biomasse significatif du blé, a également maintenu, voire amélioré, le fonctionnement du sol, vis-à-vis de l'une de deux cultures monospécifiques, et cela dans des conditions de disponibilité en N minéral non négligeables dans le sol. Ce résultat est important dans l'optique de développer un argumentaire, avec d'autres résultats de terrain (Wang et al., 2015; Wang et al., 2014), pour convaincre les agriculteurs d'adopter ou, a minima, d'expérimenter sur leurs exploitations, des associations de culture permettant de concilier production (biomasse) et maintenance de la fertilité des sols sous conditions adéquates de fertilisation.

En parallèle, les résultats mis en avant dans le Chapitre 3 montrent un effet rhizosphère de l'association au cours d'un cycle de culture, confirmant les résultats acquis par d'autres études en conditions contrôlées, notamment pour des paramètres en lien avec le cycle de P (Betencourt et al., 2012; Dissanayaka et al., 2015; Li et al., 2007) et vérifiant donc notre sous-hypothèse de départ. Cependant, même si un effet systématique du gradient de N dans le sol n'a pas été observé sur tous les paramètres chimiques et microbiologiques du sol, ou sur toutes les variables végétales mesurées dans notre étude, les résultats et tendances présentés restent encourageants pour la poursuite des travaux portant sur l'effet de gradients de N sur le fonctionnement du sol au sein de cultures associées.

L'absence d'un effet plus systématique du gradient de N pourrait être attribué à certaines limites de notre étude, comme par exemple l'absence d'un niveau de disponibilité de N réellement faible, qui aurait pu être vraiment limitant à la croissance des cultures et produire des interactions écologiques intéressantes entre les deux espèces, *i.e.* du mutualisme, conformément à la *Stress Gradient Hypothesis* (Maestre et al., 2009), pouvant éventuellement se traduire en termes de modifications des processus rhizosphériques affectant en retour la croissance des cultures et le fonctionnement du sol. En effet, notre niveau de N minéral initial dans le sol était assez élevé (59 mg kg^{-1} de sol), ne couvrant donc pas toute la gamme de disponibilités de N minéral, *i.e.* un gradient allant d'un extrême à l'autre. L'étude conduite par Pivato et al. (2017), montre un effet significativement positif de la plupart des associations bispécifiques étudiées, comparativement aux cultures pures, en termes d'abondance de plusieurs communautés bactériennes dans la rhizosphère dans le traitement non-fertilisé (N-), comparativement au traitement fertilisé (N+) pour une teneur initiale de N minéral de 12 mg kg^{-1} de sol (considérablement inférieure à celle du sol utilisé dans notre étude). Ces auteurs ont également démontré que les deux niveaux de N minéral contrastés dans le sol de leur étude ont produit des effets très distincts en termes de biomasse aérienne des espèces étudiées. Cela peut ainsi expliquer, en partie, les différences prononcées observées dans leur étude comparativement à la nôtre, le long de nos traitements N1, N2 et N3. Inversement, une autre étude conduite en pots n'a cependant pas montré d'effet de la fertilisation azotée sur l'influence de l'association maïs-soja sur l'abondance de plusieurs communautés microbiennes de la rhizosphère, comparativement aux cultures mono-spécifiques (Zhang et al., 2013). Comme pour notre étude, ceci pourrait être attribué à une teneur initiale de N minéral du sol assez élevée (70 mg kg^{-1} de sol). *Une perspective intéressante dans ce cas serait ainsi de tester l'effet de notre association blé-lupin sur un sol ayant une teneur en N minéral beaucoup plus faible, afin de permettre la création d'un gradient de N beaucoup plus large. Nous pourrions envisager, par exemple, le même sol de départ, afin de garder toutes ses caractéristiques inhérentes, en considérant ainsi l'échantillonnage d'un sol provenant d'une parcelle végétalisée adjacente à celle où notre sol a été prélevé, et pour lequel la teneur en N aurait pu être considérablement réduite du fait de l'absence d'apports d'intrants depuis l'époque de l'échantillonnage réalisé pour cette étude. En parallèle, il serait intéressant que la teneur en P de ce sol soit aussi plus faible, ce qui permettrait d'observer éventuellement des effets plus prononcés de l'association en termes de paramètres en lien avec le cycle de P.* En effet, la teneur en P inorganique du sol utilisé dans cette thèse était assez élevée (Tang et al., 2014). Comparativement à d'autres études dont le sol présentait une teneur en P beaucoup plus faible (Latati et al., 2016; Li et al., 2007; Tang et al., 2016), cela a pu également atténuer l'effet de l'association sur certains paramètres et notamment la disponibilité du P. En effet, d'autres études ont mis en avant que l'association céréale-légumineuse a augmenté la disponibilité en P dans leur rhizosphère (Betencourt et al., 2012), ou le MBP (Tang et al.,

2016), notamment dans des conditions de disponibilité en P limitantes. *En outre, comme cela a été fait pour l'étude menée par Betencourt et al. (2012), une autre perspective intéressante à envisager pour la poursuite des études de cette thèse serait la mise en place d'un dispositif et d'une stratégie d'échantillonnage du sol permettant de dissocier les rhizosphères de chacune des deux espèces associées. En effet, étudier les deux rhizosphères indépendamment permettrait ainsi une meilleure compréhension des processus rhizosphériques mis en place par chacune des espèces vis-à-vis des éléments étudiés et la contribution potentielle de chacune pour les valeurs retrouvées dans la rhizosphère moyenne/commune de l'association.*

Le dispositif mis en place lors de l'Expérience 1 comporte également d'autres limites. Les conditions d'humidité, de température et de rayonnement de la serre, ainsi que les densités de plantes considérées pour cette étude (éloignées des celles normalement observées en condition de champ), en plus du confinement imposé au système sol/plante (pots de 4 dm³), ont artificialisé la croissance des cultures. Ainsi, les effets rhizosphériques ont probablement été exacerbés dans ce sol soumis à de telles conditions de confinement, limitant l'extrapolation aux conditions de plein champ. *Il serait donc pertinent de chercher à savoir si les effets rhizosphère mis en avant par notre étude au cours d'un cycle cultural auraient été également possibles de se produire en conditions de terrain.* D'autres études conduites au champ avec des associations céréales-légumineuses ont montré des effets positifs de ces associations sur la biomasse microbienne au sein de la rhizosphère (Tang et al., 2014; Tang et al., 2016). Tout particulièrement, l'étude de Tang et al. (2014), portant sur les associations blé dur-pois chiche et blé dur-lentille, a été menée sur le même sol que celui utilisé pour cette thèse, ce qui montre que des effets positifs (*i.e.* augmentation de la biomasse microbienne) des associations céréales-légumineuses sur ce même sol peuvent également avoir lieu en conditions de terrain. Une autre étude récente portant sur des systèmes agricoles se différenciant par le nombre d'espèces dans les successions culturales dans le Grand-Ouest de la France a mis en évidence un effet rhizosphère des cultures dans des conditions de champ, même dans des sols bien pourvus en N et P (Mira et al., en préparation). *Ces études soutiennent ainsi l'hypothèse qu'un effet rhizosphère de notre association blé-lupin pourrait également être observé sur le terrain, et la mise en place d'un dispositif expérimental avec ces deux espèces soit dans des conditions de sol du Grand Ouest, soit dans les conditions Méditerranéennes d'origine serait ainsi fortement envisageable pour la continuité de nos études sur ce sujet.*

8. La persistance de l'effet de l'association sur le fonctionnement du sol une fois les plantes récoltées

Un autre résultat majeur répondant à la deuxième sous-hypothèse de cette thèse concerne l'effet de l'association blé-lupin sur le sol (produit par des processus rhizosphériques au cours d'un cycle de culture, comme mentionné plus haut) en termes de persistance après la récolte des plantes et à l'échelle de l'ensemble du sol (rhizosphérique ou non). Nous avons en effet démontré que les sols collectés dans les pots en fin de culture (Expérience 1) ont considérablement différé en termes de Respiration Induite par Substrat (SIR) lors de l'Expérience 2, pour les conditions non-perturbés (contrôles) (Chapitre 5). Nous avons ainsi confirmé l'existence d'un effet d'héritage produit à court terme (*short-term plant legacy effect*) par l'association blé-lupin sur un paramètre microbiologique important (SIR), considéré comme un proxy de la biomasse microbienne du sol (Anderson & Domsch, 1978; Orwin & Wardle, 2005). En termes de SIR, le sol provenant de l'association blé-lupin s'est significativement distingué de ceux ayant reçu les cultures mono-spécifiques de blé et de lupin pour les deux premières dates de mesure (comportement intermédiaire entre les deux modalités), et a été significativement différent de ceux provenant du lupin pour les dernières dates (Table 1, conditions contrôles, Chapitre 5). Ces résultats sont d'autant plus intéressants car observés sur des échantillons de sol entier, dans lesquels les effets de la rhizosphère ont été de fait dilués, car l'intégralité des sols des pots a été prélevés lors de la récolte finale de l'Expérience 1, sans distinguer la rhizosphère du sol non rhizosphérique. Nos résultats sont prometteurs dans la mesure où, en plus de démontrer que l'étendue des effets rhizosphère peut aller au-delà de 1 à 3 mm du sol, comme mis en avant par d'autres travaux (Hinsinger et al., 2005), cet effet peut être perceptible même à court terme lors d'un cycle cultural, ce qui est crucial lors de la prise en compte des effets d'héritage sur des volumes de sol plus importants d'une année à l'autre, dans un contexte de succession de cultures. Ces connaissances alimentent également les recherches reposant sur la valorisation de la rhizosphère et leur importance dans les agroécosystèmes pour une gestion plus efficace des fertilisants, mais aussi pour une optimisation d'utilisation de l'ensemble des ressources existantes (Kuzyakov & Razavi, 2019; Shen et al., 2013). En effet, Shen et al. (2013) mettent en avant que la rhizosphère ne correspond pas simplement à une infime partie du sol dont les effets sont limités spatialement, comme beaucoup de scientifiques le considère implicitement ; au contraire, dans les agroécosystèmes, les rhizosphères des cultures peuvent se superposer et former un vaste continuum d'interactions complexes dans le sol, lesquelles sont ainsi très importantes à considérer au niveau de la parcelle agricole. En revanche, comme exposé précédemment, dans notre étude, les effets de persistance des cultures dans les sols ont été peut-être exacerbés en raison des conditions de confinement imposés aux sols lors de

l'Expérience 1, conduisant peut-être à l'obtention d'une plus forte proportion de sol rhizosphérique. Cependant, d'autres études conduites en conditions de terrain ont confirmé qu'un effet d'héritage à court terme (produit au cours d'un cycle cultural) peut persister dans le sol entier (sans distinction de la rhizosphère) également en termes de biomasse microbienne (Oelbermann & Echarte, 2011). Cette dernière étude a été notamment réalisée avec une légumineuse (soja) moins décrite en termes d'exsudation racinaire (processus rhizosphériques) comparativement au lupin blanc, connu par les très larges quantités de composés pouvant être exsudés via ses racines en cluster (Dissanayaka et al., 2015; Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2003; Nuruzzaman et al., 2006). Cela peut ainsi suggérer que notre association blé-lupin blanc, même en conditions de terrain, pourrait avoir un effet significatif sur le fonctionnement du sol, en grande partie dû aux effets rhizosphériques produits par le lupin, et que cet effet soit persistant même après la récolte des cultures. La persistance dans le temps de l'effet d'une plus grande diversité végétale sur les sols a été aussi mise en avant par une étude conduite avec des espèces de prairies tempérées après 5 ans de croissance (Bartelt-Ryser et al., 2005). Les auteurs estiment que l'effet d'héritage sur les sols ont été probablement liés aux communautés microbiennes. En outre, ces auteurs prédisent que les effets d'héritage pourraient perdurer un an ou plus, ce qui a été considéré comme extraordinaire compte tenu de la courte durée des générations de microorganismes et de leur dynamique rapide de croissance/mortalité (Bartelt-Ryser et al., 2005). Même dans les agroécosystèmes où la diversité végétale est moindre comparativement aux prairies naturelles, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet des associations de cultures sur le fonctionnement du sol, et notamment sur son fonctionnement microbiologique, peut perdurer pendant une période de temps longue en exerçant un effet sur les cultures suivantes au moins au début de leur cycle, lors des successions culturales (Alvey et al., 2003). *Une perspective intéressante pour la poursuite des études sur l'effet d'héritage produit à court terme par les associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement du sol serait la prise en compte des réseaux microbiens (microbial networks). En effet, des travaux récents reliant les effets des plantes sur la composante microbienne des sols prennent en compte ces réseaux (Huang et al., 2019; Zheng et al., 2018). Les réseaux microbiens sont importants car, dans l'écosystème sol, différentes espèces microbiennes interagissent et construisent un réseau complexe à travers divers types d'interactions (Deng et al., 2012). Ainsi, même si les microorganismes individuels peuvent être responsables de certaines fonctions spécifiques du sol, c'est le microbiome global et les interactions entre ses membres qui affectent la santé des plantes (Berendsen et al., 2012) et d'autres processus essentiels au fonctionnement des sols, comme la décomposition du C organique et sa stabilité dans les sols (Banerjee et al., 2016).*

Enfin, nos résultats de persistance des effets des différentes modalités de cultures sur le sol sont aussi intéressants car observés même après une période non négligeable de stockage réfrigéré des sols après récolte (*i.e.* 16 semaines). Ces effets d'héritage à court terme sont cruciaux à prendre

en considération dans les successions culturales pratiquées dans les agroécosystèmes pour permettre i) de reconnaître un effet potentiellement positif ou négatif, de manière ponctuelle, sur la culture mono-spécifique/associée suivante, mais également, à plus long terme, ii) d'appréhender les effets cumulatifs qui peuvent se produire au cours du temps (*cumulative effects*) (Duru et al., 2015b) et pour lesquels peu de connaissances existent. En effet, d'après Pelzer et al. (2014a), l'un des freins à l'adoption des cultures associées par certains agriculteurs est le manque de connaissances sur l'effet cumulatif des associations lors des successions culturales, notamment en termes de maladies telluriques, de gestion des adventices, mais également en termes de fonctionnement du sol, par exemple de dynamique de l'azote, questionnant ainsi la durabilité de ces successions à long terme.

Nos résultats pointent donc également la nécessité de suivi des effets des associations céréales-légumineuses à plus long terme dans des conditions de champ, en intégrant des mesures régulières, à chaque fin de cycle, de certains paramètres du sol considérés comme pertinents pour le contexte agricole en question (par exemple, teneur de nitrate pour éviter les lessivages excessifs, teneur en matière organique, activités enzymatiques, porosité ou structuration du sol...), afin d'assurer que, année après autre, les effets des associations sont plutôt positifs, en garantissant ainsi la durabilité de ces pratiques au cours du temps.

9. Effet de l'association blé-lupin sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes du sol

Les résultats faisant l'objet du troisième article de la thèse (Chapitre 5), répondant à la deuxième sous-hypothèse, ont mis en avant qu'au cours d'un cycle de culture les différentes modalités de plantes (Association - WL, blé - W et lupin - L) ont été capables de produire différents *plant legacy effects* également en termes de résistance et de résilience de différentes activités microbiennes (Respiration Induite par Substrat – SIR et Nitrification Potentielle – NEA) en réponse à un stress thermique. Nous avons constaté que les sols provenant de l'association ont eu i) soit un comportement intermédiaire, entre ceux provenant du blé et ceux provenant du lupin ($W \geq WL \geq L$ pour la résistance de la SIR), ii) soit une plus grande résilience par rapport à au moins l'un des deux autres sols ($WL = L > W$ pour la résilience de la SIR à T28 ou $WL = W > L$ pour la résilience de la NEA à T16) (Table 2, Chapitre 5). Ces résultats sont donc importants car ils montrent que l'association blé-lupin a été capable, dans le court terme, d'induire un héritage perceptible dans le sol se traduisant par une plus grande stabilité des activités microbiennes quand SIR et NEA sont considérées simultanément, en tirant le bénéfice de chacune des espèces végétales (avantage du lupin vis-à-vis de la résilience de la SIR et du blé vis-à-vis de la résilience de la NEA). La prédominance de l'effet d'une espèce au sein de l'association (*i.e.*

identité de la plante ou identité fonctionnelle) a été également mise en évidence par l'étude conduite par Orwin & Wardle (2005) avec des espèces de prairies en mésocosmes. Un autre point important concernant ces résultats est que, comme évoqué dans la section précédente, l'effet produit dans les sols par les cultures lors de l'Expérience 1 et les réponses des communautés microbiennes au stress thermique n'a pas été limité au sol rhizosphérique, puisque c'est le sol dans sa globalité (rhizosphérique ou non) qui a été considéré dans l'Expérience 2.

Cependant, il faut noter que l'approche expérimentale de l'Expérience 2 comporte également certaines limites. Tout d'abord, le stress uniquement thermique choisi pour l'évaluation de la stabilité des communautés microbiennes n'est pas un stress réel communément rencontré dans les conditions de terrain. En effet, les évènements de vague de chaleur comprennent normalement des températures élevées associées le plus souvent à des sécheresses également importantes (Bérard et al., 2015). Ainsi, il est reconnu que les effets combinés d'assèchement (diminution de la teneur en eau du sol) et de températures élevées peuvent avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes sur les communautés microbiennes (Bérard et al., 2015), *ce qui suggère qu'une étude comprenant un stress combiné aurait pu être plus appropriée pour une comparaison aux conditions extrêmes réellement subies par les microorganismes du sol en conditions de champ, en particulier en contexte de climat méditerranéen*. Cependant, comme mentionné dans le Chapitre 1 (section stratégie), le choix d'un stress thermique seul avait été fait justement pour éviter de complexifier l'étude de la variable-réponse nitrification (NEA), encore peu explorée dans les travaux de résistance et de résilience des sols. *Il serait donc important d'envisager, comme suite à cette étude, d'étudier la NEA pour un stress combiné hydrique/thermique afin de se rapprocher des conditions de terrain. Egalement, ces résultats encourageants nous amènent à envisager d'autres perspectives, qui pourraient être considérées dans le court et moyen termes, comme la prise en compte de paramètres microbiens liés à un troisième élément essentiel aux grands cycles biogéochimiques, le phosphore*. En effet, avant la mise en place de l'Expérience 2, nous avons aussi envisagé la mesure des activités phosphatases, mais, faute de temps, l'intégration de ces analyses n'a pas été possible dans notre expérimentation. Etendre la portée des études de résistance et de résilience des communautés microbiennes face à des stress environnementaux à travers l'intégration de processus microbiens liés à la fois aux cycles de C, N et P, est en effet d'une grande pertinence écologique pour une compréhension plus systémique des impacts du changement climatique sur le fonctionnement des écosystèmes (Mooshammer et al., 2017). *Enfin, une autre perspective intéressante aurait été de prendre en compte les sols ayant reçu les traitements azotés N2 et N3 lors de l'Expérience 1. En effet, puisque la disponibilité en N minéral du sol peut également affecter les communautés microbiennes (Song et al., 2007b; Yu et al., 2019), on peut supposer que des sols présentant différents niveaux de N minéral pourraient exprimer des différences de résistance et résilience des activités microbiennes considérées dans notre étude (SIR, NEA, BR)*.

L'extrapolation des résultats de notre Expérience 2 aux conditions de terrain est délicate également en raison des conditions de confinement importantes imposés à nos échantillons de sols (microcosmes), lesquelles ne prennent pas en compte i) la possibilité de recolonisation du sol perturbé par des microorganismes provenant du sol environnant non perturbé et ii) les interactions avec les plantes en croissance susceptibles d'être une source d'approvisionnement en carbone du sol ; ces deux facteurs pouvant contribuer à la résilience des communautés microbiennes (Bérard et al., 2011). Cependant, malgré ces limites, les résultats de cette thèse permettent de mettre en avant qu'un effet *plant legacy* peut modifier les réponses des communautés microbiennes à une perturbation environnementale et, surtout, un effet *plant legacy* lié à des cultures annuelles, lesquelles, à notre connaissance, n'ont pas encore été considérées dans ce type d'études. Ainsi, notre étude est originale car, en plus de relier l'effet d'héritage à court terme d'une association céréale-légumineuse (importante dans le contexte agricole) sur les capacités de résistance et de résilience de certaines activités microbiennes du sol, elle a aussi considéré la nitrification comme l'une des variables-réponse, laquelle est de grande importance pour le cycle de N et encore peu étudiée dans ce contexte.

Dans notre étude, l'évaluation de la résistance et de la résilience a été réalisée directement sur des variables de fonction, à travers la mesure d'activités microbiennes (SIR, BR, NEA) liées aux processus de décomposition et de nitrification. Nos résultats sont ainsi intéressants car ils relient l'effet des associations céréales-légumineuses directement à la stabilité d'activités microbiennes qui assurent des processus écosystémiques et, par extension, sous-tendent des services essentiels aux écosystèmes terrestres (Greiner et al., 2017). *Cependant, pour mieux comprendre comment l'association céréale-légumineuse a pu influencer la résistance et la résilience de ces communautés fonctionnelles, une perspective intéressante serait l'intégration de mesures de la composition ou de la diversité spécifique (richesse et abondance relative (équitabilité) des différentes espèces) de ces communautés. Cela est d'autant plus valable pour les communautés microbiennes plus spécialisées, avec une moindre redondance fonctionnelle par rapport à celles impliquées dans la décomposition, comme les nitrifiants (Wertz et al., 2007).* En effet, pour les fonctions assurées par des communautés avec une grande redondance fonctionnelle (*i.e.* décomposeurs), des modifications dans la composition de ces communautés peuvent éventuellement ne pas se traduire en changements dans la fonction ou l'activité mesurée (Allison & Martiny, 2008). En contrepartie, pour des fonctions assurées par un plus faible nombre d'espèces ou de taxons, il est intéressant de considérer les changements dans la composition de ces communautés car il faut alors s'attendre à ce que la fonction ou l'activité mesurée puisse être aussi affectée (Allison & Martiny, 2008).

En plus de l'effet d'héritage après récolte (*plant legacy effect*) mis en évidence par ces travaux de thèse, nous pourrions également nous interroger sur l'influence des associations de cultures sur la résistance et la résilience des communautés microbiennes du sol au cours d'un cycle cultural. En effet,

les événements climatiques extrêmes telles que les vagues de chaleur sont, naturellement, également susceptibles d'avoir lieu pendant la croissance des cultures et la connaissance de leurs effets sur la stabilité des sols sous influence simultanée des plantes serait un atout pour une meilleure compréhension de ces phénomènes au champ ou in natura. Cela montrerait ainsi l'effet direct que l'association de cultures pourrait avoir sur la stabilité de communautés microbiennes du sol, en sachant que le stade de développement des plantes peut modifier la nature des effets de la communauté végétale sur les propriétés du sol, et donc la résistance et la résilience des communautés microbiennes, comme évoqué par Orwin & Wardle (2005). Egalement, d'autres auteurs évoquent que l'effet des espèces végétales, en l'occurrence le lupin blanc, sur la composition des communautés microbiennes du sol peut être plus prononcé quand les plantes se retrouvent dans des stades de croissance plus avancés (Marschner et al., 2002), ce qui démontre une fois de plus l'intérêt de l'étude de la stabilité des activités microbiennes pendant un cycle cultural. Des expérimentations au champ, en micro-parcelles, avec la possibilité d'imposition de perturbations de chaleur/sécheresse via des dispositifs implantés in situ (Kimball et al., 2008; Rubin et al., 2018) réduisant au maximum l'artificialisation du système au cours d'un cycle cultural, seraient une piste très intéressante à envisager pour répondre aux limites exposées. Le travail de Bérard et al. (2015) met également en avant l'importance de la prise en compte du compartiment rhizosphère dans les études de stabilité (à travers une meilleure caractérisation des interactions physiques, chimiques, végétales et microbiennes qu'elle héberge) pendant et après les événements de vagues de chaleur, pour saisir les bénéfices agronomiques d'une association de cultures (dans notre cas) dans le contexte de changement climatique. Ces auteurs proposent aussi que i) la mise en place de techniques in situ non-invasives, comme les méthodes de zymographie permettant de cartographier les activités enzymatiques du sol, avec ii) la possibilité de couplage avec des outils d'imagerie tels que les optodes, ainsi que iii) la réalisation d'autres mesures de paramètres physicochimiques du sol, pourraient apporter des connaissances précieuses sur l'impact des vagues de chaleur sur les interactions plantes-microorganismes au sein de la rhizosphère.

10. Considérations finales et perspectives pour le partenaire privé

Comme exposé au cours de ce manuscrit de thèse, le contexte économique, environnemental et sociétal actuel exige un changement des pratiques agricoles. Le défi est maintenant de concevoir des agroécosystèmes favorisant la biodiversité planifiée, pour (i) limiter l'usage d'intrants de synthèse, (ii) garantir la fourniture de différents services écosystémiques et (iii) augmenter la stabilité des systèmes face à des divers aléas biotiques et abiotiques, tout en maintenant une productivité importante. L'association céréale-légumineuse se traduit ainsi en une pratique prometteuse pour

répondre à ces enjeux actuels et les industries du secteur de l'agrofourriture doivent se repositionner face à ces pratiques agricoles innovantes. C'est pourquoi ce travail de thèse a fortement intéressé la filiale Agro Innovation International du Groupe Roullier, société qui s'est notamment spécialisée dans la conception de produits innovants pour la nutrition végétale, cherchant toujours à anticiper les changements auxquels les activités agricoles et, par conséquent, les marchés, sont constamment exposés. Le Groupe Roullier s'engage à fournir à ses clients non seulement des produits, mais également du conseil stratégique et technique, pour leur permettre une gestion optimisée de leurs pratiques.

Dans un premier temps, les résultats produits au cours de cette thèse apportent au partenaire privé un regard nouveau sur le fonctionnement du sol en systèmes associés et notamment sur les différents processus ayant lieu dans la rhizosphère ; compartiment du sol qui sera probablement de plus en plus considéré pour la gestion plus localisée et efficace des fertilisants dans les agroécosystèmes (Shen et al., 2013). Les résultats de mes travaux permettent également de fournir des données préliminaires sur l'effet d'un gradient de N sur les associations céréales-légumineuses. Ainsi, les résultats de cette thèse alliés à des recherches supplémentaires pourront permettre, à terme, le pilotage de la fertilisation azotée pour orienter le couvert associé vers différents objectifs de production des agriculteurs, dont le développement d'associations destinées à l'alimentation animale ou la préservation de la qualité du sol dans un contexte de changement climatique. Cela est d'autant plus attrayant pour le Groupe Roullier au vu de son développement relativement récent en Chine, le plus grand marché d'engrais au monde, et un pays où les cultures associées sont des pratiques assez courantes, occupant une part considérable des surfaces cultivées, estimée à 33 million hectares dans les années 1990 (Li et al., 2013). Avec les résultats de cette thèse et ceux qui pourront être produits à l'avenir, le Groupe pourra développer des engrais innovants, mais également des biostimulants végétaux différenciés et adaptés à de telles pratiques agricoles innovantes. De plus, les produits et les conseils techniques pourront être adaptés à chaque pays et contexte pédoclimatique, à travers d'expérimentations prenant en compte chaque condition (sols, conditions climatiques, espèces cultivées...) et ses spécificités, car l'association céréale-légumineuse gagne sa place aussi dans d'autres régions et/ou continents, comme notamment l'Europe (Carof et al., 2019).

CONCLUSIONS

Une grande partie des études conduites jusqu'ici sur les associations céréales-légumineuses ont montré leurs avantages en termes de gains de production, surtout pour des conditions de bas intrants. Les études conduites dans cette thèse mettent en avant que, en plus des gains de biomasse, les effets bénéfiques des associations céréales-légumineuses à court terme peuvent aussi se traduire en un maintien ou une amélioration du fonctionnement du sol, et cela même dans des conditions fertilisées. En effet, nous avons pu mettre en évidence que, même si les effets des associations céréales-légumineuses sur plusieurs paramètres du sol au cours d'un cycle de culture n'ont pas été notables vis-à-vis des effets des cultures mono-spécifiques correspondantes, ce qui peut être aussi expliqué par quelques limites de l'étude, le fonctionnement du sol a pu être : i) maintenu au niveau des cultures mono-spécifiques, ii) voire amélioré vis-à-vis de l'une des deux cultures mono-spécifiques, iii) en étant en aucun cas à un niveau inférieur aux cultures pures. Ce travail a également mis en exergue que les processus rhizosphériques ayant lieu au sein de l'association blé-lupin sont à l'origine des effets observés, montrant l'importance du compartiment rhizosphérique pour produire des effets d'héritage positifs (*positive plant legacy effects*) dans les sols lors des successions culturales. Comme autre résultat majeur, cette thèse a montré aussi que les effets à court terme des associations céréales-légumineuses sur le fonctionnement du sol peuvent également se traduire par une meilleure stabilité d'activités microbiennes liées aux cycles de C et N, face à un stress thermique. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude montre les effets d'une association de cultures annuelles sur la stabilité d'une activité microbienne importante liée au cycle de l'azote, telle que la nitrification. Les résultats produits dans cette thèse sont donc encourageants pour la poursuite d'études sur ce sujet.

Ainsi, dans un contexte de besoin de redessiner les pratiques agricoles pour faire face aux changements climatiques et à une demande alimentaire croissante, tout en maintenant des services écosystémiques essentiels à la planète, le choix des agriculteurs pour cultiver des associations au lieu de cultures mono-spécifiques peut être fondé, au-delà des gains de rendements attendus. En effet, mes travaux suggèrent que l'insertion des associations céréales-légumineuses dans les successions culturales peut être prise en compte dans une optique de multiplication des effets d'héritage positifs à court terme, tant en termes de gains de production, que de maintien ou d'amélioration de la qualité des sols (et par extension de leur résistance et résilience), et *in fine* au maintien de plusieurs services écosystémiques de support et de régulation nécessaires à la durabilité des agroécosystèmes.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Pré-expérience réalisée pour la détermination du stress thermique de l'Expérience 2

Afin de déterminer la modalité d'application du stress thermique (température et durée) pour l'Expérience 2, une pré-expérience a été conduite en février 2017 avec des sols issus de la première récolte (stade floraison) de l'Expérience 1. Ces sols avaient aussi été stockés à 4°C jusqu'à la mise en place de cette pré-manipulation. Pour ce faire, 11 échantillons de 100 g de sol ont été constitués et mis à la capacité au champ (28% d'humidité pondérale). Suite à cette homogénéisation des conditions initiales via l'humectation, l'un des 11 échantillons a été tout de suite remis à 4°C afin de servir de témoin à temps -1. Les autres 10 échantillons ont été placés à 12°C pendant 5 jours, pour une phase dite de ré-acclimatation. Cette température de 12°C a été choisie pour éviter une trop forte production de nitrates due à un flush qui pourrait éventuellement se produire dans les sols à des températures plus élevées. Au terme de la phase de ré-acclimatation, l'un des 10 échantillons a été également remis à 4°C pour servir de témoin à temps 0. Les 9 échantillons restants ont été ainsi utilisés pour la pré-expérience proprement dite, dans laquelle 3 températures (28°C, 38°C et 48°C) et 3 durées de stress (2, 5 et 7 jours) ont été testées, totalisant 9 traitements. A l'issue des différents traitements appliqués, les échantillons ont été immédiatement conditionnés à 4°C et envoyés au laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon pour les mesures de SIR et de NEA. Les résultats de cette pré-expérience sont illustrés sur la Figure 20. Des coefficients Q_{10} ont été également calculés avec les valeurs de NEA (variable de référence de cette étude) pour une augmentation de température de 28°C à 38°C, et de 38°C à 48°C, et les résultats obtenus ont été les suivants pour l'ordre des températures considéré ci-avant : 1,05 et 0,123, pour le stress de 2 jours ; 0,77 et 0,875, pour le stress de 5 jours ; et 1,57 et 0,92 pour le stress de 7 jours. D'après les résultats observés sur la Figure 20 et les valeurs de Q_{10} pour la nitrification, le stress de 48°C pendant 2 jours a été celui qui a provoqué la réduction la plus importante des activités microbiennes, c'est pourquoi cette modalité de stress a été retenue pour l'expérimentation principale.

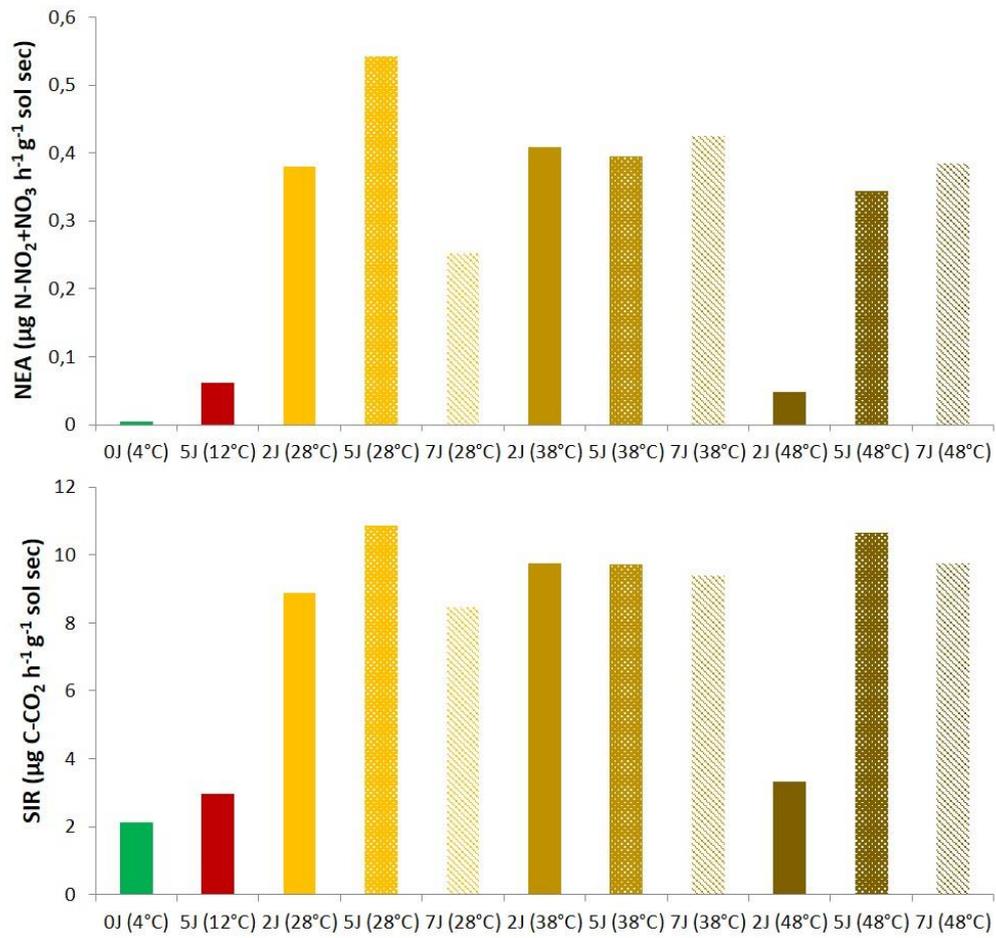


Figure 20. Résultats de la pré-expérience réalisée avant la mise en place de l'Expérience 2, pour la détermination de la modalité (température et durée) du stress thermique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aholoukpe, H. N. S. (2009). Variabilité spatiale du sol et de sa matière organique : étude préalable aux essais d'agriculture biologique. Master's thesis, Université des sciences et techniques de Montpellier II, Montpellier.
- Allison, S. D., and Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 11512-11519.
- Allison, S. D., McGuire, K. L., and Treseder, K. K. (2010). Resistance of microbial and soil properties to warming treatment seven years after boreal fire. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1872-1878.
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment* **74**.
- Alvey, S., Yang, C.-H., Buerkert, A., and Crowley, D. E. (2003). Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. *Biology and Fertility of Soils* **37**, 73-82.
- Amossé, C., Jeuffroy, M.-H., Celette, F., and David, C. (2013). Relay-intercropped forage legumes help to control weeds in organic grain production. *European Journal of Agronomy* **49**, 158-167.
- Andersen, M. K., Hauggaard-Nielsen, H., Ambus, P., and Jensen, E. S. (2005). Biomass production, symbiotic nitrogen fixation and inorganic N use in dual and tri-component annual intercrops. *Plant and Soil* **266**, 273-287.
- Andersen, M. K., Hauggaard-Nielsen, H., Høgh-Jensen, H., and Jensen, E. S. (2007). Competition for and utilisation of sulfur in sole and intercrops of pea and barley. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **77**, 143-153.
- Anderson, J. P. E., and Domsch, K. H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology & Biochemistry* **10**, 215-221.
- Armas, C., Ordiales, R., and Pugnaire, F. I. (2004). Measuring plant interactions: a new comparative index. *Ecology* **85**, 2682-2686.
- Avrahami, S., and Conrad, R. (2003). Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6152-6164.
- Azo, W. M., Lane, G. P. F., Davies, W. P., and Cannon, N. D. (2012). Bi-cropping white lupins (*Lupinus albus* L.) with cereals for wholecrop forage in organic farming: The effect of seed rate and harvest dates on crop yield and quality. *Biological Agriculture & Horticulture* **28**, 86-100.
- Bache, B. W. (1984). The role of calcium in buffering soils. *Plant, Cell & Environment* **7**, 391-395.
- Bailey, J. K., and Schweitzer, J. A. (2016). The rise of plant–soil feedback in ecology and evolution. *Functional Ecology* **30**, 1030-1031.
- Banerjee, S., Kirkby, C. A., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J. A., and Richardson, A. E. (2016). Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry* **97**, 188-198.
- Banik, P., Midya, A., Sarkar, B. K., and Ghose, S. S. (2006). Wheat and chickpea intercropping systems in an additive series experiment: Advantages and weed smothering. *European Journal of Agronomy* **24**, 325-332.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., and Balsler, T. (2005). Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **7**, 27-49.
- Baxendale, C., Orwin, K. H., Poly, F., Pommier, T., and Bardgett, R. D. (2014). Are plant-soil feedback responses explained by plant traits? *New Phytol* **204**, 408-23.
- Becana, M., Wienkoop, S., and Matamoros, M. A. (2018). Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. *Front Plant Sci* **9**, 1434.
- Bedoussac, L., Journet, E. P., Hauggaard-Nielsen, H., Naudin, C., Corre-Hellou, G., Jensen, E., Prieur, L., and Justes, E. (2015). Ecological principles underlying the increase of productivity achieved by cereal-grain legume intercrops in organic farming. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 911-935.

- Bedoussac, L., and Justes, E. (2010a). Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat–winter pea intercrop. *Plant and soil* **330**, 37-54.
- Bedoussac, L., and Justes, E. (2010b). The efficiency of a durum wheat-winter pea intercrop to improve yield and wheat grain protein concentration depends on N availability during early growth. *Plant and Soil* **330**, 19-35.
- Bedoussac, L., and Justes, E. (2011). A comparison of commonly used indices for evaluating species interactions and intercrop efficiency: Application to durum wheat–winter pea intercrops. *Field Crops Research* **124**, 25-36.
- Bender, E. A., Case, T. J., and Gilpin, M. E. (1984). Perturbation experiments in community ecology: theory and practice. *Ecology* **65**, 1-13.
- Bérard, A., Ben Sassi, M., Kaisermann, A., and Renault, P. (2015). Soil microbial community responses to heat wave components: drought and high temperature. *Climate Research* **66**, 243-264.
- Bérard, A., Ben Sassi, M., Renault, P., and Gros, R. (2012). Severe drought-induced community tolerance to heat wave. An experimental study on soil microbial processes. *Journal of Soils and Sediments* **12**, 513-518.
- Bérard, A., Bouchet, T., Sévenier, G., Pablo, A. L., and Gros, R. (2011). Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *European Journal of Soil Biology* **47**, 333-342.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., and Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science* **17**, 478-486.
- Bertness, M. D., and Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends in ecology & evolution* **9**, 191-193.
- Betencourt, E., Duputel, M., Colomb, B., Desclaux, D., and 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.
- Bever, J. D., Westover, K. M., and Antonovics, J. (1997). Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, 561-573.
- Blum, W. (1994). Soil resilience. General approaches and definition. In "Proc. 15 th World Cong. of Soil Sci. Acapulco, México", pp. 233-237.
- Bolan, N., Hedley, M., and White, R. (1991). Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant and soil* **134**, 53-63.
- Bommarco, R., Kleijn, D., and Potts, S. G. (2013). Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends Ecol Evol* **28**, 230-8.
- Borics, G., Várbió, G., and Padisák, J. (2013). Disturbance and stress: different meanings in ecological dynamics? *Hydrobiologia* **711**, 1-7.
- Botton, S., Van Heusden, M., Parsons, J., Smidt, H., and Van Straalen, N. (2006). Resilience of microbial systems towards disturbances. *Critical reviews in microbiology* **32**, 101-112.
- Boudreau, M. A. (2013). Diseases in intercropping systems. *Annual review of phytopathology* **51**, 499-519.
- Bramley, H., Turner, D., Tyerman, S., and Turner, N. (2007). Water flow in the roots of crop species: the influence of root structure, aquaporin activity, and waterlogging. *Advances in agronomy* **96**, 133-196.
- Brandt, K. K., Frandsen, R. J. N., Holm, P. E., and Nybroe, O. (2010). Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 748-757.
- Brooker, R., Kikvidze, Z., Pugnaire, F. I., Callaway, R. M., Choler, P., Lortie, C. J., and Michalet, R. (2005). The importance of importance. *Oikos* **109**, 63-70.
- Brooker, R. W., Bennett, A. E., Cong, W.-F., Daniell, T. J., George, T. S., Hallett, P. D., Hawes, C., Iannetta, P. P. M., Jones, H. G., Karley, A. J., Li, L., McKenzie, B. M., Pakeman, R. J., Paterson, E., Schöb, C., Shen, J., Squire, G., Watson, C. A., Zhang, C., Zhang, F., Zhang, J., and White, P. J. (2015).

- Improving intercropping: a synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist* **206**, 107-117.
- Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L., Cavieres, L. A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J. M., and Anthelme, F. (2008). Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of ecology* **96**, 18-34.
- Callaway, R. M. (1995). Positive interactions among plants. *The Botanical Review* **61**, 306-349.
- Calvo, P., Nelson, L., and Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* **383**, 3-41.
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., and Wanek, W. (2019). Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in plant science* **10**.
- Cantarel, A. A. M., Pommier, T., Desclos-Theveniau, M., Diquélou, S., Schloter, M., and Poly, F. (2015). Using plant traits to explain plant–microbe relationships involved in nitrogen acquisition. *Ecology* **96(3)**, 788-799.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G. M., Tilman, D., Wardle, D. A., Kinzig, A. P., Daily, G. C., Loreau, M., Grace, J. B., Larigauderie, A., Srivastava, D. S., and Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**, 59-67.
- Cardoso, E., Nogueira, M., and Ferraz, S. (2007). Biological N₂ fixation and mineral N in common bean–maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil. *Experimental Agriculture* **43**, 319-330.
- Carof, M., Godinot, O., and Ridier, A. (2019). Diversity of protein-crop management in western France. *Agronomy for Sustainable Development* **39**, 15.
- Chaer, G., Fernandes, M., Myrold, D., and Bottomley, P. (2009). Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb Ecol* **58**, 414-24.
- Chai, Q., Huang, P., and Huang, G. (2005). Effect of intercropping on soil microbial and enzyme activity in the rhizosphere. *Acta Prataculturae Sinica* **14**, 105-110.
- Chapagain, T., and Riseman, A. (2014). Barley–pea intercropping: Effects on land productivity, carbon and nitrogen transformations. *Field Crops Research* **166**, 18-25.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS one* **8**, e55731.
- Chen, C., Chen, H. Y., Chen, X., and Huang, Z. (2019). Meta-analysis shows positive effects of plant diversity on microbial biomass and respiration. *Nature communications* **10**, 1332.
- Chen, J., Arafat, Y., Wu, L., Xiao, Z., Li, Q., Khan, M. A., Khan, M. U., Li, S., and Li, W. (2018). Shifts in soil microbial community, soil enzymes and crop yield under peanut/maize intercropping with reduced nitrogen levels. *Applied Soil Ecology* **124**, 327-334.
- Cong, W. F., Hoffland, E., Li, L., Six, J., Sun, J. H., Bao, X. G., Zhang, F. S., and van der Werf, W. (2015). Intercropping enhances soil carbon and nitrogen. *Global Change Biology* **21**, 1715-1726.
- Corre-Hellou, G., Baranger, A., Bedoussac, L., Cassagne, N., Cannavacciuolo, M., Fustec, J., Pelzer, E., and Piva, G. (2014). Interactions entre facteurs biotiques et fonctionnement des associations végétales. *Innovations Agronomiques* **40**, 25-42.
- Corre-Hellou, G., Bedoussac, L., Bousseau, D., Chaigne, G., Chataigner, C., Celette, F., Cohan, J.-P., Coutard, J.-P., Emile, J. C., and Floriot, M. (2013). Associations céréale-légumineuse multi-services. *Innovations Agronomiques* **30**, 41-57.
- Corre-Hellou, G., Brisson, N., Launay, M., Fustec, J., and Crozat, Y. (2007). Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea–barley intercrops given different soil nitrogen supplies. *Field Crops Research* **103**, 76-85.
- Corre-Hellou, G., Dibet, A., Aveline, A., and Crozat, Y. (2004). Le pois dans des systèmes à faibles intrants: cultures pures ou associées. *Perspectives agricoles* **306**, 8-10.

- Corre-Hellou, G., Dibet, A., Hauggaard-Nielsen, H., Crozat, Y., Gooding, M., Ambus, P., Dahlmann, C., von Fragstein, P., Pristeri, A., Monti, M., and Jensen, E. S. (2011). The competitive ability of pea–barley intercrops against weeds and the interactions with crop productivity and soil N availability. *Field Crops Research* **122**, 264-272.
- Corre-Hellou, G., Fustec, J., and Crozat, Y. (2006). Interspecific competition for soil N and its Interaction with N₂ fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley Intercrops. *Plant and Soil* **282**, 195-208.
- Cramer, W., Guiot, J., Fader, M., Garrabou, J., Gattuso, J.-P., Iglesias, A., Lange, M. A., Lionello, P., Llasat, M. C., and Paz, S. (2018). Climate change and interconnected risks to sustainable development in the Mediterranean. *Nature Climate Change*, 1.
- Cu, S. T. T., Hutson, J., and Schuller, K. A. (2005). Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* **272**, 143-151.
- Culman, S., Duxbury, J., Lauren, J., and Thies, J. (2006). Microbial community response to soil solarization in Nepal's rice–wheat cropping system. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 3359-3371.
- de Oliveira, A. B., Cantarel, A. A. M., Seiller, M., Florio, A., Bérard, A., Hinsinger, P., and Le Cadre, E. (2020). Short-term plant legacy alters the resistance and resilience of soil microbial communities exposed to heat disturbance in a Mediterranean calcareous soil. *Ecological Indicators* **108**, 105740.
- de Vries, F. T., Wallenstein, M. D., and Bardgett, R. (2017). Below-ground connections underlying above-ground food production: a framework for optimising ecological connections in the rhizosphere. *Journal of Ecology* **105**, 913-920.
- Deng, Y., Jiang, Y.-H., Yang, Y., He, Z., Luo, F., and Zhou, J. (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC bioinformatics* **13**, 113.
- Dennis, P. G., Miller, A. J., and Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology* **72**, 313-327.
- Devau, N., Cadre, E. L., Hinsinger, P., Jaillard, B., and Gérard, F. (2009). Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Applied Geochemistry* **24**, 2163-2174.
- Devau, N., Geard, F., Le Cadre, E., Roger, L., Jaillard, B., and Hinsinger, P. (2008). Using a mechanistic adsorption model to understand the influence of soil pH on the environmental availability of Phosphorus: Application to a Chromic Cambisol. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **72**, A214-A214.
- Devau, N., Hinsinger, P., Le Cadre, E., Colomb, B., and Gerard, F. (2011). Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **75**, 2980-2996.
- Devau, N., Le Cadre, E., Hinsinger, P., and Gerard, F. (2010). A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Ann Bot* **105**, 1183-97.
- Dissanayaka, D. M. S., Maruyama, H., Masuda, G., and Wasaki, J. (2015). Interspecific facilitation of P acquisition in intercropping of maize with white lupin in two contrasting soils as influenced by different rates and forms of P supply. *Plant and Soil* **390**, 223-236.
- Dominati, E., Patterson, M., and Mackay, A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics* **69**, 1858-1868.
- Doran, J. W., and Parkin, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, 1-21.
- Doré, T., Makowski, D., Malézieux, E., Munier-Jolain, N., Tchamitchian, M., and 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.

- Duchene, O., Vian, J.-F., and 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.
- Duru, M., Therond, O., and Fares, M. h. (2015a). Designing agroecological transitions; A review. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 1237-1257.
- Duru, M., Therond, O., Martin, G., Martin-Clouaire, R., Magne, M.-A., Justes, E., Journet, E.-P., Aubertot, J.-N., Savary, S., Bergez, J.-E., and Sarthou, J. P. (2015b). How to implement biodiversity-based agriculture to enhance ecosystem services: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **35**.
- Dybzinski, R., Fargione, J. E., Zak, D. R., Fornara, D., and Tilman, D. (2008). Soil fertility increases with plant species diversity in a long-term biodiversity experiment. *Oecologia* **158**, 85-93.
- EBIC (2019). European Biostimulants Industry Council. Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. <http://www.biostimulants.eu/>
- Ehrmann, J., and Ritz, K. (2014). Plant: soil interactions in temperate multi-cropping production systems. *Plant and Soil* **376**, 1-29.
- Eisenhauer, N. (2012). Aboveground–belowground interactions as a source of complementarity effects in biodiversity experiments. *Plant and Soil* **351**, 1-22.
- Eisenhauer, N., Beßler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., Partsch, S., Sabais, A. C., Scherber, C., and Steinbeiss, S. (2010). Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology* **91**, 485-496.
- Eisenhauer, N., Hines, J., Isbell, F., van der Plas, F., Hobbie, S. E., Kazanski, C. E., Lehmann, A., Liu, M., Lochner, A., Rillig, M. C., Vogel, A., Worm, K., and Reich, P. B. (2018). Plant diversity maintains multiple soil functions in future environments. *Elife* **7**.
- Eisenhauer, N., Lanoue, A., Strecker, T., Scheu, S., Steinauer, K., Thakur, M. P., and Mommer, L. (2017). Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. *Scientific reports* **7**, 44641.
- Erguder, T. H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M., and Verstraete, W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS microbiology reviews* **33**, 855-869.
- Fan, F., Zhang, F., and Lu, Y. (2011). Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 46-54.
- Fan, F., Zhang, F., Song, Y., Sun, J., Bao, X., Guo, T., and Li, L. (2006). Nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) interacting with a non-legume in two contrasting intercropping systems. *Plant and Soil* **283**, 275-286.
- Fan, X., Tang, C., and Rengel, Z. (2002). Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release in five nodulated grain legumes. *Annals of Botany* **90**, 315-323.
- Faucon, M.-P., Houben, D., and Lambers, H. (2017). Plant functional traits: soil and ecosystem services. *Trends in Plant Science* **22**, 385-394.
- Faucon, M.-P., Houben, D., Reynoird, J.-P., Mercadal-Dulaurent, A.-M., Armand, R., and Lambers, H. (2015). Advances and perspectives to improve the phosphorus availability in cropping systems for agroecological phosphorus management. In "Advances in agronomy", Vol. 134, pp. 51-79. Elsevier.
- Fernández-Aparicio, M., Emeran, A. A., and Rubiales, D. (2010). Inter-cropping with berseem clover (*Trifolium alexandrinum*) reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop protection* **29**, 867-871.
- Fierer, N., and Schimel, J. P. (2002). Effects of drying–rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 777-787.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., and Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 14683-14688.

- Fridley, J. D. (2001). The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* **93**, 514-526.
- Fujino, C., Wada, S., Konoike, T., Toyota, K., Suga, Y., and Ikeda, J.-i. (2008). Effect of different organic amendments on the resistance and resilience of the organic matter decomposing ability of soil and the role of aggregated soil structure. *Soil science and plant nutrition* **54**, 534-542.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., and Bellmann, A. (2004). Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* **85**, 2630-2637.
- Garnier, E., and Navas, M.-L. (2012). A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 365-399.
- Génard, T., Etienne, P., Diquélou, S., Yvin, J.-C., Revellin, C., and Laîné, P. (2017). Rapeseed-legume intercrops: plant growth and nitrogen balance in early stages of growth and development. *Heliyon* **3**, e00261-e00261.
- Ghaley, B. B., Hauggaard-Nielsen, H., Høgh-Jensen, H., and Jensen, E. S. (2005). Intercropping of Wheat and Pea as Influenced by Nitrogen Fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **73**, 201-212.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., and Paknikar, K. M. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology advances* **29**, 792-803.
- Granzow, S., Kaiser, K., Wemheuer, B., Pfeiffer, B., Daniel, R., Vidal, S., and Wemheuer, F. (2017). The Effects of Cropping Regimes on Fungal and Bacterial Communities of Wheat and Faba Bean in a Greenhouse Pot Experiment Differ between Plant Species and Compartment. *Front Microbiol* **8**, 902.
- Greiner, L., Keller, A., Grêt-Regamey, A., and Papritz, A. (2017). Soil function assessment: review of methods for quantifying the contributions of soils to ecosystem services. *Land Use Policy* **69**, 224-237.
- Griffiths, B., Ritz, K., Bardgett, R. D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S., Bååth, E., Bloem, J., and De Ruiter, P. (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* **90**, 279-294.
- Griffiths, B. S., and Philippot, L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 112-29.
- Grman, E., and Suding, K. N. (2010). Within-year soil legacies contribute to strong priority effects of exotics on native California grassland communities. *Restoration Ecology* **18**, 664-670.
- Guillot, E., Hinsinger, P., Dufour, L., Roy, J., and Bertrand, I. (2019). With or without trees: Resistance and resilience of soil microbial communities to drought and heat stress in a Mediterranean agroforestry system. *Soil Biology & Biochemistry* **129**, 122-135.
- Gurr, G. M., Wratten, S. D., and Luna, J. M. (2003). Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. *Basic and Applied Ecology* **4**, 107-116.
- Hamdi, S., Chevallier, T., Ben Aïssa, N., Ben Hammouda, M., Gallali, T., Chotte, J.-L., and Bernoux, M. (2011). Short-term temperature dependence of heterotrophic soil respiration after one-month of pre-incubation at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 1752-1758.
- Hamnér, K., Weih, M., Eriksson, J., and Kirchmann, H. (2017). Influence of nitrogen supply on macro- and micronutrient accumulation during growth of winter wheat. *Field Crops Research* **213**, 118-129.
- Hannula, S. E., Boschker, H. T., de Boer, W., and van Veen, J. A. (2012). ¹³C pulse-labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch-modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isoline. *New Phytol* **194**, 784-99.
- Hao, W.-y., Ren, L.-x., Ran, W., and Shen, Q.-r. (2010). Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant and Soil* **336**, 485-497.

- Hassen, A., Talore, D. G., Tesfamariam, E. H., Friend, M. A., and Mpanza, T. D. E. (2017). Potential use of forage-legume intercropping technologies to adapt to climate-change impacts on mixed crop-livestock systems in Africa: a review. *Regional Environmental Change* **17**, 1713-1724.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus, P., and Jensen, E. S. (2003). The comparison of nitrogen use and leaching in sole cropped versus intercropped pea and barley. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **65**, 289-300.
- Hauggaard-Nielsen, H., Gooding, M., Ambus, P., Corre-Hellou, G., Crozat, Y., Dahlmann, C., Dibet, A., von Fragstein, P., Pristeri, A., Monti, M., and Jensen, E. S. (2009). Pea–barley intercropping for efficient symbiotic N₂-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crops Research* **113**, 64-71.
- Hauggaard-Nielsen, H., Jørnsgaard, B., Kinane, J., and Jensen, E. S. (2008). Grain legume–cereal intercropping: the practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems* **23**, 3-12.
- He, Y., Ding, N., Shi, J., Wu, M., Liao, H., and Xu, J. (2013). Profiling of microbial PLFAs: Implications for interspecific interactions due to intercropping which increase phosphorus uptake in phosphorus limited acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* **57**, 625-634.
- Heisler, J. L., and Weltzin, J. F. (2006). Variability matters: towards a perspective on the influence of precipitation on terrestrial ecosystems. *The New phytologist* **172**, 189-192.
- Helyar, K. R., and Porter, W. (1989). Soil acidification, its measurement and the processes involved. *Soil acidity and plant growth* **61102**.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* **237**, 173-195.
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., and Young, I. M. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and soil* **321**, 117-152.
- Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., and Zhang, F. (2011). P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* **156**, 1078-1086.
- Hinsinger, P., Gobran, G. R., Gregory, P. J., and Wenzel, W. W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* **168**, 293-303.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., and Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**, 43-59.
- Hobbie, S. E. (1992). Effects of plant species on nutrient cycling. *Trends in ecology & evolution* **7**, 336-339.
- Høgh-Jensen, H., and Schjoerring, J. K. (2001). Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 439-448.
- Hooper, D. U., Adair, E. C., Cardinale, B. J., Byrnes, J. E., Hungate, B. A., Matulich, K. L., Gonzalez, A., Duffy, J. E., Gamfeldt, L., and O'Connor, M. I. (2012). A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* **486**, 105-8.
- Hu, L., Robert, C. A. M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., van der Heijden, M. G. A., Schlaeppli, K., and Erb, M. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nat Commun* **9**, 2738.
- Huang, X., Zhou, X., Zhang, J., and Cai, Z. (2019). Highly connected taxa located in the microbial network are prevalent in the rhizosphere soil of healthy plant. *Biology and fertility of soils* **55**, 299-312.
- Hunter, P. J., Teakle, G., and Bending, G. D. (2014). Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica. *Frontiers in plant science* **5**, 27.
- Hutchinson, G. (1957). Concluding remarks: Cold Sprig Harbor Symposia on Quantitative Biology. *In* "Cold Sprig Harbor Symposia on Quantitative Biology: Yale University New Haven", pp. 66-77.

- in 't Zandt, D., van den Brink, A., de Kroon, H., and Visser, E. J. W. (2019). Plant-soil feedback is shut down when nutrients come to town. *Plant and Soil* **439**, 541-551.
- Inal, A., Gunes, A., Zhang, F., and Cakmak, I. (2007). Peanut/maize intercropping induced changes in rhizosphere and nutrient concentrations in shoots. *Plant Physiol Biochem* **45**, 350-6.
- IPCC (2019). Climate Change and Land. An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.
- Irshad, U., Brauman, A., Villenave, C., and Plassard, C. (2012). Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant and Soil* **358**, 148-161.
- Irshad, U., Villenave, C., Brauman, A., and Plassard, C. (2011). Grazing by nematodes on rhizosphere bacteria enhances nitrate and phosphorus availability to *Pinus pinaster* seedlings. *Soil Biology & Biochemistry* **43**, 2121-2126.
- Jamont, M., Dubois-Pot, C., and Jaloux, B. (2014). Nectar provisioning close to host patches increases parasitoid recruitment, retention and host parasitism. *Basic and Applied Ecology* **15**, 151-160.
- Jansa, J., Mozafar, A., Kuhn, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I., and Frossard, E. (2003). Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications* **13**, 1164-1176.
- Jenkinson, D. S., Brookes, P. C., and Powlson, D. S. (2004). Measuring soil microbial biomass. *Soil biology and biochemistry* **1**, 5-7.
- Jensen, E. S. (1996). Grain yield, symbiotic N₂ fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant and soil* **182**, 25-38.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* **205**, 25-44.
- Jones, D. L., Nguyen, C., and Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* **321**, 5-33.
- Justes, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Fustec, J., Hinsinger, P., Jeuffroy, M.-H., Journet, E. P., Louarn, G., Naudin, C., and Pelzer, E. (2014). Les processus de complémentarité de niche et de facilitation déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques. *Innovations Agronomiques* **40**, 1-24.
- Kandeler, E. (2007). Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In "Soil microbiology, ecology and biochemistry", pp. 53-83. Elsevier.
- Karlen, D., Mausbach, M. J., Doran, J., Cline, R., Harris, R., and Schuman, G. (1997). Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation *Soil Science Society of America Journal* **61**, 4-10.
- Kaufman, L. H. (1982). Stream aufwuchs accumulation: disturbance frequency and stress resistance and resilience. *Oecologia* **52**, 57-63.
- Kimball, B. A., Conley, M. M., Wang, S., Lin, X., Luo, C., Morgan, J., and Smith, D. (2008). Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. *Global Change Biology* **14**, 309-320.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., José, R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., and Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543.
- Kremen, C., Iles, A., and Bacon, C. (2012). Diversified farming systems: an agroecological, systems-based alternative to modern industrial agriculture. *Ecology and Society* **17**.
- Kulmatiski, A., and Beard, K. H. (2011). Long-term plant growth legacies overwhelm short-term plant growth effects on soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 823-830.
- Kumar, A., and Verma, J. P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological research* **207**, 41-52.
- Kuzyakov, Y., and Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* **83**, 184-199.
- Kuzyakov, Y., and Razavi, B. S. (2019). Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biology and Biochemistry* **135**, 343-360.

- Kuzyakov, Y., and Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198**, 656-669.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C. A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R. I., Mellado-Vázquez, P. G., Malik, A. A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B. C., Trumbore, S. E., and Gleixner, G. (2015). Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature Communications* **6**.
- Latati, M., Aouiche, A., Tellah, S., Laribi, A., Benlahrech, S., Kaci, G., Ouarem, F., and Ounane, S. M. (2017). Intercropping maize and common bean enhances microbial carbon and nitrogen availability in low phosphorus soil under Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology* **80**, 9-18.
- Latati, M., Bargaz, A., Belarbi, B., Lazali, M., Benlahrech, S., Tellah, S., Kaci, G., Drevon, J. J., and Ounane, S. M. (2016). The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *European Journal of Agronomy* **72**, 80-90.
- Latati, M., Blavet, D., Alkama, N., Laoufi, H., Drevon, J. J., Gerard, F., Pansu, M., and Ounane, S. M. (2014). The intercropping cowpea-maize improves soil phosphorus availability and maize yields in an alkaline soil. *Plant and Soil* **385**, 181-191.
- Lavorel, S., Grigulis, K., Lamarque, P., Colace, M. P., Garden, D., Girel, J., Pellet, G., and Douzet, R. (2011). Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *Journal of Ecology* **99**, 135-147.
- Le Cadre, E. (2004). Modélisation de la volatilisation de l'ammoniac en interaction avec les processus chimiques et biologiques du sol (le modèle VOLT'AIR). Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris Grignon, 211 pg.
- Le Roux, X., Schmid, B., Poly, F., Barnard, R. L., Niklaus, P. A., Guillaumaud, N., Habekost, M., Oelmann, Y., Philippot, L., Salles, J. F., Schloter, M., Steinbeiss, S., and Weigelt, A. (2013). Soil environmental conditions and microbial build-up mediate the effect of plant diversity on soil nitrifying and denitrifying enzyme activities in temperate grasslands. *PLoS One* **8**, e61069.
- Legay, N., Baxendale, C., Grigulis, K., Krainer, U., Kastl, E., Schloter, M., Bardgett, R. D., Arnoldi, C., Bahn, M., and Dumont, M. (2014). Contribution of above-and below-ground plant traits to the structure and function of grassland soil microbial communities. *Annals of botany* **114**, 1011-1021.
- Li, C., Dong, Y., Li, H., Shen, J., and Zhang, F. (2016a). Shift from complementarity to facilitation on P uptake by intercropped wheat neighboring with faba bean when available soil P is depleted. *Sci Rep* **6**, 18663.
- Li, H., Shen, J., Zhang, F., Clairotte, M., Drevon, J. J., Le Cadre, E., and Hinsinger, P. (2008). Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* **312**, 139-150.
- Li, H., Shen, J., Zhang, F., Marschner, P., Cawthray, G., and Rengel, Z. (2010). Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* **46**, 79-91.
- Li, L., Li, S. M., Sun, J. H., Zhou, L. L., Bao, X. G., Zhang, H. G., and Zhang, F. S. (2007). Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11192-6.
- Li, L., Tang, C., Rengel, Z., and Zhang, F. (2003a). Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant and Soil* **248**, 297-303.
- Li, L., Tang, C., Rengel, Z., and Zhang, F. (2004a). Calcium, magnesium and microelement uptake as affected by phosphorus sources and interspecific root interactions between wheat and chickpea. *Plant and Soil* **261**, 29-37.
- Li, L., Tilman, D., Lambers, H., and Zhang, F. S. (2014). Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist* **203**, 63-69.

- Li, L., Zhang, F., Li, X., Christie, P., Sun, J., Yang, S., and Tang, C. (2003b). Interspecific facilitation of nutrient uptake by intercropped maize and faba bean. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **65**, 61-71.
- Li, L., Zhang, L., and Zhang, F. (2013). Crop Mixtures and the Mechanisms of Overyielding. 382-395.
- Li, Q. S., Wu, L. K., Chen, J., Khan, M. A., Luo, X. M., and Lin, W. X. (2016b). Biochemical and microbial properties of rhizospheres under maize/peanut intercropping. *Journal of Integrative Agriculture* **15**, 101-110.
- Li, Q. Z., Sun, J. H., Wei, X. J., Christie, P., Zhang, F. S., and Li, L. (2011). Overyielding and interspecific interactions mediated by nitrogen fertilization in strip intercropping of maize with faba bean, wheat and barley. *Plant and Soil* **339**, 147-161.
- Li, S. M., Li, L., Zhang, F. S., and Tang, C. (2004b). Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Ann Bot* **94**, 297-303.
- Li, W., Li, L., Sun, J., Guo, T., Zhang, F., Bao, X., Peng, A., and Tang, C. (2005). Effects of intercropping and nitrogen application on nitrate present in the profile of an Orthic Anthrosol in Northwest China. *Agriculture, ecosystems & environment* **105**, 483-491.
- Li, X., Jousset, A., de Boer, W., Carrión, V. J., Zhang, T., Wang, X., and Kuramae, E. E. (2018). Legacy of land use history determines reprogramming of plant physiology by soil microbiome. *The ISME journal*, 1.
- Li, Y., Ran, W., Zhang, R., Sun, S., and Xu, G. (2009). Facilitated legume nodulation, phosphate uptake and nitrogen transfer by arbuscular inoculation in an upland rice and mung bean intercropping system. *Plant and Soil* **315**, 285-296.
- Lithourgidis, A. S., Dordas, C. A., Damalas, C. A., and Vlachostergios, D. N. (2011). Annual intercrops: an alternative pathway for sustainable agriculture. *Australian Journal of Crop Science* **5**, 396-410.
- Liu, D., Keiblinger, K. M., Leitner, S., Wegner, U., Zimmermann, M., Fuchs, S., Lassek, C., Riedel, K., and Zechmeister-Boltenstern, S. (2019). Response of Microbial Communities and Their Metabolic Functions to Drying(-)Rewetting Stress in a Temperate Forest Soil. *Microorganisms* **7**.
- López-Gutiérrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G., and Philippot, L. (2004). Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 399-407.
- Macdonald, C. A., Clark, I. M., Zhao, F.-J., Hirsch, P. R., Singh, B. K., and McGrath, S. P. (2011). Long-term impacts of zinc and copper enriched sewage sludge additions on bacterial, archaeal and fungal communities in arable and grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 932-941.
- Maestre, F. T., Callaway, R. M., Valladares, F., and Lortie, C. J. (2009). Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* **97**, 199-205.
- Mahieu, S., Escarré, J., Brunel, B., Méjamolle, A., Soussou, S., Galiana, A., and Cleyet-Marel, J.-C. (2014). Soil nitrogen balance resulting from N fixation and rhizodeposition by the symbiotic association *Anthyllis vulneraria*/Mesorhizobium metallidurans grown in highly polluted Zn, Pb and Cd mine tailings. *Plant and Soil* **375**, 175-188.
- Malézieux, E. (2012). Designing cropping systems from nature. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 15-29.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S., and Valantin-Morison, M. (2009). Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **29**, 43-62.
- Mallarino, A., and Wedin, W. (1990). Effect of species and proportion of legume on herbage yield and nitrogen concentration of legume-grass mixtures. *Grass and Forage Science* **45**, 393-402.
- Mariotte, P., Mehrabi, Z., Bezemer, T. M., De Deyn, G. B., Kulmatiski, A., Drigo, B., Veen, G. F. C., van der Heijden, M. G. A., and Kardol, P. (2018). Plant-Soil Feedback: Bridging Natural and Agricultural Sciences. *Trends Ecol Evol* **33**, 129-142.

- Marschner, P., Neumann, G., Kania, A., Weiskopf, L., and Lieberei, R. (2002). Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* **246**, 167-174.
- Martin-Guay, M. O., Paquette, A., Dupras, J., and Rivest, D. (2018). The new Green Revolution: Sustainable intensification of agriculture by intercropping. *Sci Total Environ* **615**, 767-772.
- Mathieu, O., Henault, C., Leveque, J., Baujard, E., Milloux, M. J., and Andreux, F. (2006). Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using ¹⁵N tracers. *Environ Pollut* **144**, 933-40.
- McAuliffe, C., Chamblee, D., Uribe-Arango, H., and Woodhouse, W. (1958). Influence of Inorganic Nitrogen on Nitrogen Fixation by Legumes as Revealed by N¹⁵. *Agronomy Journal* **50**, 334-337.
- McDaniel, M., Tiemann, L., and Grandy, A. (2014). Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecological Applications* **24**, 560-570.
- Midega, C. A., Khan, Z. R., Amudavi, D. M., Pittchar, J., and Pickett, J. A. (2010). Integrated management of *Striga hermonthica* and cereal stemborers in finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) through intercropping with *Desmodium intortum*. *International journal of pest management* **56**, 145-151.
- Millennium Ecosystem Assessment, M. (2005). "Ecosystems and human well-being: Health synthesis," Island press Washington, DC.
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wasseem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankiewicz, V. C., Cruz, L. M., and Chubatsu, L. S. (2012). Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil* **356**, 175-196.
- Mooshammer, M., Hofhansl, F., Frank, A. H., Wanek, W., Hämmerle, I., Leitner, S., Schneckner, J., Wild, B., Watzka, M., and Keiblinger, K. M. (2017). Decoupling of microbial carbon, nitrogen, and phosphorus cycling in response to extreme temperature events. *Science advances* **3**, e1602781.
- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., and Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology* **33**, 540-552.
- Moreau, D., Pivato, B., Bru, D., Busset, H., Deau, F., Faivre, C., Matejicek, A., Strbik, F., Philippot, L., and Mougel, C. (2015). Plant traits related to nitrogen uptake influence plant-microbe competition. *Ecology* **96(8)**, 2300-2310.
- Motisi, N., Montfort, F., Faloya, V., Lucas, P., and Doré, T. (2009). Growing *Brassica juncea* as a cover crop, then incorporating its residues provide complementary control of *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Field Crops Research* **113**, 238-245.
- Naudin, C., Corre-Hellou, G., Pineau, S., Crozat, Y., and Jeuffroy, M.-H. (2010). The effect of various dynamics of N availability on winter pea–wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N₂ fixation. *Field Crops Research* **119**, 2-11.
- Ndzana, R., Magro, A., Bedoussac, L., Justes, E., Journet, E. P., and Hemptinne, J. L. (2014). Is there an associational resistance of winter pea–durum wheat intercrops towards *Acyrtosiphon pisum* H. arris? *Journal of applied entomology* **138**, 577-585.
- Neumann, G., and Römheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* **211**, 121-130.
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M. D. A., and Veneklaas, E. J. (2006). Distribution of Carboxylates and Acid Phosphatase and Depletion of Different Phosphorus Fractions in the Rhizosphere of a Cereal and Three Grain Legumes. *Plant and Soil* **281**, 109-120.
- O'Neill, R. (1976). Ecosystem persistence and heterotrophic regulation. *Ecology* **57**, 1244-1253.
- O'Brien, A. M., Sawers, R. J., Ross-Ibarra, J., and Strauss, S. Y. (2016). Extending the Stress-Gradient hypothesis: greater adaptation between teosinte and soil biota at higher stress sites. *BioRxiv*, 031195.
- Oberson, A., Frossard, E., Buehlmann, C., Mayer, J., Maeder, P., and Luescher, A. (2013). Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant and Soil* **371**, 237-255.

- Oelbermann, M., and Echarte, L. (2011). Evaluating soil carbon and nitrogen dynamics in recently established maize-soyabean inter-cropping systems. *European Journal of Soil Science* **62**, 35-41.
- Ofori, F., Pate, J., and Stern, W. (1987). Evaluation of N₂-fixation and nitrogen economy of a maize/cowpea intercrop system using 15 N dilution methods. *Plant and Soil* **102**, 149-160.
- Ohno, T., and Zibilske, L. M. (1991). Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal* **55**, 892-895.
- Olsen, S. R. (1954). "Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate," United States Department Of Agriculture; Washington.
- Orwin, K. H., Buckland, S. M., Johnson, D., Turner, B. L., Smart, S., Oakley, S., and Bardgett, R. D. (2010). Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal of Ecology* **98**, 1074-1083.
- Orwin, K. H., and Wardle, D. A. (2004). New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1907-1912.
- Orwin, K. H., and Wardle, D. A. (2005). Plant Species Composition Effects on Belowground Properties and the Resistance and Resilience of the Soil Microflora to a Drying Disturbance. *Plant and Soil* **278**, 205-221.
- Patra, A., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., and Philippot, L. (2005). Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* **75**, 65-80.
- Pearse, S. J., Veneklaas, E. J., Cawthray, G. R., Bolland, M. D. A., and Lambers, H. (2006). Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant and Soil* **288**, 127-139.
- Pelzer, E., Bazot, M., Guichard, L., and Jeuffroy, M.-H. (2016). Crop Management Affects the Performance of a Winter Pea–Wheat Intercrop. *Agronomy Journal* **108**, 1089.
- Pelzer, E., Bazot, M., Makowski, D., Corre-Hellou, G., Naudin, C., Al Rifaï, M., Baranger, E., Bedoussac, L., Biarnès, V., Boucheny, P., Carrouée, B., Dorvillez, D., Foissy, D., Gaillard, B., Guichard, L., Mansard, M.-C., Omon, B., Prieur, L., Yvergniaux, M., Justes, E., and Jeuffroy, M.-H. (2012). Pea–wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. *European Journal of Agronomy* **40**, 39-53.
- Pelzer, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Jeuffroy, M.-H., Métivier, T., and Naudin, C. (2014a). Association de cultures annuelles combinant une légumineuse et une céréale: retours d'expériences d'agriculteurs et analyse. *Innovations Agronomiques* (40), 73-91.(2014).
- Pelzer, E., Hombert, N., Jeuffroy, M.-H., and Makowski, D. (2014b). Meta-Analysis of the Effect of Nitrogen Fertilization on Annual Cereal–Legume Intercrop Production. *Agronomy Journal* **106**, 1775.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., and van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* **11**, 789-99.
- Pimm, S. L. (1984). The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**, 321.
- Pirhofer-Walzl, K., Rasmussen, J., Høgh-Jensen, H., Eriksen, J., Sørensen, K., and Rasmussen, J. (2012). Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant and soil* **350**, 71-84.
- Pivato, B., Bru, D., Busset, H., Deau, F., Matejcek, A., Philippot, L., and Moreau, D. (2017). Positive effects of plant association on rhizosphere microbial communities depend on plant species involved and soil nitrogen level. *Soil Biology and Biochemistry* **114**, 1-4.
- Placella, S. A., Brodie, E. L., and Firestone, M. K. (2012). Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10931-6.
- Pommier, T., Cantarel, A. A., Grigulis, K., Lavorel, S., Legay, N., Baxendale, C., Bardgett, R. D., Bahn, M., Poly, F., and Clément, J. C. (2018). The added value of including key microbial traits to determine nitrogen-related ecosystem services in managed grasslands. *Journal of applied ecology* **55**, 49-58.

- Prosser, J. I., and Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends Microbiol* **20**, 523-31.
- Qiao, Y., Li, Z., Wang, X., Zhu, B., Hu, Y., and Zeng, Z. (2012). Effect of legume-cereal mixtures on the diversity of bacterial communities in the rhizosphere. *Plant, Soil and Environment* **58**, 174-180.
- Quijas, S., Schmid, B., and Balvanera, P. (2010). Plant diversity enhances provision of ecosystem services: A new synthesis. *Basic and Applied Ecology* **11**, 582-593.
- R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J., and Habib, R. (2012). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 273-303.
- Renard, D., and Tilman, D. (2019). National food production stabilized by crop diversity. *Nature* **571**, 257-260.
- Robertson, G. P., and Groffman, P. M. (2015). Nitrogen Transformations. In "Soil microbiology, ecology and biochemistry" (E. A. Paul, ed.), pp. 421-446. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., and Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4704-4712.
- Roumet, C., Birouste, M., Picon-Cochard, C., Ghestem, M., Osman, N., Vrignon-Brenas, S., Cao, K. f., and Stokes, A. (2016). Root structure–function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy. *New Phytologist* **210**, 815-826.
- Rubin, R. L., Koch, G. W., Martinez, A., Mau, R. L., Bowker, M. A., and Hungate, B. A. (2018). Developing climate-smart restoration: Can plant microbiomes be hardened against heat waves? *Ecological applications* **28**, 1594-1605.
- Rykiel, E. J. (1985). Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* **10**, 361-365.
- Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., and Le Roux, X. (2006). Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* **8**, 247-257.
- Salomé, C., Coll, P., Lardo, E., Metay, A., Villenave, C., Marsden, C., Blanchart, E., Hinsinger, P., and Le Cadre, E. (2016). The soil quality concept as a framework to assess management practices in vulnerable agroecosystems: A case study in Mediterranean vineyards. *Ecological Indicators* **61**, 456-465.
- Salomé, C., Coll, P., Lardo, E., Villenave, C., Blanchart, E., Hinsinger, P., Marsden, C., and Le Cadre, E. (2014). Relevance of use-invariant soil properties to assess soil quality of vulnerable ecosystems: The case of Mediterranean vineyards. *Ecological Indicators* **43**, 83-93.
- Sas, L., Rengel, Z., and Tang, C. (2002). The effect of nitrogen nutrition on cluster root formation and proton extrusion by *Lupinus albus*. *Annals of botany* **89**, 435-442.
- Schimel, J. P., and Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* **85**, 591-602.
- Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., and van Elsas, J. D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils* **54**, 1-10.
- Schulze, J., Temple, G., Temple, S. J., Beschow, H., and Vance, C. P. (2006). Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Annals of botany* **98**, 731-740.
- Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Fischer, D. G., LeRoy, C. J., Lonsdorf, E. V., Whitham, T. G., and Hart, S. C. (2008). Plant–soil–microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. *Ecology* **89**, 773-781.
- Sebillotte, M. (1990). Système de culture, un concept opératoire pour les agronomes. *Les systèmes de culture. INRA éditions*, 165-196.

- Semchenko, M., Saar, S., and Lepik, A. (2017). Intraspecific genetic diversity modulates plant-soil feedback and nutrient cycling. *New Phytol* **216**, 90-98.
- Seybold, C. A., Herrick, J. E., and Brejda, J. J. (1999). Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Science* **164**, 224-234.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Burgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B., Matulich, K. L., Schmidt, T. M., and Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* **3**, 417.
- Shen, J., Li, C., Mi, G., Li, L., Yuan, L., Jiang, R., and Zhang, F. (2013). Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. *J Exp Bot* **64**, 1181-92.
- Siame, J., Willey, R., and Morse, S. (1998). The response of maize/Phaseolus intercropping to applied nitrogen on Oxisols in northern Zambia. *Field Crops Research* **55**, 73-81.
- Singh, H., Batish, D. R., and Kohli, R. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical reviews in plant sciences* **22**, 239-311.
- Smith, R. G., Gross, K. L., and Robertson, G. P. (2008). Effects of crop diversity on agroecosystem function: crop yield response. *Ecosystems* **11**, 355-366.
- Soliveres, S., Smit, C., and Maestre, F. T. (2015). Moving forward on facilitation research: response to changing environments and effects on the diversity, functioning and evolution of plant communities. *Biological Reviews* **90**, 297-313.
- Song, Y. N., Marschner, P., Li, L., Bao, X. G., Sun, J. H., and Zhang, F. S. (2007a). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* **44**, 307-314.
- Song, Y. N., Zhang, F. S., Marschner, P., Fan, F. L., Gao, H. M., Bao, X. G., Sun, J. H., and Li, L. (2007b). Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* **43**, 565-574.
- Sousa, W. P. (1980). The responses of a community to disturbance: the importance of successional age and species' life histories. *Oecologia* **45**, 72-81.
- Steenwerth, K. L., Jackson, L. E., Calderón, F. J., Scow, K. M., and Rolston, D. E. (2005). Response of microbial community composition and activity in agricultural and grassland soils after a simulated rainfall. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 2249-2262.
- Steinauer, K., Tilman, D., Wragg, P. D., Cesarz, S., Cowles, J. M., Pritsch, K., Reich, P. B., Weisser, W. W., and Eisenhauer, N. (2015). Plant diversity effects on soil microbial functions and enzymes are stronger than warming in a grassland experiment. *Ecology* **96**, 99-112.
- Stoltz, E., and Nadeau, E. (2014). Effects of intercropping on yield, weed incidence, forage quality and soil residual N in organically grown forage maize (*Zea mays* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* **169**, 21-29.
- Strecker, T., Macé, O. G., Scheu, S., and Eisenhauer, N. (2016). Functional composition of plant communities determines the spatial and temporal stability of soil microbial properties in a long-term plant diversity experiment. *Oikos* **125**, 1743-1754.
- Stres, B., Philippot, L., Faganeli, J., and Tiedje, J. M. (2010). Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment. *FEMS Microbiol Ecol* **74**, 323-35.
- Studdert, G. A., and Echeverria, H. (2000). Crop rotations and nitrogen fertilization to manage soil organic carbon dynamics. *Soil Science Society of America Journal* **64**, 1496-1503.
- Subbarao, G., Sahrawat, K., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I., Hash, C., George, T., Rao, P. S., and Nardi, P. (2012). Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. In "Advances in agronomy", Vol. 114, pp. 249-302. Elsevier.
- Tabatabai, M., and Bremner, J. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry* **1**, 301-307.
- Tang, X., Bernard, L., Brauman, A., Daufresne, T., Deleporte, P., Desclaux, D., Souche, G., Placella, S. A., and 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.
- Tang, X., Placella, S. A., Daydé, F., Bernard, L., Robin, A., Journet, E.-P., Justes, E., and Hinsinger, P. (2016). Phosphorus availability and microbial community in the rhizosphere of intercropped cereal and legume along a P-fertilizer gradient. *Plant and Soil* **407**, 119-134.
- Tarafdar, J. C., Yadav, R. S., and Meena, S. C. (2001). Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**, 279-282.
- Taylor, A. E., Giguere, A. T., Zobelein, C. M., Myrold, D. D., and Bottomley, P. J. (2017). Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria. *ISME J* **11**, 896-908.
- Thion, C., and Prosser, J. I. (2014). Differential response of nonadapted ammonia-oxidising archaea and bacteria to drying-rewetting stress. *FEMS Microbiol Ecol* **90**, 380-9.
- Thion, C. E., Poirel, J. D., Cornulier, T., De Vries, F. T., Bardgett, R. D., and Prosser, J. I. (2016). Plant nitrogen-use strategy as a driver of rhizosphere archaeal and bacterial ammonia oxidiser abundance. *FEMS Microbiol Ecol* **92**.
- Thorsted, M. D., Weiner, J., and Olesen, J. E. (2006). Above- and below-ground competition between intercropped winter wheat *Triticum aestivum* and white clover *Trifolium repens*. *Journal of Applied Ecology* **43**, 237-245.
- Tournier, E., Amenc, L., Pablo, A.-L., Legname, E., Blanchart, E., Plassard, C., Robin, A., and Bernard, L. (2015). Modification of a commercial DNA extraction kit for safe and rapid recovery of DNA and RNA simultaneously from soil, without the use of harmful solvents. *MethodsX* **2**, 182-191.
- Trenbath, B. (1993). Intercropping for the management of pests and diseases. *Field crops research* **34**, 381-405.
- Trouillefou, C. M., Le Cadre, E., Cacciaguerra, T., Cunin, F., Plassard, C., and Belamie, E. (2015). Protected activity of a phytase immobilized in mesoporous silica with benefits to plant phosphorus nutrition. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **74**, 55-65.
- Vainio, E. J., and Hantula, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological research* **104**, 927-936.
- van Breemen, N. (1995). How Sphagnum bogs down other plants. *Trends in ecology & evolution* **10**, 270-275.
- van der Putten, W. H. (1997). Plant-soil feedback as a selective force. *Trends in ecology & evolution* **12**, 169-170.
- van der Putten, W. H. (2003). Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology* **84**, 2269-2280.
- van der Putten, W. H., Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., Kardol, P., Klironomos, J. N., Kulmatiski, A., Schweitzer, J. A., Suding, K. N., Van de Voorde, T. F. J., Wardle, D. A., and Hutchings, M. (2013). Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* **101**, 265-276.
- van der Putten, W. H., Bradford, M. A., Pernilla Brinkman, E., van de Voorde, T. F. J., Veen, G. F., and Bailey, J. K. (2016). Where, when and how plant-soil feedback matters in a changing world. *Functional Ecology* **30**, 1109-1121.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., and Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry* **19**, 703-707.
- Vandermeer, J. H. (1992). "The ecology of intercropping," Cambridge University Press.
- Veneklaas, E. J., Stevens, J., Cawthray, G. R., Turner, S., Grigg, A. M., and Lambers, H. (2003). Chickpea and white lupin rhizosphere carboxylates vary with soil properties and enhance phosphorus uptake. *Plant and Soil* **248**, 187-197.
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**, 882-892.

- Voisin, A.-S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J.-M., Mougél, C., Pellerin, S., and Pelzer, E. (2014). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **34**, 361-380.
- Voisin, A.-S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., and Ney, B. (2002). Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and soil* **242**, 251-262.
- Vukicevich, E., Lowery, T., Bowen, P., Úrbez-Torres, J. R., and Hart, M. (2016). Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **36**.
- Walker, J., Hertel, K., Parker, P., and Edwards, J. (2011). "Lupin growth and development."
- Walter, C., Bispo, A., Chenu, C., Langlais-Hesse, A., and Schwartz, C. (2015). Les services écosystémiques des sols: du concept à sa valorisation. *Agriculture et Foncier-Concurrences entre Usages des sols et entre Usagers des sols Agricoles: La Question Foncière Renouvelée*, ed C. Demeter (Paris: Cahier Demeter), 51-68.
- Wang, B. L., Tang, X. Y., Cheng, L. Y., Zhang, A. Z., Zhang, W. H., Zhang, F. S., Liu, J. Q., Cao, Y., Allan, D. L., Vance, C. P., and Shen, J. B. (2010). Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist* **187**, 1112-1123.
- Wang, D., Marschner, P., Solaiman, Z., and Rengel, Z. (2007). Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 249-256.
- Wang, G. Z., Li, H. G., Christie, P., Zhang, F. S., Zhang, J. L., and Bever, J. D. (2016a). Plant-soil feedback contributes to intercropping overyielding by reducing the negative effect of take-all on wheat and compensating the growth of faba bean. *Plant and Soil* **415**, 1-12.
- Wang, X., and Tang, C. (2017). The role of rhizosphere pH in regulating the rhizosphere priming effect and implications for the availability of soil-derived nitrogen to plants. *Annals of botany* **121**, 143-151.
- Wang, X., Tang, C., Severi, J., Butterly, C. R., and Baldock, J. A. (2016b). Rhizosphere priming effect on soil organic carbon decomposition under plant species differing in soil acidification and root exudation. *New Phytologist* **211**, 864-873.
- Wang, Z.-g., Bao, X.-g., Li, X.-f., Jin, X., Zhao, J.-h., Sun, J.-h., Christie, P., and Li, L. (2015). Intercropping maintains soil fertility in terms of chemical properties and enzyme activities on a timescale of one decade. *Plant and Soil* **391**, 265-282.
- Wang, Z. G., Jin, X., Bao, X. G., Li, X. F., Zhao, J. H., Sun, J. H., Christie, P., and Li, L. (2014). Intercropping Enhances Productivity and Maintains the Most Soil Fertility Properties Relative to Sole Cropping. *Plos One* **9**.
- Ward, B. B. (2013). Nitrification. *Encyclopedia of Ecology* **2**, 2511-2518.
- Wardle, D., Bonner, K., and Nicholson, K. (1997). Biodiversity and plant litter: experimental evidence which does not support the view that enhanced species richness improves ecosystem function. *Oikos*, 247-258.
- Wardle, D. A. (1995). Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. *Advances in Ecological Research* **26**, 105-185.
- Wasaki, J., Yamamura, T., Shinano, T., and Osaki, M. (2003). Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant and Soil* **248**, 129-136.
- Watt, M., and Evans, J. R. (2003). Phosphorus acquisition from soil by white lupin (*Lupinus albus* L.) and soybean (*Glycine max* L.), species with contrasting root development. *Plant and soil* **248**, 271-283.
- Weigelt, A., and Jolliffe, P. (2003). Indices of plant competition. *Journal of ecology* **91**, 707-720.
- Wendling, M., Büchi, L., Amossé, C., Sinaj, S., Walter, A., and Charles, R. (2016). Influence of root and leaf traits on the uptake of nutrients in cover crops. *Plant and Soil* **409**, 419-434.

- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J. I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., and Le Roux, X. (2007). Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ Microbiol* **9**, 2211-9.
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.-F., Ferrer, A., and Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **34**, 1-20.
- Willey, R. (1979). Intercropping-its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. In "Field Crop Abstracts", Vol. 32, pp. 1-10.
- Willey, R. (1990). Resource use in intercropping systems. *Agricultural water management* **17**, 215-231.
- Wilson, J. B. (1988). Shoot competition and root competition. *J. appl. Ecol.* **25**, 279-296.
- Withers, P. J., van Dijk, K. C., Neset, T.-S. S., Nesme, T., Oenema, O., Rubæk, G. H., Schoumans, O. F., Smit, B., and Pellerin, S. (2015). Stewardship to tackle global phosphorus inefficiency: The case of Europe. *Ambio* **44**, 193-206.
- Wurst, S., and Ohgushi, T. (2015). Do plant- and soil-mediated legacy effects impact future biotic interactions? *Functional Ecology* **29**, 1373-1382.
- Xu, X., Ouyang, H., Richter, A., Wanek, W., Cao, G., and Kuzyakov, Y. (2011). Spatio-temporal variations determine plant-microbe competition for inorganic nitrogen in an alpine meadow. *Journal of Ecology* **99**, 563-571.
- Xu, Y., Qiu, W., Sun, J., Müller, C., and Lei, B. (2018). Effects of wheat/faba bean intercropping on soil nitrogen transformation processes. *Journal of Soils and Sediments* **19**, 1724-1734.
- Xue, W., Bezemer, T. M., and Berendse, F. (2018). Density-dependency and plant-soil feedback: former plant abundance influences competitive interactions between two grassland plant species through plant-soil feedbacks. *Plant Soil* **428**, 441-452.
- Yang, A., Liu, N., Tian, Q., Bai, W., Williams, M., Wang, Q., Li, L., and Zhang, W. H. (2015). Rhizosphere bacterial communities of dominant steppe plants shift in response to a gradient of simulated nitrogen deposition. *Front Microbiol* **6**, 789.
- Yu, L., Tang, Y., Wang, Z., Gou, Y., and Wang, J. (2019). Nitrogen-cycling genes and rhizosphere microbial community with reduced nitrogen application in maize/soybean strip intercropping. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **113**, 35-49.
- Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D., and Tilman, D. (2003). Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology* **84**, 2042-2050.
- Zhalnina, K., de Quadros, P. D., Camargo, F. A., and Triplett, E. W. (2012). Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil. *Front Microbiol* **3**, 210.
- Zhang, B., Deng, H., Wang, H.-l., Yin, R., Hallett, P. D., Griffiths, B. S., and Daniell, T. J. (2010a). Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 850-859.
- Zhang, N. N., Sun, Y. M., Li, L., Wang, E. T., Chen, W. X., and Yuan, H. L. (2010b). Effects of intercropping and Rhizobium inoculation on yield and rhizosphere bacterial community of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and fertility of soils* **46**, 625-639.
- Zhang, N. N., Sun, Y. M., Wang, E. T., Yang, J. S., Yuan, H. L., and Scow, K. M. (2015). Effects of intercropping and Rhizobial inoculation on the ammonia-oxidizing microorganisms in rhizospheres of maize and faba bean plants. *Applied Soil Ecology* **85**, 76-85.
- Zhang, W., Liang, C., Kao-Kniffin, J., He, H., Xie, H., and Zhang, X. (2017). Effects of drying and wetting cycles on the transformations of extraneous inorganic N to soil microbial residues. *Scientific reports* **7**, 9477.
- Zhang, X. Q., Huang, G. Q., Bian, X. M., and Zhao, Q. G. (2013). Effects of nitrogen fertilization and root interaction on the agronomic traits of intercropped maize, and the quantity of microorganisms and activity of enzymes in the rhizosphere. *Plant and Soil* **368**, 407-417.
- Zhao, J., Zeng, Z., He, X., Chen, H., and Wang, K. (2015). Effects of monoculture and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. *European Journal of Soil Biology* **68**, 61-68.

- Zhao, M., Jones, C. M., Meijer, J., Lundquist, P.-O., Fransson, P., Carlsson, G., and Hallin, S. (2017). Intercropping affects genetic potential for inorganic nitrogen cycling by root-associated microorganisms in *Medicago sativa* and *Dactylis glomerata*. *Applied Soil Ecology* **119**, 260-266.
- Zheng, W., Zhao, Z., Gong, Q., Zhai, B., and Li, Z. (2018). Effects of cover crop in an apple orchard on microbial community composition, networks, and potential genes involved with degradation of crop residues in soil. *Biology and fertility of soils* **54**, 743-759.
- Zhou, X., Yu, G., and Wu, F. (2011). Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. *European Journal of Soil Biology* **47**, 279-287.
- Zhu, S., and Morel, J. B. (2018). Molecular Mechanisms Underlying Microbial Disease Control in Intercropping. *Mol Plant Microbe Interact* **32**, 20-24.
- Zhu, S., Vivanco, J. M., and Manter, D. K. (2016). Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Applied Soil Ecology* **107**, 324-333.
- Zuber, H., Poignavent, G., Le Signor, C., Aimé, D., Vieren, E., Tadla, C., Lugan, R., Belghazi, M., Labas, V., and Santoni, A. L. (2013). Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **76**, 982-996.

RESUME

Dans un contexte de changement climatique et de nécessaire transition agro-écologique des agroécosystèmes, la diversité végétale est un levier important pour remplacer les intrants synthétiques par des régulations biologiques. Les associations céréales-légumineuses sont un des moyens d'augmenter la diversité végétale au sein des parcelles agricoles. Dans ce type de systèmes, les boucles de rétroaction entre le sol et les cultures associées sont méconnues, notamment par la complexité des processus pouvant se dérouler dans la zone de sol influencée par les racines, la rhizosphère, sous influence des ressources du sol affectant les interactions entre plantes. Dans ce contexte, la disponibilité de l'azote (N) pourrait modifier les interactions entre le sol et les cultures associées. **Cette thèse avait donc pour objectif (i) d'évaluer si l'effet rhizosphère d'une association céréale-légumineuse peut être modifié par un gradient de N, et (ii) si un effet différentiel d'héritage (*plant legacy*) des associations sur le fonctionnement microbien des sols est perceptible à court terme, en considérant la réponse des microorganismes du sol à un stress thermique.** Pour répondre à ces objectifs, le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le lupin blanc (*Lupinus albus*) ont été cultivés seuls ou en association en condition contrôlées avec 3 niveaux de N minéral à partir d'un sol méditerranéen. Nos résultats ont montré que notre gradient de N a eu un effet significatif sur quelques paramètres de la rhizosphère de l'association blé-lupin, comparativement aux cultures pures. Au cours d'un cycle de culture, l'association blé-lupin a été capable de maintenir voire d'améliorer le fonctionnement du sol, comparativement à l'une des deux cultures pures, même dans les conditions les plus fertilisées. Ce travail a mis en exergue que les processus rhizosphériques ayant lieu au sein de l'association blé-lupin sont à l'origine des effets observés, montrant l'importance du compartiment rhizosphère pour produire des effets d'héritage positifs (*positive plant legacy effects*), pouvant s'étendre au sol entier, une fois les plantes récoltées. Nous avons également montré que l'effet d'héritage produit à court terme par l'association peut également se traduire par une meilleure stabilité d'activités microbiennes liées aux cycles du carbone et de l'azote, face à un stress thermique. Enfin, les résultats de cette thèse suggèrent que les effets d'héritage positifs à court terme peuvent être un levier d'adaptation des agroécosystèmes méditerranéens au changement climatique sous conditions d'une gestion de la fertilisation adaptée.

Mots clé : diversité végétale, boucle de rétroaction plante-sol, effet d'héritage, nitrification, résistance, résilience, fertilisation

ABSTRACT

In a context of climate change and necessary agro-ecological transition, plant diversity can be an important lever to replace synthetic inputs by biological regulations. Cereal-legume intercrops are promising in this context, but in such agricultural systems, plant-soil feedbacks have to be better understood, and in particular the processes occurring in the rhizosphere, the narrow volume of soil under influence of root activities and resource availability. Hence, under cereal-legume intercrops, nitrogen (N) availability could mediate soil-plant interactions. Our goals were to (i) evaluate if rhizosphere effects of a cereal-legume intercrop are modified by a soil mineral N gradient and (ii) to identify a possible plant legacy of intercropping on soil microbial functioning in terms of resistance and resilience after a heat stress. To address these objectives, wheat (*Triticum aestivum*) and white lupin (*Lupinus albus*) were grown alone or intercropped along a soil mineral N gradient on a Mediterranean soil, under controlled conditions. The N gradient did alter some rhizosphere effects of the intercrops. Within one growth cycle, intercrop was able to maintain and in some extent to improve the soil functioning relative to sole crops. We demonstrated that rhizosphere processes are able to induce plant legacies after disappearance of the intercrops. Indeed, we also estimated that resistance and resilience of some microbial process related to carbon and nitrogen cycles were improved under intercrops after a heat stress. Finally, we suggest that positive plant legacies under intercrops may contribute to adaptation of Mediterranean agriculture to the climate change, but fertilization have to be better investigated for its effect on plant legacies.

Keywords: plant diversity, plant-soil feedback, plant legacy, nitrification, resistance, resilience, fertilization
