



**HAL**  
open science

# Stratégies de revégétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des Topsoils en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux dégradés

Laurent Bordez

## ► To cite this version:

Laurent Bordez. Stratégies de revégétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des Topsoils en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux dégradés. Ingénierie de l'environnement. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2015. Français. NNT : 2015NCAL0002 . tel-02942506

**HAL Id: tel-02942506**

**<https://unc.hal.science/tel-02942506>**

Submitted on 18 Sep 2020

**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.



Université de la Nouvelle-Calédonie  
École doctorale du Pacifique ED469  
Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement  
Doctorat ès Science en microbiologie des sols

Thèse présentée par

**Laurent BORDEZ**

Pour obtenir le grade de  
Docteur en Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie  
Spécialité : Ecologie végétale et microbiologie

---

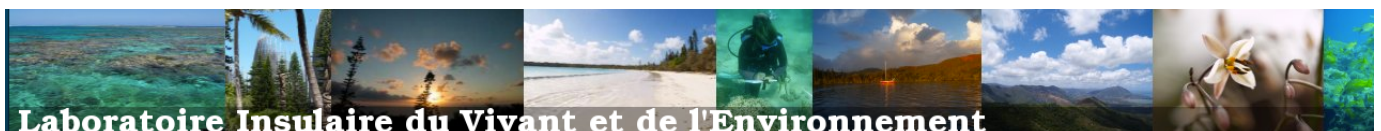
**Stratégies de revégétalisation  
des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie :  
étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation  
pour la restauration écologique des milieux dégradés.**

---

Sous la direction du Pr. AMIR Hamid, et de JOURAND Philippe

Thèse soutenue publiquement le 18 septembre 2015 devant le jury composé de :

P. Vandenkoornhuys	Professeur Université de Rennes 1	Rapporteur
T. Dutoit	Professeur, Université d'Avignon	Rapporteur
L. L'Huillier	Chercheur-Directeur de l'Institut Agronomique néo-calédonien	Examineur
Y. Cavaloc	Maitre de conférence, Université de la Nouvelle-Calédonie	Co-encadrant
P. Jourand	Ingénieur de recherche HDR, IRD Montpellier	Co-directeur de thèse
H. Amir	Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie	Directeur de thèse
A. Leveau	Chef du service environnement, Koniambo Nickel SAS	Invité



**Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement**



"La nature ne comporte aucun autre objet plus important et digne d'attention que le sol ! C'est bien le sol qui fait de la Terre un domicile accueillant pour l'homme; lui seul produit et nourrit l'armée innombrable d'êtres vivants, et c'est sur lui que repose au bout du compte l'ensemble de la Création ainsi que notre propre existence (...)

Une nation qui détruit son sol se détruit elle-même (traduit de l'allemand)"

**Friedrich A. Fallou**

"For in the final analysis, our most basic common link is that we all inhabit this small planet. We all breathe the same air. We all cherish our children's futures.

And we are all mortal."

**John F. Kennedy**



## REMERCIEMENTS

Awa, la bande. Ca y est, c'est fini. Un grand merci à tous ceux qui ont été là avant, et durant ce travail. Je réalise mon rêve de tout petit.

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe VANDENKOORNHUYSE Thierry DUTOIT qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci à Hamid AMIR, mon directeur de thèse, pour son optimisme à toute épreuve et sa confiance. Un grand merci à Philippe JOURAND, mon co-directeur de thèse. Incroyable relation longue distance. Mais loin des yeux, près du clavier. Un grand merci pour ta réactivité de tous les instants, tes relectures, et ta « pêche ». J'ai été ravi de pouvoir travailler avec toi. Merci à Marc DUCOUSSO, aussi pour tes relectures et ton soutien. Je n'oublierai pas la chasse aux champignons. Merci à Laurent L'HUILLIER et Bruno FOGLIANI, pour votre temps et vos conseils « graines ». Mais on est d'accord, Malaysia airlines, c'est quelque chose quand même. Merci aussi à Yvon CAVALOC, Fabian CARRICONDE et Emmanuel FRITSCH qui ont également participé à mon encadrement.

Un grand merci à Antoine LEVEAU, pour ton accueil, ta confiance. Merci de m'avoir aidé à découvrir le « grand monde » de l'industrie minière. Encore désolé pour le tonneau. Merci à la bande KNS. Merci à Liz HENRIOT, terrible Liz que j'adore. Merci de m'avoir accueilli dans la pépi. Promis, je passe te voir. Merci à la bande pépi, les filles (et les garçons), c'est quand qu'on va boire un verre ? Merci à Laurent VEDI. Merci pour ton aide de tous les instants sur le terrain, ton accueil et ton amitié. Y'a un gros morceau de toi, ici dedans. Merci Lolo. Merci à Mado BOULA, pour avoir répondu sans cesse a mes interminables demandes de formulaires et autres. Merci aux autres de la bande, Patrick, Endrick, Reena, Perrine, Julie. P'tite dédicace à David RAMEL. Merci pour les données. Faut pas que j'oublie le Parmesan.

Un grand merci à toute l'équipe du LIVE. Merci à Valérie MEDEVIELLE, Marry Poppins du labo. T'es une magicienne Val', si, si. Merci à Clarisse MAJOREL, coloc de bureau qui m'a supporté. Il est où Milou ? Et puis merci à vous deux les filles, petites fées de l'orthographe. Merci à Véro, parce que « OUAIS VEROOO ». Ah, tu m'as souvent mis la pêche. Et j'oubliai, Vive le Québec Libre ! Merci à Cyril ANTHEAUME, Ecolo Runner. On dit qu'on arrête un peu les déménagements quand même, hein ? Merci à Linda GUENTAS. Faut que je goutte ton thé. Ah, c'était une joie de venir au labo et partager ces trois années avec vous tous. Hé la bande, bientôt une frite « maison » à la maison ?

Je voudrai dire aussi un grand merci à toute l'équipe de l'IGS de Marseille, qui m'a accueilli pour me former aux outils d'analyses des données métagénomiques. Vaste champ de bataille dans lequel vous avez été des alliés précieux (mais en vrai, on sait que vous l'êtes encore). Un grand merci à Jean-Michel CLAVERIE qui a rendu possible cet accueil.

Merci à Sébastien SANTINI (en fait t'es un peu Néo, dans matrix), et Michael MOZAR, mais si M@c c'est bien ! Merci à Emilie VILLAR pour son aide sur l'analyse des données.

Un ENORME merci à Laurent WANTIEZ. Merci pour ton temps, pour ta patience et ta pédagogie. Merci de m'avoir montré que les stats, c'est Rock. C'est un plaisir d'avoir des certitudes. Voilà, j'aime la recherche, grâce à toi, je n'ai plus peur des analyses. Merci, merci, merci pour tout Laurent. Maintenant, je veux faire biostatisticien !

Un ENORME merci aussi à Simon GENSOUS, collègue et ami. Ahlala, qu'est ce qu'on a rigolé. T'as souvent veillé sur moi pendant la rédac, ça m'a fait du bien. T'inquiètes mec, maintenant que je vais être libre, ça va chouiller sec ! Et mais au fait, elle est réparée la clim ? Ah ben tiens quand on parle du Loup. Hé bé oui, Homme, un grand merci aussi à toi, Tom. Tu m'as bien fait rire. Et comme dirait Simon « Doc, ça va péter mon gars ». J'suis avec toi. Pensée aussi pour Mamatt, coloc American express de bureau, je vais pouvoir venir chouiller aussi, mon ami, enfin !

Aussi, un grand merci à tous les stagiaires qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Vous avez fait un boulot énorme et génialissime. Merci à Louis-Charles BRINON, à Charlotte LAROUMAGNE, Romain MEWISSEN et Joséphine GATTI.

Et puis un énorme merci à tous les autres (et aussi à ceux que je pourrai oublier, il faudrait m'excuser). La bande du snack 1881, Stéphane MENGANT, Laurent Millet, Anne HOULES, Pascal PAGAND, Fanny LUZIE, Charly ZONGO, Alexandre BOURLES, Alrick TALATINI, Audrey LAURENT, Sarah GIGANTE, Léocadie JAMET et la bande du LAMA, Lélé, Swané, Kelly, Julia, Véronique, Youth, Batins, Marcy, Marco, Masco, le grand Lolo, le commandant COUSTEAU (pour m'avoir fait découvrir le monde du silence - avant Hanna-Barbera dingue dong), Nicolas HULOT (pour m'avoir fait découvrir le joli monde).

Et il me reste Trois Grand merci.

Mon premier merci va à mes parents. Merci de m'avoir fait rêver la vie. De m'avoir appris la vie. De m'avoir montrer la vie, comme elle est jolie. Qu'est ce que je vous aime. Vous êtes les meilleurs parents du monde. Elle est jolie cette histoire, notre histoire. Avec des Bartavelles, et des « puces ». Vous êtes là, impossible de vous échapper.

Mon second merci va à ma sœur, Dorothy. Merci d'avoir toujours cru en moi. Depuis le début. Merci de m'avoir soutenu, d'avoir toujours été là, pour tout ce que tu as fais pour moi. Ensemble on a découvert la purée liquide (mais quelle découverte). Je t'aime ma sœur, je t'aime.

Enfin mon dernier merci (mon préféré). Merci **Klo**. Merci de me laisser être le gamin fou que je suis. Parce que moi, je me dis que des fois, comme ça, on irait accrocher des ailes au chat qui fume, des empanadas à nos lèvres routardes, des mandarines à chaque instant ! Et tout le reste aussi, parce que Klo, dis moi, « tu entends ce que je ne dis pas ? ». Klo, tu viens ? On va embusquer la vie, PROMIS !

A mes parents,

Et à toi, Klo.





### **AVERTISSEMENT**

Le contenu de cette thèse est bilingue. L'introduction générale, la synthèse bibliographique, les chapitres 2 et 3 ainsi que la conclusion générale sont rédigés en français. Le chapitre 1 présente deux articles scientifiques rédigés en anglais.

### **WARNING**

The content of this thesis is bilingual. The main introduction, the bibliographic synthesis, the chapters 2, 3 and 2 and the main conclusion are written in French. The chapter 1 presents two scientific articles written in English.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	1
<b>LE MODELE ULTRAMAIFIQUE</b>	4
<b>CONTEXTE NEO-CALEDONIEN</b>	5
<b>RESTAURATION DES SITES MINIERES NÉO-CALÉDONIENS</b>	6
<b>LE TOPSOIL COMME NOUVEL OUTIL DE RESTAURATION</b>	7
<b>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE</b>	8
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	11
<b>I/ GENERALITES SUR LE TOPSOIL</b>	13
<b>I.1/ ENTRE LE SOL ET LA VEGETATION : LE TOPSOIL</b>	13
<b>I.2/ PEDOGENESE ET FORMATION DES TOPSOILS</b>	15
<b>I.3/ UN MILIEU ORGANO-MINERAL COMPLEXE</b>	15
I.3.1/ COMPOSANTES MINERALES	15
I.3.2/ COMPOSANTES BIOLOGIQUES	17
I.3.2.1/ LA MATIERE ORGANIQUE	17
I.3.2.2/ LA BANQUE DE GRAINES	17
I.3.2.3/ L'EDAPHON	18
I.3.2.3.1/ <i>Les bactéries</i>	19
I.3.2.3.2/ <i>Les mycorhizes</i>	19
<b>II/ L'OUTIL TOPSOIL EN RESTAURATION ECOLOGIQUE MINIERE</b>	20
<b>II.1/ CONDITIONS DES TERRAINS MINIERES DEGRADEES</b>	20
<b>II.2/ RESTAURATION ECOLOGIQUE : PRINCIPE ET DEFINITION</b>	22
<b>II.3/ L'OUTIL TOPSOIL EN RESTAURATION ECOLOGIQUE</b>	23
II.3.1/ LA MATIERE ORGANIQUE : UN POTENTIEL DE FERTILITE	24
II.3.2/ LA BANQUE DE GRAINES : UN POTENTIEL GERMINATIF	24
II.3.3/ L'EDAPHON : UN POTENTIEL MICROBIEN	25
<b>II.4/ UNE TECHNIQUE EFFICIENTE</b>	26
<b>III/ CONNAISSANCES NECESSAIRES A L'UTILISATION DES TOPSOILS EN RESTAURATION ECOLOGIQUE</b>	27
<b>III.1/ LA TYPOLOGIE DES TOPSOILS</b>	27
III.1.1/ STRUCTURE ET POTENTIEL DE LA BANQUE DE GRAINES	29
III.1.1.1/ STRUCTURE SPATIALE	29
III.1.1.2/ STRUCTURE TEMPORELLE	29
III.1.1.3/ POTENTIEL DE RESTAURATION DE LA BANQUE DE GRAINES	30
III.1.2/ STRUCTURE DES POPULATIONS MICROBIENNES ET POTENTIEL MICROBIEN	30
<b>III.2/ LE STOCKAGE DU TOPSOIL : UN EFFET DEPRESSIF SUR LE POTENTIEL BIOLOGIQUE DE RESTAURATION DES TOPSOILS</b>	32
III.2.1/ DEGRADATION DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES	33

III.2.1.1/ DEGRADATION DU POTENTIEL GERMINATIF DE LA BANQUE DE GRAINES	33
III.2.1.2/ DEGRADATION DU POTENTIEL MICROBIEN	34
III.2.1.2.1/ Dégradation du potentiel bactérien	34
III.2.1.2.2/ Dégradation du potentiel mycorhizien	35
III.2.1.3/ DEGRADATION DU POTENTIEL DE FERTILITE CHIMIQUE	36
III.2.2/ SHELF LIFE PERIOD, LA CARACTERISATION DU TEMPS DE STOCKAGE D'UN TOPSOIL	36
<b>III.3/ REVITALISATION DES TOPSOILS</b>	37
III.3.1/ PRINCIPES ET METHODES DE REVITALISATION	38
III.3.1.1/ REPONSES APORTEES AUX CARENCES NUTRITIVES	39
III.3.1.2/ RESTAURATION DU CYCLE DES ELEMENTS NUTRITIFS	40
III.3.2/ BILAN DES TRAVAUX DE REVITALISATION/ VITALISATION REALISES	40
<b>IV/ ETAT DES CONNAISSANCES EN NOUVELLE-CALEDONIE SUR L'UTILISATION DE TOPSOILS EN RESTAURATION ECOLOGIQUE</b>	42
IV.1/ TYPOLOGIE DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS	43
IV.2/ LE STOCKAGE DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS	45
IV.3/ REVITALISATION DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS	46
<b>CHAPITRE 1 ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS</b>	49
I/ INTRODUCTION	51
<b>ARTICLE 1 : Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits</b>	53
Annexe article 1	89
<b>ARTICLE 2 : Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia</b>	101
Annexe article 2	134
<b>CONCLUSION</b>	141
<b>CHAPITRE 2 ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS PENDANT STOCKAGE</b>	143
I/ INTRODUCTION	145
II/ MATERIEL ET METHODE	147
II.1/ SITE D'ÉTUDE	147
II.2/ ORIGINE DES TOPSOILS ÉTUDIÉS	148
II.2.1/ CARACTERISTIQUES DU MAQUIS LIGNO-HERBACE A <i>HIBBERTIA ALTIGENA</i> , <i>EUCARPHA DEPLANCHEI</i> ET <i>COSTULARIA SP</i> (SOURCE INTERNE KNS).	148
II.2.2/ CARACTERISTIQUES DU MAQUIS PARAFORSTIER A <i>TRISTANIOPSIS CALLOBUXUS</i> (SOURCE INTERNE KNS).	149

<b>II.3/ MISE EN STOCKS DES TOSPOILS : LA VERSE</b>	150
<b>II.4/ ECHANTILLONNAGE</b>	151
<b>II.5/ SUIVI DU POTENTIEL GERMINATIF</b>	152
<b>II.6/ ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES</b>	153
<b>II.7/ MESURE DE LA DENSITE APPARENTE DU SOL OU MASSE VOLUMIQUE</b>	153
<b>II.8/ SUIVI DU POTENTIEL MICROBIEN</b>	154
II.8.1/ SUIVI QUANTITATIF	154
II.8.1.1/ DENOMBREMENT DE LA FLORE BACTERIENNE AEROBIE	154
II.8.1.2/ DENOMBREMENT DU POTENTIEL ENDOMYCORHIZOGENE (PEM)	155
II.8.1.3/ EVALUATION DE L'ACTIVITE MINERALISATRICE DU CARBONE	156
II.8.2/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNE	156
II.8.2.1/ EXTRACTION ET AMPLIFICATION D'ADN	156
II.8.2.2/ TRAITEMENT DES DONNEES METAGENETIQUES	157
<b>II.9/ ANALYSES STATISTIQUES</b>	158
<b>III/ RESULTATS</b>	160
<b>III.1/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR LE POTENTIEL MICROBIEN</b>	160
III.1.1/ ASPECTS QUANTITATIFS	160
III.1.1.1/ EVOLUTION DES DENSITES DES BACTERIES AEROBIES	160
III.1.1.2/ EVOLUTION DU POTENTIEL DE MINERALISATION DU CARBONE	162
III.1.1.3/ EVOLUTION DU POTENTIEL ENDOMYCORHIZOGENE	164
III.1.2/ ASPECTS QUALITATIFS	166
III.1.2.1/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES APRES 12 MOIS DE STOCKAGE	166
III.1.2.2/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES APRES 12 MOIS DE STOCKAGE	168
<b>III.2/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR LEURS CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES</b>	171
III.2.1/ EVOLUTION DE LA MASSE VOLUMIQUE ET DES TAUX DE SATURATION DE LA POROSITE EN EAU	171
III.2.2/ EVOLUTION DES VALEURS DE pH	173
III.2.3/ EVOLUTION DES STOCKS DE CARBONE ORGANIQUE ET D'AZOTE TOTAL ET DU RAPPORT C/N	175
III.2.3.1/ EVOLUTION DES STOCKS DE C ET DE N	175
III.2.3.2/ EVOLUTION DU RAPPORT C/N	177
III.2.4/ EVOLUTION DE LA CEC ET DES BASES ECHANGEABLES	178
III.2.5/ EVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS METALLIQUES	182
<b>III.3/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR L'EVOLUTION DE L'ABONDANCE, DE LA RICHESSE SPECIFIQUE ET DE LA COMPOSITION DE LA BANQUE DE GRAINES</b>	186
III.3.1/ EVOLUTION DES DENSITES DE GERMINATION DES GRAINES	186

III.3.2/ EVOLUTION DE LA RICHESSE SPECIFIQUE DE LA BANQUE DE GRAINES .....	188
III.3.3/ EVOLUTION DE LA COMPOSITION DE LA BANQUE DE GRAINES .....	189
<b>IV/ DISCUSSION .....</b>	<b>191</b>
<b>IV.1/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL MICROBIEN .....</b>	<b>191</b>
<b>IV.2/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL DE FERTILITE PHYSICO-CHEMIQUE .....</b>	<b>194</b>
<b>IV.3/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL GERMINATIF DE LA BANQUE DE GRAINES .....</b>	<b>196</b>
<b>IV.4/ INFLUENCE DU COUVERT VEGETAL ASSOCIE AU TOPSOIL SUR L'EVOLUTION DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>198</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE CHAPITRE 2 .....</b>	<b>201</b>
<b>CHAPITRE 3 ESSAI DE REVITALISATION D'UN TOPSOIL DEGRADE APRES STOCKAGE .....</b>	<b>209</b>
<b>I/ INTRODUCTION .....</b>	<b>211</b>
<b>II/ MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>213</b>
<b>II.1/ CARACTERISTIQUES DU TOPSOIL A REVITALISER .....</b>	<b>213</b>
<b>II.2/ DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....</b>	<b>214</b>
<b>II.3/ DETAIL DES MODALITES TESTEES .....</b>	<b>215</b>
<b>II.4/ ECHANTILLONNAGE .....</b>	<b>217</b>
<b>II.5/ SUIVI DES INOCULATIONS .....</b>	<b>218</b>
II.5.1/ EVALUATION DE L'ENDOMYCORHIZATION .....	218
II.5.2/ EVALUATION DE LA PRESENCE DE NODULES BACTERIEN A <i>FRANKIA</i> .....	219
<b>II.6/ SUIVI DE LA REPONSE VEGETALE .....</b>	<b>219</b>
II.6.1/ SUIVI GERMINATIF .....	219
II.6.2/ EVALUATION DES TAUX DE MORTALITE .....	219
II.6.3/ EVALUATION DES BIOMASSES SECHES .....	219
II.6.4/ MESURE DES TENEURS EN MINERAUX ET METAUX LOURDS DES VEGETAUX .....	220
<b>II.7/ MESURES DES PARAMETRES EDAPHIQUES .....</b>	<b>220</b>
II.7.1/ MESURE DES ACTIVITES PHOSPHATASE .....	220
II.7.2/ ANALYSE PHYSICO-CHEMIQUES DES SOLS .....	221
<b>II.8/ ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>221</b>
<b>III/ RESULTATS .....</b>	<b>223</b>
<b>III.1/ SUIVI DES INOCULATIONS .....</b>	<b>223</b>
III.1.1/ RAPPORT PONDERAL DES SOUCHES BACTERIENNES DE <i>FRANKIA</i> SUR <i>GYMNOSTOMA POISSONIANUM</i> .....	223
III.1.2/ TAUX D'ENDOMYCORHIZATION .....	224

<b>III.2/ MESURE DE CROISSANCE</b> .....	226
III.2.1/ SUIVI DES GERMINATIONS DE LA BANQUE DE GRAINE .....	226
III.2.2/ TAUX DE MORTALITE DES PLANTS .....	226
III.2.3/ MESURE DE LA BIOMASSE SECHE DES PLANTS .....	227
III.2.4/ MESURE DES TENEURS EN ELEMENTS DES PARTIES RACINAIRES ET AERIENNES .....	229
III.2.4.1/ ELEMENTS NUTRITIFS .....	229
III.2.4.2/ METAUX LOURDS .....	229
<b>III.3/ CARACTERISTIQUES EDAPHIQUES</b> .....	230
III.3.1/ MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE DES SOLS .....	230
III.3.2/ MESURE DU pH .....	232
III.3.3/ MESURE DU CARBONE ET DES ELEMENTS MINERAUX MAJEURS .. .....	233
III.3.3/ MESURE DE LA CAPACITE D'ECHANGE CATIONIQUE ET DES BASES ECHANGEABLES .....	234
III.3.3/ METAUX LOURDS .....	235
<b>IV/ DISCUSSION</b> .....	237
<b>IV.1/ EFFET DES MODALITES TESTEES SUR LES CARACTERISTIQUES DU SOL</b> ..	237
<b>IV.2/ EFFET DE L'INOCULATION</b> .....	238
<b>CONCLUSION</b> .....	240
<b>ANNEXE CHAPITRE 3</b> .....	241
<b>CONCLUSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES</b> .....	255
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	263





## LISTE DES FIGURES

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>FIGURE 1.</b> Profil pédologique général d'un sol et localisation du topsoil (d'après Gobat et al. 2010).	14
<b>FIGURE 2.</b> La complexité externe et interne du topsoil. Interprétation à partir de Gobat et al. (2010).	14
<b>FIGURE 3.</b> Principe de la pédogénèse de façon schématique la formation d'un sol et donc d'un topsoil, de la roche brute à un système équilibré, se subdivise en trois phases (Soltner, 2005).	16
<b>FIGURE 4.</b> Illustrations des principaux partenaires symbiotiques des végétaux.	20
<b>FIGURE 5.</b> A) Principes de l'exploitation minière à ciel ouvert : exemple néo-calédonien (sln.nc, 2014), B) Modèle conceptuel de la dégradation et de la restauration d'un écosystème (de L'Huillier et al. 2010, adapté de Hobbs & Harris, 2001).	22
<b>FIGURE 6.</b> Principe d'utilisation de l'outil topsoil en restauration écologique (L.Bordez)	23
<b>FIGURE 7.</b> Principes des indices de diversité Alpha et Bêta.	28
<b>FIGURE 8.</b> Schématisation du problème potentiel de la non ségrégation des topsoils (L. Bordez d'après Deput, 1984).	28
<b>FIGURE 9.</b> Schéma des phénomènes physico-chimiques et de zonations se mettant en place pendant stockage du topsoil (Ghose, 2001).	33

### CHAPITRE 1 – ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS

#### – Article 1 - Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits

<b>Figure. 1</b> (A) Location of New Caledonia in the South West Pacific. (B) Map of the ultramafic outcrops of New Caledonia (in grey). (C) Shaded relief map of the Koniambo Massif with study site location.	60
<b>Figure. 2</b> Two-dimensional NMDS ordination of (a) floristic structure and (b) edaphic characteristics per habitat at Koniambo massif, in New Caledonia.	66
<b>Figure. 3</b> Bacterial community characteristics for the different habitats. (a) Two-dimensional NMDS ordination of bacterial community structure. (b) Relative abundance of bacterial phyla identified in all samples.	68
<b>Figure. 4</b> distance based redundancy analysis from distance based linear models between bacterial communities and (a) the floristic structure and (b) the edaphic characteristics.	69
<b>Figure 5.</b> Variance partitioning distance-based linear model (DISTLM) shows the relative effects of the two significant variable sets on the composition of bacterial taxa.	69
<b>Figure. 6</b> Fungal community characteristics for the different habitat. (a) Two-dimensional NMDS ordination of fungal community structure. (b) Relative abundance of fungal phyla identified in all samples.	71
<b>Figure. 7</b> distance based redundancy analysis from distance based linear models between fungal community and (a) the floristic structure and (b) the edaphic characteristics. Only explanatory significant variables are shown.	71
<b>Figure 8.</b> Variance partitioning distance-based linear model (DISTLM) shows the relative effects of the two significant variable sets on the composition of fungal taxa.	72

#### – Article 2 - Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia

<b>Fig. 1</b> (A) Location of New Caledonia in the South West Pacific. (B) Map of the ultramafic outcrops of New Caledonia (in grey). (C) Shaded relief map of the Koniambo Massif with study site location.	107
<b>Figure 2.</b> Vegetal cover characteristics for the different habitats. (A) Two-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of abundance of species per habitat. (B) Mean of species richness ( $\pm$ SE). (C) Frequency distributions of growth forms among species based on the species abundance.	112

<b>Figure 3.</b> Seed bank characteristics for the different habitats. (A) Two-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of abundance of species per habitat. (B) Mean of species richness ( $\pm$ SE). (C) Frequency distributions of growth forms among species based on the species abundance. ....	115
<b>Figure 4.</b> Mean of seedling emergences ( $\pm$ SE). ....	116
<b>Figure 5.</b> Mean density ( $\pm$ SE) and mean species richness ( $\pm$ SE) of seedlings in the soil seed bank. ....	118

## CHAPITRE 2 - ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS PENDANT STOCKAGE

<b>Figure 1.</b> (A) Localisation de la Nouvelle-Calédonie, dans l'océan Pacifique Sud-Ouest (B) Localisation du massif du Koniambo en Nouvelle-Calédonie (C) carte en relief du massif par nuance de gris. (Bonvallot et al. 2013 ; source interne KNS) .....	147
<b>Figure 2.</b> Moyenne des précipitations et moyennes des températures mensuelles de la zone d'étude pendant la période d'essai (source service hydrologie KNS). ....	147
<b>Figure 3.</b> (A) Représentation schématique d'une coupe transversale de verse de stockage de stériles miniers (L'Huillier et al. 2010) (B) Illustration d'une verse à stériles miniers en Nouvelle-Calédonie (Mine de Kopéto, SLN. Tirée de L'Huillier et al. 2010). Verse expérimentale à topsoil de notre étude (C) de maquis ligno-herbacé et (D) de maquis paraforestier (photo L.Bordez). ....	150
<b>Figure 4.</b> (A) ouverture des verses expérimentales de l'étude et (B) points d'échantillonnages (photo L.Bordez). ....	151
<b>Figure 5.</b> Mise en terrine sous serre KNS avec arrosage automatique et à température non contrôlée (L.Bordez). ....	152
<b>Figure 6.</b> Schéma de l'extraction de spores (source : Leclerc, 2012). ....	155
<b>Figure 7.</b> Evolution de la densité des bactéries hétérotrophes aérobies cultivables dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) , du temps et de la profondeur de stockage. ....	160
<b>Figure 8.</b> Evolution du potentiel de minéralisation du carbone dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. ....	162
<b>Figure 9.</b> Evolution des densités de spores AMF viables dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. ....	164
<b>Figure 10.</b> Moyenne du nombre d'OTUs bactériens ( $\pm$ se) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) et du temps et de la profondeur de stockage. ....	166
<b>Figure 11.</b> Analyse non métrique multidimensionnelle des structures des communautés bactériennes des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). ....	167
<b>Figure 12.</b> Abondance relative des ordres bactériens dans les topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). ....	168
<b>Figure 13.</b> Moyenne du nombre d'OTUs fongiques ( $\pm$ se) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. ....	169
<b>Figure 14.</b> Analyse non métrique multidimensionnelle des structures des communautés fongiques des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). ....	170
<b>Figure 15.</b> Abondance relative des classes fongiques des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). ....	170
<b>Figure 16.</b> (a). Evolution des masses volumiques ( $\pm$ se) et, (b). évolution des taux de saturation de la porosité (en %) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), temps et de la profondeur de stockage. ....	171
<b>Figure 17.</b> Evolution des pH eau ( $\pm$ se) des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) , du temps et de la profondeur de stockage. ....	173
<b>Figure 18.</b> Evolution (a) du Carbone organique ( $\pm$ se), (b) de l'Azote total ( $\pm$ se) des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) et du temps et de la profondeur de stockage. ....	175
<b>Figure 19.</b> Evolution du rapport C/N des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) ,du temps et de la profondeur de stockage. ....	177

<b>Figure 20.</b> Evolution des densités de germinations de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. ....	186
<b>Figure 21.</b> Evolution des richesses spécifiques de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. ....	188
<b>Figure 22.</b> Composition de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. a topsoil de maquis ligno-herbacé, et b topsoil de maquis paraforestier. ....	190

### CHAPITRE 3 – ESSAI DE REVITALISATION D’UN TOPSOIL DEGRADE APRES STOCKAGE

<b>Figure 1.</b> a) Schéma du dispositif expérimental en bloc aléatoire complet avec les répétitions, b) photo du dispositif appliqué au champ (source : données KNS internes ; L.Bordez). ....	214
<b>Figure 2.</b> Schéma des dispositifs de plantation semi-inoculée et non inoculée. ....	216
<b>Figure 3.</b> Système de notation utilisé pour évaluer l’importance de l’infection mycorhizienne (Trouvelot et al. 1986). ....	219
<b>FIGURE 4.</b> Abondance relative moyenne ( $\pm$ se) des nodules de <i>Frankia</i> chez <i>Gymnostoma poissonianum</i> (a) par modalités, (b) par espèces et par inoculation selon les modalités. ....	223
<b>FIGURE 5.</b> Fréquence moyenne ( $\pm$ se) de mycorhization globale (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. ....	225
<b>FIGURE 6.</b> Intensité moyenne ( $\pm$ se) de mycorhization globale (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. ....	225
<b>FIGURE 7.</b> Taux de mortalité moyen ( $\pm$ se) (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. ....	228
<b>FIGURE 8.</b> Biomasse sèche moyenne ( $\pm$ se) (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. ....	228
<b>FIGURE 9.</b> Teneur moyenne en éléments nutritifs, et métaux lourds des parties aériennes et racinaires des plantes, par espèce et selon qu’elle est inoculée ou non. ....	230
<b>FIGURE 10.</b> a) Activité phosphatase acide moyenne ( $\pm$ se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation (en $\mu$ g de pNPP libéré par gramme de sol sec et par heure), et b) Activité phosphatase alcaline moyenne ( $\pm$ se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation (en $\mu$ g de pNPP libéré par gramme de sol sec et par heure). ....	231
<b>FIGURE 11.</b> pH H <sub>2</sub> O moyen ( $\pm$ se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation. ....	233
<b>FIGURE 12.</b> Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en carbone organique (Corg), azote total (Ntot), phosphore total (Ptot) et disponible (Pols), et du rapport C/N du topsoil par modalité. ....	234
<b>FIGURE 13.</b> Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en bases échangeables et capacité d’échange cationique par modalité. ....	235
<b>FIGURE 14.</b> Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en métaux lourds par modalité. ....	236

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1 – ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS

- **Article 1 - Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits**

**Table 1.** Descriptions of the habitat types investigated ..... 60

- **Article 2 - Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia**

**Table 1.** Descriptions of the habitat types investigated ..... 108

**Table 2.** Results of the PERMANOVAs performed to evaluate the effects of habitat and season on seedling density, species richness and structure in the seed banks of the study sites. .... 117

### CHAPITRE 2 - ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS PENDANT STOCKAGE

**Tableau 1.** Evolution de la CEC, des bases échangeables, et du rapport Ca/Mg des topsoils, du maquis ligno-herbacé en fonction du temps et de la profondeur de stockage. .... 180

**Tableau 2.** Evolution de la CEC, des bases échangeables, et du rapport Ca/Mg des topsoils, du maquis parafortier en fonction du temps et de la profondeur de stockage. .... 181

**Tableau 3.** Evolution des éléments métalliques extractibles au DTPA du topsoil maquis ligno-herbacé en fonction du temps et de la profondeur de stockage. .... 184

**Tableau 4.** Evolution des éléments métalliques extractibles au DTPA du topsoil maquis parafortier en fonction du temps et de la profondeur de stockage. .... 185

### CHAPITRE 3 – ESSAI DE REVITALISATION D'UN TOPSOIL DEGRADE APRES STOCKAGE

**Tableau 1.** Comparaison des caractéristiques physico-chimiques du topsoil de maquis ligno-herbacé, stocké pendant 2 ans, par rapport au topsoil en milieu naturel. .... 213

**Tableau 2.** Cycle du minéralisateur Multiwave utilisé pour la minéralisation des échantillons ..... 220

## ABBREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>Al</b>	Aluminium
<b>AMF</b>	Champignons mycorhiziens à arbuscules
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CEC</b>	Capacité d'Echange Cationique
<b>Co</b>	Coblat
<b>Corg</b>	Carbone organique
<b>Cr</b>	Chrome
<b>dbRDA</b>	Distance Based Redundancy Analysis
<b>DISTLM</b>	Distance-based Linear Models
<b>DTPA</b>	Acide Diéthylène Triamine Penta-acétique
<b>Fe</b>	Fer
<b>IAC</b>	Institut Agronomique néo-Calédonien
<b>IRD</b>	Institut de Recherche pour le Développement
<b>K</b>	Potassium
<b>KNS</b>	Koniambo Nickel SAS
<b>LAMA</b>	Laboratoire des Moyens Analytiques de Nouméa
<b>LIVE</b>	Laboratoire Insulaire du Vivant et l'Environnement
<b>Mg</b>	Magnésium
<b>MinC</b>	Potentiel de Minéralisation du Carbone
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>N</b>	Azote
<b>Na</b>	Sodium
<b>NDMS</b>	Nonmetric Multidimensional Scaling
<b>Ni</b>	Nickel
<b>Ntot</b>	Azote total
<b>P</b>	Phosphore
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PEM</b>	Potentiel EndoMycorhizogène
<b>PERMANOVA</b>	Permutational ANOVA/MANOVA
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène
<b>SAA</b>	Spectrophotométrie d'Absorption Atomique
<b>SERA</b>	Society for Ecological Restoration Australasia
<b>Si</b>	Silice
<b>TAE</b>	Tris, Acétate, EDTA
<b>TE</b>	Teneur en eau du sol
<b>UNC</b>	Université de la Nouvelle-Calédonie
<b>UV</b>	UltraViolet
<b>WFPS</b>	Water Filled Pore Space



# **INTRODUCTION GENERALE**





La consommation de ressources minérales ne cesse d'augmenter avec le développement de la science, de la technologie, le développement économique, l'expansion industrielle, l'accélération de l'urbanisation et de l'accroissement démographique. La croissance de la société et de la civilisation s'appuie fortement sur l'exploitation minière pour trouver les ressources indispensables à leur confort et leurs besoins (Rio Tinto, 2001). A l'heure actuelle, la majorité des projets miniers mettent en œuvre des méthodes d'exploitation à ciel ouvert, moins coûteuses que les autres méthodes pour extraire matériaux et minerais (ELAW, 2010). Par rapport aux autres méthodes, l'exploitation minière à ciel ouvert est parmi les plus destructives d'un point de vue environnemental. Elle nécessite le décapage du couvert végétal et des horizons superficiels des sols à trop faibles teneurs, considérés comme « stériles miniers », qui recouvrent les minerais exploitables (ELAW, 2010). Outre l'impact esthétique négatif résultant de l'accumulation de la destruction des sols et du couvert végétal, ce type d'exploitation génère d'importants problèmes environnementaux et sociétaux (Bradshaw, 1997 ; Tordoff et al. 2000 ; UICN France, 2012). A la destruction des écosystèmes miniers est associée la disparition des services écosystémiques qui leurs étaient liés et par conséquent la dégradation de la qualité des autres compartiments de l'environnement et finalement du bien être humain (IIED, 2002). De plus, par rapport aux sols naturels, les conditions des sols des terrains miniers dégradés montrent une rupture des fonctions écologiques à travers le franchissement de seuils physiques, chimiques et biologiques (Hobbs & Harris, 2001). Il en résulte une perte de l'aptitude des terrains miniers dégradés à soutenir l'installation et le développement d'un couvert végétal (Sheoran et al. 2010), mais également une perte, ou un fort ralentissement dans les meilleurs cas, de la résilience des écosystèmes miniers (Singh & Singh, 2006). Les problèmes environnementaux et sociétaux créés par l'industrie minière s'inscrivent alors dans le long terme (ELAW, 2010).

A l'échelle mondiale, l'accentuation des effets destructeurs de l'activité humaine sur les milieux naturels a fait naître une prise de conscience internationale autour des effets néfastes de la perte de la biodiversité sur la production de services écosystémiques essentiels au bien être humain (Rio, 1992 ; Millenium Ecosystem Assesment, 2005). Il est aujourd'hui largement reconnu que ce sont les caractéristiques fonctionnelles de la biodiversité qui sont impliquées dans la mise à disposition des biens et services écosystémiques (MEDDE, 2010 ; UICN France, 2012), mais également dans le maintien de ceux-ci face à une perturbation, à travers la notion de redondance fonctionnelle (Lavelle, 2002 ; Blondel, 2003). Cela s'est traduit par une reconnaissance unanime de la nécessité de restaurer l'intégrité écologique des milieux dégradés, avec pour objectif la restauration des écosystèmes dans leur environnement et des services écosystémiques associés (Nagoya, 2010).

## LE MODELE ULTRAMAIFIQUE

Les substrats ultramafiques (syn. serpentiniques) dérivent de roches sous-marines déposées sur la croûte continentale lors de phénomènes d'obduction (**annexe 1**) (Chevillotte, 2005). Ces roches sont caractérisées par de très faibles teneurs en silice (moins de 45% en masse – caractère basique), et de fortes teneurs en minéraux riches en magnésium et en fer (plus de 90% de leurs constituants - caractère mafique). Les sols ultramafiques qui en dérivent représentent alors des habitats exceptionnels de par leurs propriétés physico-chimiques particulières, caractérisant le « syndrome ultramafique » (L'Huillier et al. 2010). Ces sols présentent une pauvreté sévère en éléments nutritifs essentiels aux végétaux (N, P, K) et en matière organique, de faible capacité d'échange cationique, et de faible disponibilité en eau, mais également un ratio Ca/Mg faible, ainsi qu'un taux élevé en métaux lourds habituellement rangés dans les éléments-traces et potentiellement phytotoxiques (majoritairement Cr, Co, et Ni) (Brady et al. 2005 ; Kazakou et al. 2008)<sup>1</sup>. Ces contraintes édaphiques inhabituelles ont favorisé une importante diversification du vivant, résultant de processus de spéciation par radiation adaptative, d'organismes pré-adaptés aux contraintes de ces substrats (revue dans Harrison & Rajakaruna, 2011). Les écosystèmes ultramafiques sont aujourd'hui célèbres dans le monde pour leur biodiversité adaptée à la tolérance aux métaux, leur haut niveau d'endémisme et leurs écotypes spécifiques, à la fois pour la flore (Whiting et al. 2004)<sup>2</sup>, la faune (Chazeau, 1993), et les micro-organismes (Wettberg & Wright, 2011); et sont depuis des années un modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes d'adaptation, de différenciation écotypique, de spéciation et de sélection naturelle (ICSE, 2014).

D'autre part, les écosystèmes ultramafiques représentent des gîtes métallifères d'importance mondiale, indispensables aux besoins de notre société (Harrison & Rajakaruna, 2011). En effet, en raison de leur origine géologique et de leur composition chimique unique, les substrats ultramafiques contiennent de nombreux minéraux (jadéite, magnésite, amiante...) et minerais métalliques ayant de fortes valeurs commerciales (Ni, Fe, Al, Cr, Co, Mn). Pour cette raison, les milieux ultramafiques connaissent des niveaux élevés de perturbations dues à l'industrie minière et présentent de forts taux d'extinction des espèces. Représentant moins de 1% de la surface des terres émergées, les écotypes associés aux milieux ultramafiques font partie des principaux « hotspot » mondiaux métalphytes (Whiting et al. 2004). Ainsi, les écosystèmes ultramafiques sont aujourd'hui

<sup>1</sup> En comparaison, les roches granitiques, qui forment l'essentiel de la croûte terrestre, sont riches en silice, calcium, potassium et phosphore. La chimie des sols qui en dérive, est presque par définition, favorable à la croissance végétale (Harrison & Rajakaruna, 2011).

<sup>2</sup> Un exemple célèbre est celui des plantes hyper-accumulatrices de nickel capable d'absorber cet élément à des taux plus de 1000 fois supérieures à celui des plantes normales (Whiting et al., 2004).

également devenus des modèles d'études pour la compréhension des mécanismes physiques, chimiques et biologiques qui interagissent lors de la restauration écologique de ces milieux (Harrison & Rajakaruna, 2011).

## **CONTEXTE NEO-CALEDONIEN**

En Nouvelle-Calédonie, archipel de l'océan Pacifique Sud-Ouest, la présence des milieux ultramafiques revêt localement une importance particulière. Les objectifs et les contraintes de la gestion des terrains miniers ultramafiques se posent en termes différents de ceux qui prévalent dans d'autres régions minières, notamment en raison de leur biodiversité singulière (i.e. 2150 espèces végétales pour un taux d'endémisme de 82%), et de l'étendue des zones ultramafiques par rapport à la superficie du pays (1/3 de la surface de l'île principale) (Jaffré & L'Huillier, 2010). La flore des substrats ultramafiques néo-calédoniens est plus riche et plus originale que la flore de l'ensemble des autres substrats géologiques du territoire (2120 espèces, 61% d'endémisme, forêts sèches, forêts humides et mangrove confondues) (Jaffré et al. 2001). Elle représente 35% de la flore autochtone de l'archipel, 45,5% de sa flore endémique (Jaffré & L'Huillier, 2010). Elle participe ainsi pour une part majeure à la richesse et à l'originalité de la flore du pays, reconnue comme un des principaux « hotspot » mondiaux des flores métallophytes (Whiting et al. 2004). Parallèlement, les substrats ultramafiques néo-calédoniens contiennent, selon les estimations, près d'un quart des ressources mondiales connues en nickel (source INSG, 2014). Ce minerai, exploité depuis 1873, représente aujourd'hui un moteur essentiel du tissu industriel du pays (95% des exportations, 10% du PIB, 11,8% au secteur de l'emploi) (ISEE, 2010), produisant d'importants effets primaires et induits sur l'économie, il a une influence déterminante sur la démographie, l'aménagement du territoire, les modes de vie et les comportements.

Avec une demande en nickel en constante augmentation (4% par an entre 2000 et 2010) (L'Huillier & Jaffré, 2010), et l'arrivée de nouveaux opérateurs miniers, la Nouvelle-Calédonie fait face à une augmentation continue des pressions exercées par l'industrie minière sur ses écosystèmes. Les conséquences majeures des exploitations résultent en des perturbations des régimes hydriques favorisant les phénomènes d'érosion, d'engravements des cours d'eau, des creeks et des cours inférieurs des rivières, générant un risque de pollution du lagon néo-calédonien, inscrit au patrimoine mondial de l'UNESCO depuis 2008 (UNESCO, 2008). A cela s'ajoute un impact visuel fort, ouvrant de larges cicatrices sur les versants montagneux, mais aussi une perte de la biodiversité globale, ainsi qu'un dépérissement à plus long terme des populations et même des espèces dont les

effectifs deviendraient insuffisants pour assurer le maintien de la diversité génétique en leur sein (Oostermeijer et al. 2003 ; Honnay & Jacquemyn, 2006). Les risques de pertes de biodiversité sont d'autant plus prononcés qu'il s'agit déjà d'écosystèmes en situation critique en raison de leur faible étendue et des phénomènes de micro-endémismes présents sur le territoire (Wulff, 2012), de leur fragmentation ou des risques d'incendies (Jaffré et al. 2010).

Ainsi, la Nouvelle-Calédonie est confrontée au challenge paradoxal de devoir gérer à la fois une ressource minière considérable, et une biodiversité reconnue comme une des plus originales et des plus précieuses de la planète (Harrisson et Rajakaruna, 2011). Il est alors essentiel de développer des moyens de restauration des terrains miniers dégradés, afin que la Nouvelle-Calédonie n'hypothèque pas ses possibilités de développement à long terme, lorsque les « ressources du vivant » devront pallier à l'épuisement de la ressource minière (L'Huillier et al. 2010).

## **RESTAURATION DES SITES MINIERS NÉO-CALÉDONIENS**

En Nouvelle-Calédonie, des travaux de recherche pour la revégétalisation des terrains miniers dégradés sur sols ultramafiques sont conduits depuis 1970, par les équipes scientifiques du territoire en relation avec les sociétés minières et les Provinces (L'Huillier et al. 2010). Après quelques essais avec des espèces végétales compétitives et à croissance relativement rapide, mais peu adaptées aux substrats ultramafiques, les travaux ont été focalisés essentiellement sur le choix d'espèces indigènes pionnières, pour la revégétalisation, et la maîtrise de leur culture (Jaffré et Pelletier, 1992). Les espèces utilisées sont dites cicatricielles des maquis miniers et sont censées permettre d'amorcer une succession végétale secondaire. À l'heure actuelle, les travaux de revégétalisation utilisant ces espèces sont principalement réalisés par plantation et ensemencement (L'Huillier et al. 2010). La plantation est la première méthode utilisée à partir des années 1970, et la seule employée pendant plus de 20 ans. Cette méthode est largement utilisée et est effectuée principalement sur les talus, les décharges ou encore sur les anciens sites d'exploitation. L'ensemencement consiste à déposer les graines directement sur le terrain à restaurer. Cette méthode est mise en œuvre manuellement ou mécaniquement. L'ensemencement, notamment l'ensemencement hydraulique (hydroseeding), s'est développé à partir des années 1990 et représente dorénavant la technique la plus utilisée en termes de surfaces traitées (L'Huillier et al. 2010). Celle-ci permet contrairement aux plantations, de traiter rapidement des surfaces importantes y compris les fortes pentes. Ce procédé consiste à projeter sur les surfaces à restaurer, à l'aide d'un hydrosemoir (pompe montée sur un camion), un mélange de mulch, colle végétale, nutriments, engrais minéraux et organiques,

et semences de diverses espèces.

Néanmoins, un bilan des essais de restauration menés depuis 1971 met en évidence la faiblesse de certains aspects des itinéraires techniques utilisés jusqu'à aujourd'hui (Amir et al. 2014 ; L'Huillier et al. 2014). Les coûts de préparation des terrains à restaurer, amendement et fertilisation, sont élevés. A cela s'ajoutent les coûts et difficultés d'approvisionnement en plants ou en semences (Fogliani, 2010), ces coûts pouvant représenter jusqu'à 40% du coût technique total (Fogliani, 2010). De plus, les résultats observés sont peu concluants en terme de densité et de diversité spécifique. Les itinéraires techniques de restauration néo-calédoniens ne maîtrisent qu'un faible nombre d'espèces végétales identifiées sur maquis miniers (Entre 10 et 20%, VALE-NC, Mac Coy comm.pers.; Koniambo Nickel SAS, données internes). De nombreux auteurs soulignent également la faiblesse de ces outils dans l'absence de prise en compte des biotes du sol comme un des principaux biais de ces méthodes, pourtant démontré comme essentiel au succès des travaux de restauration (De Deyn et al. 2003 ; Frouz et al. 2006 ; 2008).

Ainsi, si des progrès ont été réalisés, les résultats des travaux de restauration en Nouvelle-Calédonie demeurent encore fluctuant et des recherches sont poursuivies. Le nouveau code minier (2009) qui a introduit une réglementation plus contraignante de la revégétalisation des sites miniers (Amir et al. 2013). Depuis quelques années, des avancées significatives ont été ainsi obtenues et une revégétalisation dans l'optique d'une restauration écologique, avec une diversité minimale d'espèces natives est désormais pratiquée dans la majorité des opérations de réhabilitation. L'intérêt des recherches se porte aujourd'hui sur une meilleure compréhension du fonctionnement de l'interface sols/plantes, et notamment sur l'utilisation des topsoils (Amir et al. 2003 ; Amir et al. 2014).

## **LE TOPSOIL COMME NOUVEL OUTIL DE RESTAURATION**

Le « topsoil » comme outil de restauration des terrains miniers dégradés, consiste à récupérer les premiers centimètres d'un sol, naturellement riches en matières organiques, semences et micro-organismes (qui définissent le potentiel biologique de restauration), lors d'une opération qui précède l'excavation des stériles miniers, puis à l'épandre sur les sites dégradés à restaurer (Sheoran et al. 2010 ; Ghose, 2012). Par une même opération, les topsoils répondent ainsi naturellement à la majorité des contraintes de restauration liées aux conditions des terrains à restaurer. Ils apportent l'essentiel des éléments nécessaires pour reconstituer un sol et permettre le retour de la végétation et de la faune d'un site, catalysant la restauration des écosystèmes miniers (Hall et al. 2009). Cette méthode présente les avantages de diminuer les besoins en amendements et fertilisation, de favoriser

l'implantation naturelle d'espèces indigènes parfaitement adaptées aux sites, ainsi que d'enrichir la diversité spécifique, et de permettre le développement de symbioses microbiennes (*cf synthèse bibliographique*). De plus lorsque l'épandage de topsoil est couplé avec des méthodes de plantation ou d'ensemencement, il permet d'obtenir de très bons résultats (Grant & Koch, 2007). Par ailleurs la mise en œuvre de cette méthode est relativement peu coûteuse, le substrat étant de toute façon déplacé pour atteindre les couches de minerai exploitables. Le topsoil constitue un outil de restauration écologique directement disponible sur mine, pouvant être manipulé par les engins miniers, et permet de valoriser un sous-produit de chantier (Ward et al. 1996), tout en diminuant le volume des stériles miniers (Dahlstrand, 1995). A ce jour, l'utilisation des topsoils en Australie, sur la mine d'ALCOA montre les meilleurs résultats liés à cet outil. L'utilisation seule des topsoils a permis le rétablissement de plus de 70% de la richesse spécifique végétale (Koch, 2007), pour un coût diminué de 40% par rapport aux techniques traditionnelles (Ward et al. 1996). De manière plus globale, la majorité des résultats observés à travers le monde confirme l'intérêt et l'efficacité des topsoils pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés (Sheoran et al. 2010 ; Ghose, 2012). L'utilisation des topsoils est aujourd'hui considérée comme la technique la plus efficace et largement employée dans un grand nombre de programme de restauration minière et leur utilisation abondamment préconisée (Sheoran et al. 2010 ; Ghose, 2012). Le topsoil apparaît, à travers la littérature, comme le deuxième matériau le plus précieux qu'il faille gérer sur mine après le minerai.

## **PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

Néanmoins, les topsoils se révèlent également à travers la littérature, comme hétérogènes de par leurs caractéristiques pédologiques et biologiques et les conditions climatiques et topographiques dépendantes de leur environnement direct. L'utilisation des topsoils en Nouvelle-Calédonie, ne datant que des années 2000, les connaissances actuelles locales liées à cet outil sont encore fragmentaires, et les caractéristiques des topsoils, tout comme les résultats obtenus sont hétérogènes (L'Huillier et al. 2010). Pourtant, scientifiques et compagnies minières s'accordent à dire que des efforts sont à faire sur le recyclage des sols de surface. Ils n'ont certes pas de valeur marchande mais ils sont au cœur des problèmes de la restauration écologique. Soulignée dès 2003, lors du colloque international « préservation et restauration écologique en milieu tropical minier » de Nouméa, l'importance de poursuivre les recherches fondamentales sur les topsoils a été renouvelée lors de la conférence de la Society for Ecological Restoration Australasia (SERA) de Nouméa en 2014, comme en témoigne la mise en place de projets de recherche récents

associant différents acteurs scientifiques (l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), l'Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD)... ) et industriels du territoire (Koniambo Nickel SAS, Société Le Nickel, VALE-NC,).

L'objectif principal de ce travail de recherche est l'étude et la caractérisation des potentialités biologiques des topsoils (fertilité physico-chimique, banque de graines, micro-organismes) en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux miniers dégradés néo-calédoniens. Les résultats de cette étude devraient permettre, *in fine*, d'adapter les itinéraires techniques associés à l'utilisation des topsoils au contexte local et d'en optimiser les bénéfices. Pour répondre à cet objectif, trois temps d'études ont été mis en place. Les axes de travail choisis couvrent trois temps d'utilisation du topsoil depuis sa récupération, en passant par son stockage, jusqu'à sa revitalisation, et sont étudiés à l'échelle industrielle. Ce travail est réalisé sur le massif du Koniambo, massif minier exploité par Koniambo Nickel SAS, localisé en province Nord. Ce massif a accueilli de nombreux travaux de recherche, et est aujourd'hui un modèle d'étude en Nouvelle-Calédonie (Perrier 2005 ; Zongo, 2010 ; Houlès (en cours)).

Une **synthèse bibliographique** fait l'exposé des connaissances actuelles de l'outil topsoil en restauration écologique à travers le monde. Après une revue détaillée de cet outil, de ses composantes, de leurs intérêts respectifs pour la restauration écologique, une revue de la littérature internationale est réalisée, ce qui permet de pointer les questions qui sous-tendent ce travail. Une dernière partie, fait état du contexte néo-calédonien et des problématiques de recherches liées aux topsoils.

Le **chapitre 1** présente les résultats de l'étude typologique des topsoils du massif du Koniambo. Il est maintenant reconnu que l'utilisation du topsoil et son efficacité à restaurer le milieu dépend étroitement de son potentiel biologique. L'évaluation du potentiel de la banque de semences de la terre végétale, comme la compréhension des modèles de distribution spatiale des communautés microbiennes sont des étapes essentielles dans la mise en œuvre de mesures de gestion adaptées des topsoils pour la restauration écologique de la diversité des communautés végétales. Une question centrale est de savoir si oui ou non il est bon de séparer la couche arable des nombreuses communautés végétales pour aider à recréer la diversité végétale présente avant exploitation minière? Plusieurs questions se posent alors, notamment sur les paramètres de distribution des potentialités biologiques des topsoils, sur les valeurs de celles-ci en fonction de leur situation dans le paysage (effet du type de sol, de la végétation...) et sur leurs implications pour la restauration écologique des écosystèmes. Pour cela, il est réalisé l'évaluation du potentiel germinatif de la banque de



graines, ainsi que l'étude des facteurs de distribution spatiale des communautés microbiennes de topsoils associés à six communautés végétales distinctes, réparties le long d'un gradient de succession végétale.

Le **chapitre 2** présente les résultats liés à la caractérisation de l'évolution du potentiel biologique des topsoils pendant stockage. Dans certains cas, l'utilisation du topsoil pour les travaux de restauration ne peut intervenir, en raison de la logistique d'exploitation minière, qu'un certain temps après sa récupération. En attendant une utilisation ultérieure, le topsoil est alors récupéré des sites qui vont être impactés et placés en tas pour stockage. Cette étape de stockage est reconnue pour avoir un effet dépressif sur la conservation des potentialités biologiques de restauration des topsoils. Compte tenu de l'importance des topsoils pour les travaux de restauration des terrains miniers, et de la difficulté d'éviter leur stockage, de nombreux travaux de recherche s'attachent aujourd'hui à la mise en place d'outils d'études destinés à la compréhension des effets du stockage et des mécanismes responsables de la dégradation du potentiel biologique. Les connaissances acquises devraient permettre aux opérateurs miniers de mettre en place, selon leurs objectifs de restauration, des stratégies de gestion des topsoils qui leur sont appropriées, selon les pertes biologiques constatées. Plusieurs questions se posent à l'échelle locale, notamment sur l'évolution du potentiel biologique des topsoils selon le temps, la profondeur de stockage, et selon les caractéristiques initiales des topsoils stockés.

Le **chapitre 3** fait état des résultats liés aux essais de revitalisation d'un topsoil rendu infertile par le stockage. Il s'agit de la revalorisation biologique d'un topsoil, rendu stérile (biologiquement improductif) après stockage, en visant à rétablir une qualité biologique suffisante pour que celui-ci puisse à nouveau complètement jouer son rôle d'outil de restauration écologique. Les méthodes, voies et moyens de revitalisation des topsoils, pour la restauration écologique ou d'autres domaines (agriculture, sylviculture...), font l'objet d'un intérêt croissant. Toutefois, le choix et l'utilisation des techniques de revitalisation/vitalisation de substrats édaphiques doivent être réalisés en fonction de leurs propriétés, de leur disponibilité à l'échelle locale, mais également en fonction des objectifs finaux de restauration (Zipper et al. 2011). Ainsi, ce dernier temps de recherche évalue la capacité de réintroduction d'un potentiel biologique de différents traitements selon les moyens techniques dont pourrait disposer Koniambo Nickel SAS.

Enfin, une conclusion générale clôture ce manuscrit et ouvre des problématiques nouvelles.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



## I/ GENERALITES SUR LE TOPSOIL

### I.1/ ENTRE LE SOL ET LA VEGETATION : LE TOPSOIL

Le topsoil est un terme anglo-saxon signifiant littéralement « sol de surface ». Moins nuancés que les auteurs français, les auteurs anglophones utilisent ce terme pour désigner différents outils. Selon l'usage et les caractéristiques pris en compte, on trouve dans la littérature différentes définitions possibles. Le topsoil peut ainsi définir « la terre végétale » utilisée par les urbanistes pour enrichir des terrains de faible fertilité, ou définir « la couche arable » en agronomie qui traduit le rôle majeur de cette fraction de sol dans la production végétale, qu'elle soit agricole ou forestière (Hargis & Redente, 1984 ; Hatteshweiler, 2011).

Plus généralement, en pédologie, science qui étudie les caractères physiques, chimiques et biologiques des sols et leur évolution, le topsoil est défini comme l'épisolum humifère. Il s'agit alors de l'ensemble des horizons supérieurs d'un sol, contenant de la matière organique (horizon O, H et A) et dont l'organisation est sous la dépendance essentielle de l'activité biologique (**Fig. 1**) (AFES, 2009). Le topsoil apparaît comme un carrefour multifonctionnel essentiel de l'écosystème, à l'interface entre les principaux compartiments de l'environnement que sont l'hydrosphère, la lithosphère, l'atmosphère et la biosphère (**Fig. 2**) (Gobat et al. 2010). Situé en surface des sols, le topsoil en constitue le compartiment le plus actif et intégrateur, physiquement le plus structuré, chimiquement le plus fertile, et biologiquement le plus actif (Gobat et al. 2010). Il est le lieu explicatif primordial des relations entre le sol et la végétation, comme site des activités biologiques, support physique, carrefour énergétique, habitat des organismes, régulateur des matières en circulation et interface privilégiée entre le sol et la végétation. L'apport et l'utilisation énergétique y est maximale et permet la synthèse de biomolécules, la croissance des organismes, le fonctionnement des chaînes et des réseaux trophiques et de leurs multiples compartiments. La litière s'y transforme (humus et ions nutritifs), la faune et la microflore du sol y sont les plus actives (dont un rôle majeur est celui de la décomposition de la litière et la libération consécutive d'éléments minéraux absorbables par les végétaux), et souvent les plantes vasculaires s'y enracinent préférentiellement (Gobat et al. 2010).

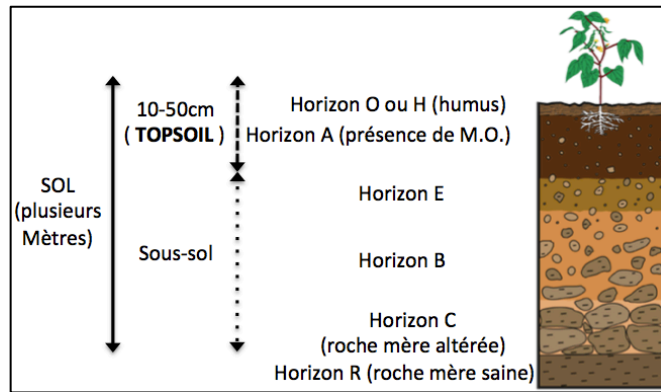


FIGURE 1. Profil pédologique général d'un sol et localisation du topsoil (d'après Gobat et al. 2010).

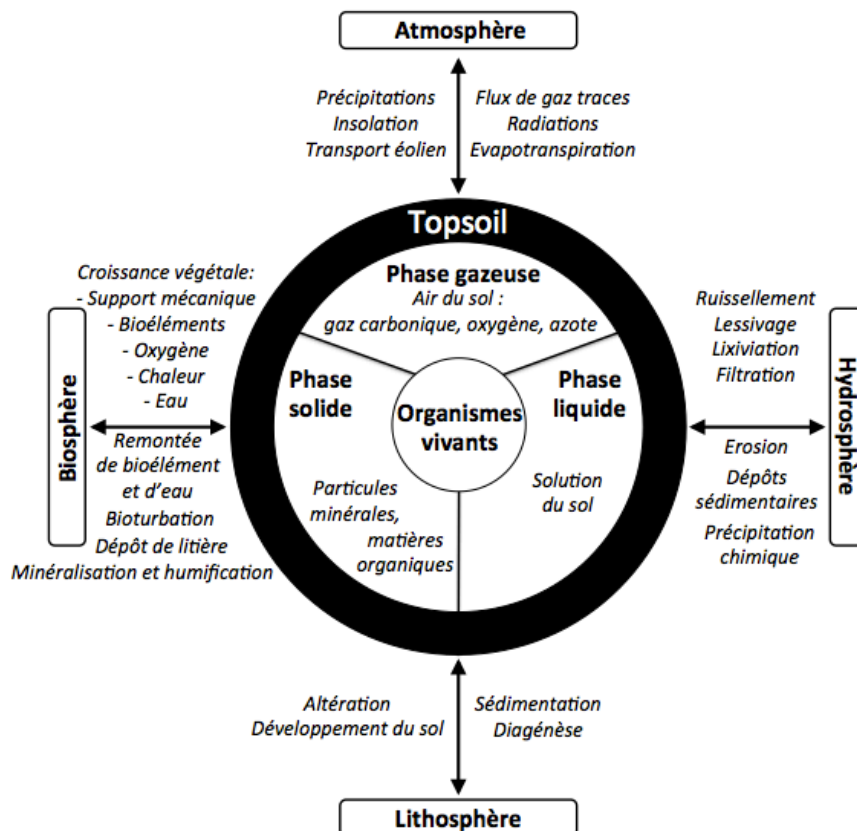


FIGURE 2. La complexité externe et interne du topsoil. Adaptée de Gobat et al. (2010).

## **I.2/ PEDOGENESE ET FORMATION DES TOPSOILS**

La formation d'un topsoil intervient lors des premières étapes de formation d'un sol (pédogénèse). De façon schématique la formation d'un sol se subdivise en trois phases (Soltner, 2005) : une étape d'altération de la roche-mère, une étape d'enrichissement en matières organiques, une étape de transfert de matières et de différenciation d'horizons (**Fig. 3**). Ces étapes sont à la fois influencées par le climat, le relief, les organismes vivants, le matériel parental (ou roches-mères, de natures diverses) (GESSOL, 2008). A l'échelle mondiale, le climat est un facteur déterminant des processus de formation des sols, car à travers le contrôle des températures et du régime hydrique, il détermine notamment les flux d'eau et les vitesses de décomposition des matières organiques. A une échelle locale, le relief induit également des changements dans la formation des sols, notamment par son effet sur le régime hydrologique et sur les transferts latéraux et verticaux des matières. Les organismes vivants influencent quant à eux les processus de formation et d'évolution des sols, principalement par l'intermédiaire de la qualité de la litière (végétale) qui modifie l'activité biologique, sélectionne les micro-organismes et certains invertébrés, et libère des produits plus ou moins résistants à la décomposition. Enfin, le matériel parental influe sur la formation et l'évolution des sols par sa composition chimique et ses propriétés physiques. Ainsi, en fonction de la nature et de la combinaison de ces différents facteurs, différents types de sols et donc de topsoils peuvent donc être formés. De même qu'en fonction de la nature de ces facteurs, la formation des topsoils, de la roche-mère vers un système équilibré, peut prendre de 10 à 10 000 d'années (Gobat et al. 2010). Ainsi, en raison de sa position d'interface, le topsoil relie le temps d'évolution de la végétation (saison, décennie, siècle...) à celui du sol, globalement plus lent (décennie à millénaire selon les horizons) constituant une charnière temporelle et spatiale irremplaçable dans l'écosystème.

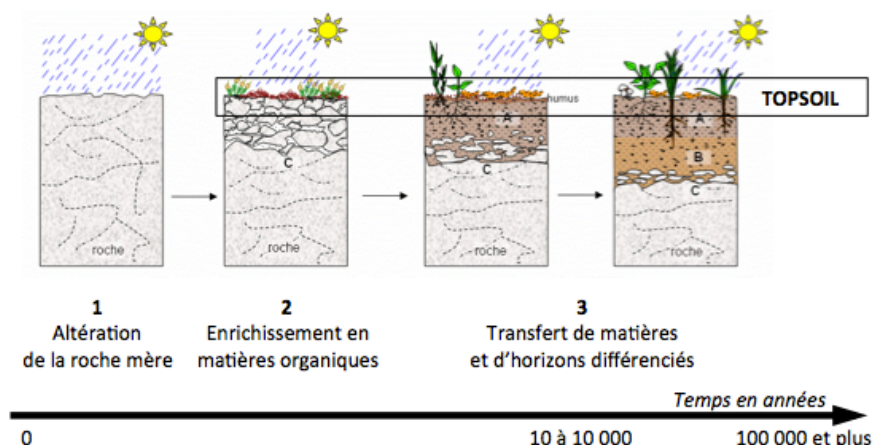
## **I.3/ UN MILIEU ORGANO-MINERAL COMPLEXE**

### **I.3.1/ COMPOSANTES MINERALES**

La fraction minérale du sol qui résulte de la désagrégation physique, et de l'altération biochimique, lors des processus de pédogénèse peut être classée selon deux critères, d'ordre granulométrique ou minéralogique.

L'analyse granulométrique sépare les constituants minéraux selon leur taille. La fraction grossière regroupe les constituants minéraux individualisés d'une dimension supérieure à 2mm. La terre fine sépare les sables, particules minérales de 2mm à 50µm, les limons de 50µm à 2µm et les argiles, inférieurs à 2µm. La proportion relative, en masse, des particules minérales, dans chaque classe de taille, définit alors la texture du sol, caractéristique importante des sols car elle en détermine un certain nombre de propriétés

comme la capacité de stockage de l'eau, les conditions de drainage, ou encore la distribution des organismes dans le sol. En particulier, la proportion d'argile influence la formation du complexe argilo-humique, la capacité d'échange cationique, et plus généralement la fertilité et la profondeur d'enracinement (Gobat et al. 2010)..



**FIGURE 3.** Principe de la pédogénèse de façon schématique la formation d'un sol et donc d'un topsoil, de la roche brute à un système équilibré, se subdivise en trois phases (Soltner, 2005).

(1) Dans un premier temps, sous l'action de l'eau, des variations de température (exemple: alternance de gel/dégel) et du vent, le matériau parental se fractionne de façon mécanique. Cette désagrégation physique conduit à la formation d'éléments de plus en plus petits qui s'altèrent plus ou moins en fonction des conditions climatiques. Cette altération des éléments transforme les minéraux initiaux par différentes réactions chimiques (faisant intervenir l'eau, la présence d'oxygène, de dioxyde de carbone) en composés solubles (sels...) et en minéraux secondaires (argiles...). Contrairement au processus de désagrégation, l'altération modifie la composition minéralogique du matériau parental. Désagrégation et altération produisent un matériel (mélange de constituants de tailles et de qualités minéralogiques variées) apte à intégrer dans une deuxième phase, les êtres vivants et leurs matières organiques formant alors une nouvelle entité, le sol (Dewolf & Bourrié, 2008 ; Gobat et al. 2010).

(2) Dans la deuxième phase de l'évolution des sols, la matière organique est transformée puis intégrée au sol par les organismes édaphiques. Dès son arrivée sur le substrat minéral (litière aérienne) ou dans celui-ci (litière souterraine), la matière organique subit trois types de transformations.

- Une minéralisation, processus physique, chimique et surtout biologique de transformation des constituants organiques en constituant minéraux.
- Une humification, processus biochimique de néosynthèse de substances organiques par augmentation de la taille de certaines molécules.
- Une assimilation par les microorganismes, à la fois consommateurs ultimes à l'extrémité des chaînes de détritiques et producteurs secondaires au départ d'une chaîne de broyage.

Ces transformations se poursuivent durant toute l'évolution des sols, tant que de nouveaux apports existent, contribuent largement aux phénomènes de formations et de structuration des sols.

(3) Au cours d'une troisième étape, dite de transfert de matières, la circulation de l'eau à travers le sol entraîne des éléments solubles (sels, calcium...) et des particules (argiles, matières organiques...) plus ou moins profondément, ce qui conduit à une organisation du sol en couches distinctes possédant des caractéristiques des couleurs et de structures homogènes appelés horizons pédologiques (AFES, 2009). A mesure que le sol se développe, différents horizons s'individualisent. D'abord les horizons organiques (O, H) et l'horizon organo-minéral (A), puis les horizons minéraux.

En seconde approche, la qualité minéralogique définit le rôle des fractions granulométriques. Elles distinguent les minéraux (i) non altérés, dits primaires, tels que des grains de quartz, des silicates et des minéraux carbonatés. (ii) altérés, dits secondaires, comme les argiles minéralogiques, les oxyhydroxydes (de fer et d'aluminium), les carbonates, les phosphates. Parmi les minéraux altérés, les argiles minéralogiques possèdent différentes propriétés qui leur confèrent un rôle central dans le fonctionnement des sols. Ce sont des silicates d'aluminium constitués de feuillets chargés négativement qui possèdent une grande surface spécifique capable de retenir des molécules (matières organiques, nutriments...) et d'absorber l'eau (Gessol, 2008). La fraction minérale joue ainsi un rôle majeur dans la fertilité des sols. Plus faibles dans sa teneur en éléments grossiers que les horizons inférieurs, le topsoil possède donc de meilleures caractéristiques de rétention d'eau, également favorables à la pénétration racinaire et joue un rôle prépondérant dans la fertilité minérale des sols (Gobat et al. 2010).

### **1.3.2/ COMPOSANTES BIOLOGIQUES**

#### **1.3.2.1/ LA MATIERE ORGANIQUE**

Trois types de constituants organiques sont présents dans les topsoils. (i) La litière au sens large, est constituée de l'ensemble des matières organiques en décomposition. Elle comprend les organismes et les parties d'entre eux qui viennent de mourir et qui s'en sont détachés, qu'ils soient végétaux, animaux ou microbiens, aériens ou souterrains, ainsi que les excréments des animaux et différents composés émis directement dans le milieu (Berg & McClaugherty, 2003). (ii) Les matières organiques héritées regroupent un ensemble de molécules directement issues de la dégradation de la litière. Ce sont les glucides (lignine et cellulose, les lipides, et composés azotés (protéines, acides aminés, acides nucléiques, nucléotides). (iii) Les matières organiques humifiées rassemblent les produits de l'humification. Il s'agit de substances organiques nouvellement synthétisées par augmentation de la taille de certaines molécules organiques. Présente uniquement au sein du topsoil, la matière organique assure de nombreuses fonctions. Elle permet notamment une meilleure rétention en eau, améliore la stabilité structurale et limite les phénomènes de compaction et d'anoxie (Sheoran et al. 2010 ; Ghose, 2012). Elle représente également une réserve énergétique d'éléments nutritifs pour les espèces qui la consomment, et qui permettent, par les réseaux trophiques, sa minéralisation et la libération d'ions nutritifs indispensables à la croissance végétale (Gobat et al. 2010).

#### **1.3.2.2/ LA BANQUE DE GRAINES**

En tant que support de la végétation, les topsoils en recueillent les semences qui constituent alors une banque de graines. Le terme banque de graines fait référence aux



graines enterrées sous la surface, reposant sur la surface, ou contenues dans la litière ou l'humus (Baskin & Baskin, 1998). Les entrées de semences dans la banque de graines sont en majeure partie déterminées par la couverture végétale sus-jacente d'un topsoil, mais des apports exogènes existent aussi (Salazar et al. 2011). Il est ainsi considéré que la banque de graines des topsoils peut représenter la palette spécifique des espèces végétales qu'ils supportent. La banque de graines des topsoils traduit le dynamisme de la succession végétale, et joue un rôle majeur dans la régénération des écosystèmes après perturbation, définissant un potentiel germinatif favorisant la capacité de résilience du milieu (Cespedes et al. 2012).

### I.3.2.3/ L'EDAPHON

L'édaphton définit l'ensemble des organismes vivants à la surface du sol (épi-édaphon), dans la litière (hémi-édaphon), et dans les horizons supérieurs des sols (eudaphon) i.e. dans le topsoil (Gobat et al. 2010). Ces organismes présentent une diversité surprenante de taille et de morphologie, et de comportement, avec des représentants de tous les principaux taxons et groupes fonctionnels du monde terrestre (Decaëns et al. 2006 ; 2008). On y distingue la microflore (ou micro-organismes : bactéries, champignons, algues...), la micro et la méso faune (animaux dont la taille est inférieure à 2mm : protozoaires, nématodes, micro-arthropodes...), et la macrofaune (animaux dont la taille est supérieure à 2mm : vers de terre, myriapode, fourmis, petits mammifères...). L'édaphton réalise de nombreuses fonctions essentielles au maintien et à la durabilité des écosystèmes (SER, 2002), mais également du maintien de ceux-ci face à une perturbation à travers la notion de redondance fonctionnelle (Lavelle, 2002 ; Blondel, 2003). Il participe activement à l'écologie du sol et intervient dans sa fertilité à travers la stabilisation des agrégats, essentiel au maintien des conditions structurelles et de porosité appropriés à la croissance des végétaux (Axelrood, et al. 2002 ; Mummey et al. 2002 ; Ghose, 2005 ; Frouz, 2009), et notamment par leur participation aux cycles des éléments nutritifs à travers la dégradation de la matière organique et la libération consécutive d'ions nutritifs pour les plantes (Preston et al. 2001 ; Ponder & Tadros, 2002).

Parmi les rôles importants joués par l'édaphton, il est important de souligner celui joué par les micro-organismes symbiotiques, bactéries et mycorhizes. Leur rôle est en effet essentiel, en particulier sous climat tropical, où la majorité des écosystèmes évoluent malgré des conditions édaphiques défavorables, grâce à l'existence de ces relations symbiotiques (Amir & Ducouso, 2010). De plus, pour certaines espèces végétales, les partenariats symbiotiques sont essentiels et leur développement peut être compromis en leur absence (Strullu et al. 1999).

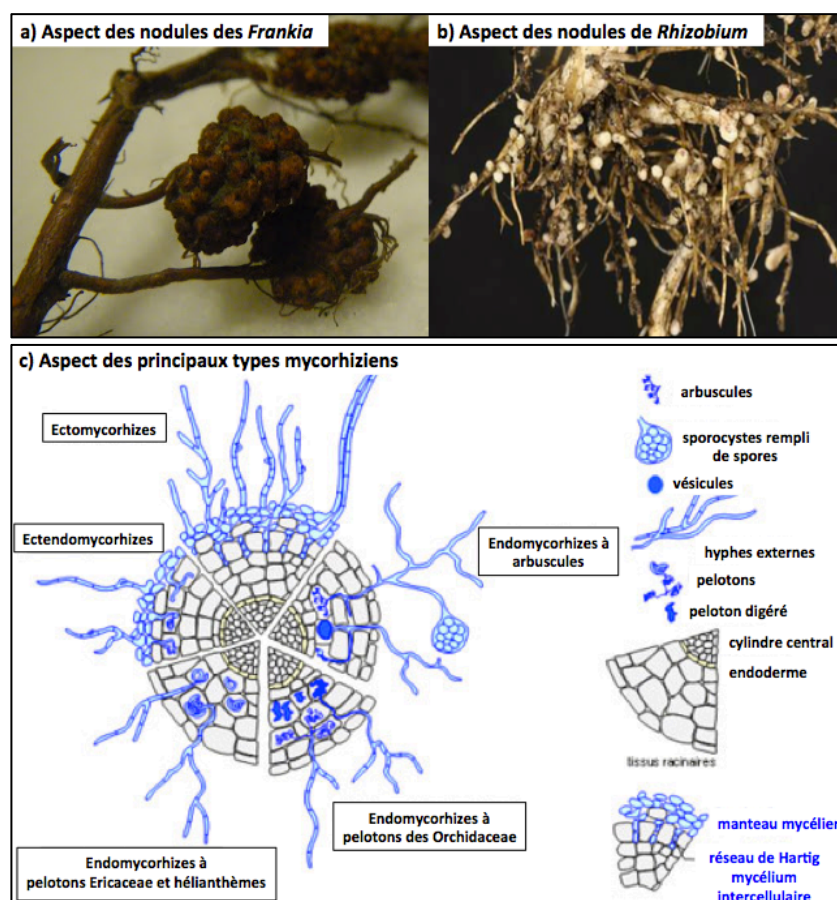
#### 1.3.2.3.1/ Les bactéries

Bien que l'azote constitue près de 80% de l'air, les sols en sont fréquemment carencés, et doivent être constamment réapprovisionnés en cet élément (L'Huillier et al. 2010). Une partie de ce réapprovisionnement est réalisé naturellement par des bactéries capables de réduire l'azote de l'air  $N_2$  en azote ammoniacal  $NH_3$  grâce à une réaction enzymatique réalisée par des nitrogénases (Sotres et al. 2005). Ce processus est appelé fixation biologique de l'azote. Celle-ci peut être réalisée soit par des bactéries libres du sol, soit par des bactéries vivant en symbioses (du genre *Frankia* ou *Rhizobium*) avec certains groupes de plantes au sein d'un organe spécialisé, le nodule fixateur d'azote (**Fig.4a, 4b**). Ce type de symbioses ne concerne qu'un nombre limité de taxons végétaux, mais peut avoir localement une importance particulière dans certains écosystèmes carencés en azote, comme les substrats ultramafiques (Harrison et Rajakaruna, 2011). Enfin, parmi les bactéries non symbiotiques, mais bénéfiques aux végétaux, les bactéries à effet promoteur de croissance (PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ont un effet bénéfique sur la plante, direct en stimulant la croissance racinaire et indirect en contrôlant certains organismes phytopathogènes (Gobat et al. 2010 ; Gensous, 2014).

#### 1.3.2.3.2/ Les mycorhizes

Les mycorhizes sont définies comme le résultat d'une symbiose entre les racines d'une plante avec certains champignons. On distingue deux types principaux de mycorhizes définies par les relations physio-anatomiques entre les deux partenaires : les endo et les ectomycorhizes (**Fig. 4c**). Ces symbioses concernent au moins 90% de famille de plantes terrestres, et près de 2/3 des espèces végétales forment des associations endomycorhiziennes appartenant aux glomérormycètes (Wang & Qiu, 2006 ; Smith & Read, 2008 ; Guo et al. 2012). Ces symbioses interviennent de diverses façons dans le développement et l'adaptation des plantes. Le rôle central et le mieux documenté est leur intervention dans la nutrition phosphatée de la plante (Smith & Read, 2008). Le phosphore est un élément présent dans les sols, sans toutefois être disponible pour les végétaux, car fortement lié aux particules argilo-humiques (Khan, 2005 ; Smith & Read, 2008). Les champignons mycorhiziens sont capables de récupérer cet élément et de le transférer vers les racines. Ces symbioses interviennent également de façon plus ou moins importante dans l'assimilation d'autres éléments minéraux. Elles jouent aussi un rôle dans la gestion de l'eau par la plante, et dans la résistance au stress hydrique en fournissant de l'eau autrement inaccessible pour les végétaux (Nadian et al. 1997). D'autres travaux ont rapporté un rôle de résistance aux pathogènes (Selosse et al. 2004). Enfin différents travaux ont également démontré leur intervention dans la tolérance de leur hôte aux métaux lourds parce qu'ils

peuvent fixer ces éléments dans leur mycélium empêchant la translocation des éléments toxiques vers les racines (Kaldorf et al. 1999 ; Arriagada et al. 2004 ; Amir et al. 2013).



**FIGURE 4.** Illustrations des principaux partenaires symbiotiques des végétaux. A) nodules bactériens de *Frankia* (www.scentedleaf.com), b) nodules bactériens de *Rhizobium* (www.scentedleaf.com), c) principaux types mycorhiziens actuels représentés sur une coupe transversale de racine (Halle, 2008).

## II/ L'OUTIL TOPSOIL EN RESTAURATION ECOLOGIQUE MINIERE

### II.1/ CONDITIONS DES TERRAINS MINIERES DEGRADEES

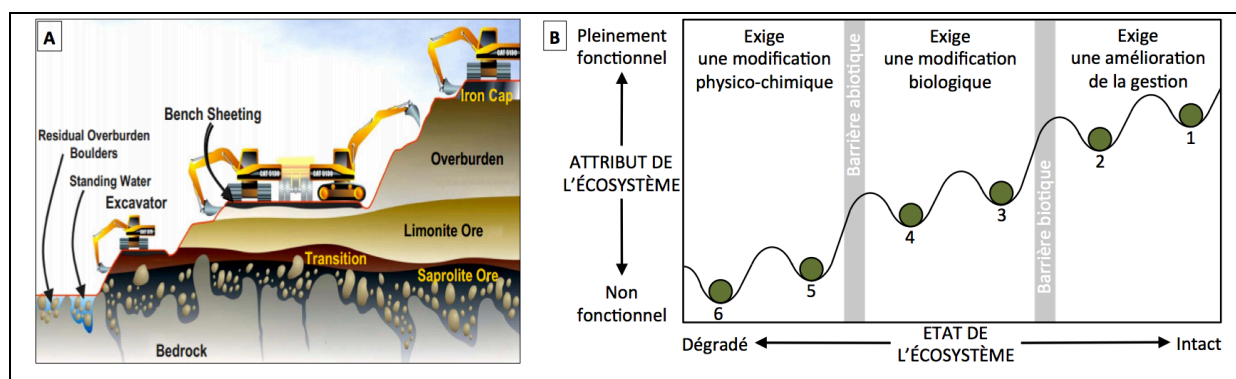
L'exploitation minière à ciel ouvert est parmi les plus destructives d'un point de vue environnemental. Ces exploitations nécessitent le décapage du couvert végétal et des horizons superficiels des sols à trop faibles teneurs (appelés « stériles miniers ») parfois jusqu'à la roche-mère, afin d'accéder aux couches inférieures riches en minerais exploitables (**Fig. 5a**) (ELAW, 2010). Généralement, les conditions des terrains miniers dégradés montrent par rapport aux sols naturels, une rupture des fonctions écologiques à travers le franchissement de seuils (i) physiques, (ii) chimiques et (iii) biologiques (**Fig 5b**) (Hobbs & Harris, 2001). Il en résulte une incapacité des terrains miniers dégradés à soutenir

l'installation et le développement d'un couvert végétal (Sheoran et al. 2010), mais également une perte ou un affaiblissement, dans les meilleurs cas de la résilience des écosystèmes miniers (Singh & Singh, 2006).

(i) Plusieurs substrats présentent une texture grossière (constitués majoritairement d'éléments supérieurs à 5cm), peu favorables à la pénétration racinaire, présentant des déficits hydriques importants car trop sensibles à l'évapotranspiration et de fait dépourvus de réserve utile en eau pour les plantes (Heras, 2009). C'est notamment le cas des anciennes carrières d'exploitation (Maiti & Ghose, 2005). D'autres ont une texture fine, constitués d'éléments inférieurs à 2mm, et sont facilement compactés, réduisant la capacité de rétention et d'infiltration des eaux, la capacité de croissance racinaire et créant des milieux d'anoxie défavorables à la microflore (Singh & Singh, 2006). C'est le cas des stocks de stériles ou d'anciennes pistes.

(ii) Par rapport aux horizons supérieurs des sols, les substrats décapés ont en commun de faibles teneurs en macronutriments principaux, Azote (N), Phosphore (P) et Potassium (K). Cela s'explique en grande partie par de faibles teneurs, ou l'absence de matière organique (Sheoran et al. 2010). Les fonctions biologiques des substrats et les cycles biogéochimiques des nutriments, sont alors perturbés, voire interrompus. Inversement, la biodisponibilité d'éléments phytotoxiques comme le magnésium, le nickel, le cobalt, le chrome sont élevés pour la plupart des substrats, faisant alors obstacle à la croissance végétale (Das & Maiti, 2006). Par rapport aux sols non impactés, les substrats décapés montrent également des écarts de pH défavorables à l'installation et au développement d'un couvert végétal (L'Huillier et al. 2010).

(iii) Enfin, contrairement aux sols de surface, les substrats à restaurer sont appauvris ou dépourvus de micro-organismes (Herrera et al. 2007). Comme décrit précédemment, les populations microbiennes jouent un rôle essentiel dans le maintien des conditions de fertilité des sols et leur durabilité (Gobat et al. 2010). Leur absence peut compromettre la croissance des plantes et, plus tard, la résilience du couvert végétal (De Deyn, 2003 ; Frouz et al. 2008 ; Sheoran et al. 2010). De plus, la disparition ou l'absence de partenaires symbiotiques, indispensables au développement de certaines espèces végétales, peut compromettre la régénération de celles-ci (Strullu et al. 1999). Enfin, la majorité des substrats à restaurer est dépourvue de matériel végétal (banque de graines, propagules) capable d'initier la reconquête végétale et la régénération naturelle des milieux impactés (Sheoran et al. 2010).



**FIGURE 5.** A) Principes de l'exploitation minière à ciel ouvert : exemple néo-calédonien (sln.nc, 2014), B) Modèle conceptuel de la dégradation et de la restauration d'un écosystème (de L'Huillier et al. 2010, adapté de Hobbs & Harris, 2001).

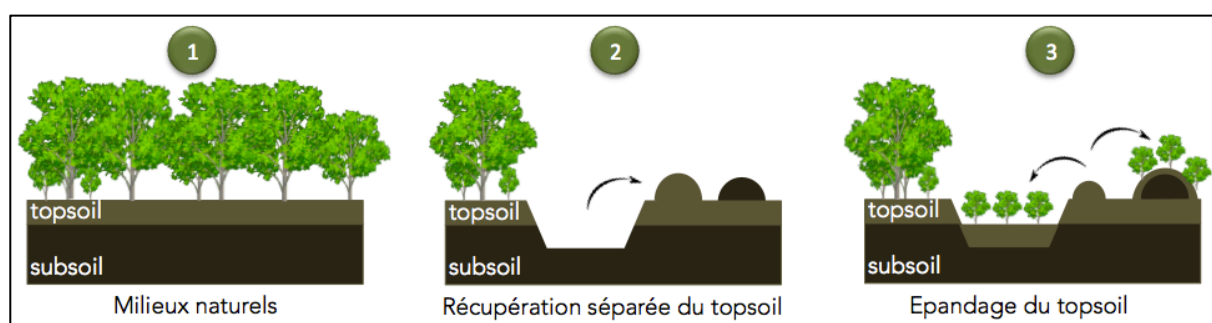
## II.2/ RESTAURATION ÉCOLOGIQUE : PRINCIPE ET DÉFINITION

La restauration écologique est définie par la « Society for Ecological Restoration » comme étant le processus qui assiste l'autoréparation d'un écosystème qui a été dégradé, endommagé ou détruit » (SER, 2004). Ce processus concerne la reconstruction de biotopes ou d'écosystèmes dégradés variés. Le but d'une telle intervention est de revenir à la structure, à la diversité et à la dynamique d'un écosystème considéré comme indigène et historique, bien qu'un tel objectif idéal ne soit que rarement atteint à moyen terme. L'application des principes de la restauration écologique des sites dégradés est aujourd'hui prônée par les grandes sociétés industrielles et minières à travers le monde, regroupées dans l'International Council on Mining & Metals (ICMM).

Bien que l'importance des moyens à mettre en œuvre pour la restauration d'un écosystème dépende de son niveau de dégradation, le principe de la restauration est identique pour l'ensemble des terrains à restaurer. L'effort de restauration doit porter sur l'élimination du facteur à l'origine de la dégradation et sur le réajustement des composantes biotiques (Hobbs & Harris, 2001). Dans le cadre de la restauration minière, la disparition et l'absence des sols de surfaces, responsable de la non reconquête des végétaux, pose le défi aux acteurs de la restauration de recréer les conditions des sols de surface avant l'impact de l'exploitation minière (Rogowski, 1985 ; Bradshaw, 2000 ; Sheoran et al. 2010). Cela comprend donc la gestion de tous les types de propriétés physiques, chimiques, et biologiques et nécessite la mise en œuvre de moyens très importants visant à améliorer d'abord les conditions abiotiques avant de pouvoir procéder aux manipulations biologiques utiles (Hobbs & Harris, 2001).

### II.3/ L'OUTIL TOPSOIL EN RESTAURATION ECOLOGIQUE

En restauration écologique, le topsoil définit l'ensemble des horizons supérieurs fertiles d'un sol (horizon O, H et A), contenant l'essentiel de la matière organique et de l'édaphon, la banque de graines et propagules, et dont l'organisation est sous la dépendance essentielle de l'activité biologique (Sheoran et al. 2010). L'outil topsoil en restauration écologique consiste alors à récupérer cette fraction superficielle des sols lors d'une opération qui précède l'excavation des stériles miniers, puis à l'épandre sur les sites dégradés à restaurer (**Fig. 6**) (Sheoran et al. 2010 ; Ghose, 2012). Par une même opération, l'épandage de topsoil répond à la majorité des contraintes de restauration liées aux conditions des terrains dégradés. Il apporte l'essentiel des éléments nécessaires pour reconstituer un sol et permettre le retour de la végétation et de la faune naturelle d'un site, catalysant la restauration des écosystèmes, notamment des écosystèmes miniers (Hall et al. 2009). L'utilisation du topsoil comme technique de restauration écologique présente l'avantage d'éliminer (ou de fortement diminuer) les contraintes physico-chimiques et de fortement réduire les coûts de préparation des terrains dégradés rendus stériles par l'activité minière, pour les rendre végétalisables (amendement, fertilisation) (Boruvka, 2012). Le topsoil est généralement beaucoup plus faible dans sa teneur en éléments grossiers, et possède donc de meilleures caractéristiques de rétention d'eau, caractéristiques également favorables à la pénétration racinaire (Sheoran et al. 2010). Une fois épandu sur les terrains miniers dégradés à restaurer, il s'agit ensuite de profiter des potentialités biologiques des topsoils, qui constituent des mécanismes de régénération naturelle des milieux : la matière organique (MO), la banque de graines et propagules, ainsi que l'édaphon, notamment les micro-organismes symbiotiques, bactéries et mycorhizes (Alday et al. 2011 ; Boruvka, 2012).



**FIGURE 6.** Principe d'utilisation de l'outil topsoil en restauration écologique (L.Bordez) (1) Ecosystème non perturbé (2) Décapage, récupération du topsoil (stockage si nécessaire) (3) Epandage sur terrains dégradés à restaurer.

### II.3.1/ LA MATIERE ORGANIQUE : UN POTENTIEL DE FERTILITE

Par son contenu naturel, l'application de topsoil permet d'augmenter les taux de matières organiques et nutriments des terrains dégradés à restaurer. Liée, au niveau moléculaire, à la matière minérale au sein du complexe argilo-humique, la matière organique joue le rôle de réservoir énergétique essentiel aux processus biologiques édaphiques. Elle permet de réduire les coûts de fertilisation en améliorant la teneur en éléments nutritifs et fournit un substrat à l'édaphon, qui, par les réseaux trophiques, permet d'en restaurer les cycles indispensables à la croissance végétale, ainsi qu'au maintien et à la durabilité des écosystèmes (Gobat et al. 2010; Sheoran, 2010). En 1999, Wali écrivait que la restauration de sites dégradés est avant tout conditionnée par la présence ou l'absence de matière organique, facteur essentiel qui régit la vitesse à laquelle les écosystèmes perturbés évoluent vers des conditions de durabilité grâce à la restauration des cycles des éléments nutritifs, et qui permettent ensuite aux semences de coloniser le milieu.

### II.3.2/ LA BANQUE DE GRAINES : UN POTENTIEL GERMINATIF

L'épandage du topsoil et de sa banque de graines est une méthode de restauration de la diversité des espèces et des communautés végétales qui s'est avérée être plus efficace que les techniques de plantation et de semis traditionnelles à travers un large éventail d'écosystèmes tempérés ou tropicaux (Koch 2007; Scoles-Sciulla & DeFalco 2009; Hall et al. 2010). Pour de nombreux auteurs, la seule présence de la banque de graines des topsoils suffit à justifier et à démontrer l'intérêt de la récupération et l'application des topsoils pour la restauration des terrains miniers dégradés (revue dans Sheoran et al. 2010). Par rapport aux techniques traditionnelles de restauration, la banque de graines naturellement présente dans le topsoil favorise l'implantation d'espèces natives parfaitement adaptées aux substrats et enrichit significativement la diversité spécifique des sites restaurés (Schalweiler et al. 2005 ; Martinez-Ruiz & Fernandez-Santos, 2005 ; Boruvka, 2012). Koch et al. (1996) ont d'ailleurs montré que l'utilisation du topsoil sur les mines de Bauxites australiennes a permis le rétablissement de près de 70% des espèces naturelles. Pour de nombreuses espèces indigènes et endémiques dont la disponibilité commerciale des semences est très faible, ou à cause des difficultés rencontrées pour leur établissement à travers les techniques de restauration traditionnelles, la banque de graines du topsoil constitue souvent le seul moyen de réintroduction (Machenzie & Naeth, 2010). Il est aussi démontré que la banque de graines du topsoil présente également l'avantage d'un cortège floristique comportant des espèces pionnières favorisant l'installation rapide d'un couvert végétal et les processus naturels de la succession végétale (Bradshaw, 2000 ; Alday et al. 2011). Thompson (1990), Ash et al. (1994) ont mis en avant que les zones restaurées par topsoil peuvent aussi servir à disperser cette diversité restaurée aux zones alentours.

Vicklund (2004) a quant à lui montré que l'utilisation du topsoil et de la banque de graines qu'il contient permet de diminuer l'installation d'espèces invasives par rapport aux zones adjacentes conventionnellement ensemencées. Par ailleurs, il a également été mis en évidence de meilleurs taux de survie et de croissance sur topsoil que sur d'autres substrats, tels que des stériles miniers fertilisés et/ou amendés (Koch et al. 2007). Alors que la demande en semences augmente avec les surfaces impactées par l'activité minière, il est largement admis que la banque de graines des topsoils constitue aujourd'hui pour les acteurs de la restauration, la meilleure source d'approvisionnement maximisant la diversité des zones à restaurer, à moindre coûts, tout en permettant d'éviter le recours aux espèces exotiques (Fogliani, 2010).

### II.3.3/ L'EDAPHON : UN POTENTIEL MICROBIEN

De nombreuses études soulignent aujourd'hui l'importance jouée par les biotes du sol dans la réussite des projets de restauration des écosystèmes terrestres (De Groot, 2005 ; Frouz et al. 2008, 2009). Aussi, la récupération du topsoil et son épandage rapide sur les terrains miniers dégradés, à restaurer présentent également l'avantage de la préservation et la conservation de l'édaphon et de ses fonctions.

Il est bien documenté que les associations symbiotiques sont essentielles pour la survie et croissance des plantes sur les terrains miniers dégradés hostiles (régime hydrique déficient, présence de métaux lourds...), et carencés en éléments nutritifs, notamment azote et phosphore, qui comme décrit précédemment constituent des facteurs limitants à la restauration des écosystèmes (Khan, 2005).

Leur rôle en général, et plus spécifiquement celui des associations symbiotiques ont été démontrés dans de nombreuses études. Ash et al. (1994), Van der Heidjen (1998) ou encore Wali (1999) ont notamment souligné l'importance des associations mycorhiziennes pour la restauration des terrains miniers dégradés et les mécanismes de la succession végétale. Strullu et al. (1999) ont démontré que pour certaines espèces végétales, les partenariats symbiotiques sont essentiels et leur restauration peut être compromise en leur absence. C'est notamment le cas sous climat tropical, où la majorité des écosystèmes évoluent malgré des conditions édaphiques défavorables, grâce à l'existence de ces relations symbiotiques (Amir & Ducouso, 2010). Enfin, et c'est essentiel pour les sols miniers, les travaux des deux dernières décennies montrent leur intervention dans la tolérance aux métaux lourds (Arriagada et al. 2004 ; 2005 ; Khade & Adholey, 2007 ; Orłanska et al. 2005 ; Ryska & Turman, 2007 ; Amir et al. 2013) parce qu'ils peuvent fixer ces éléments dans leur mycélium empêchant la translocation des éléments toxiques vers les racines (Kaldorf et al. 1999), diminuant d'autant plus les problèmes de phytotoxicité des terrains à restaurer. Par ailleurs, les travaux récents de Gensous (2014) ont démontré un



effet synergique des champignons endomycorhiziens et des bactéries PGPR pour la croissance et la tolérance aux métaux lourds, soulignant, l'intérêt de la préservation de la diversité microbienne.

#### **II.4/ UNE TECHNIQUE EFFICIENTE**

A ce jour, l'utilisation du topsoil est considérée comme la technique de restauration écologique des terrains miniers dégradés la plus efficace, répondant en « une » application à la majorité des contraintes des terrains miniers à restaurer. Elle est largement utilisée dans un grand nombre de programmes de restauration minière à travers le monde et son emploi abondamment préconisé (Sheoran et al. 2010; Ghose, 2012). Cette méthode présente les avantages d'apporter un substrat favorable à la croissance végétale, et des éléments nutritifs, de permettre l'implantation naturelle d'espèces indigènes parfaitement adaptées au site, notamment pour des espèces difficiles à planter par d'autres méthodes, d'enrichir la diversité spécifique, et de permettre le développement de symbioses indigènes. De plus, lorsque l'épandage de topsoil est couplé avec des techniques de plantations ou d'ensemencement, il permet d'obtenir de très bons résultats, reconstituant en quelques années un couvert végétal sur une zone dénudée (Koch et al. 2007). A travers la littérature, le topsoil apparaît ainsi, comme le deuxième matériau le plus précieux qu'il faille gérer sur mine après le minerai. La mise en œuvre de cette méthode est relativement peu coûteuse, le topsoil étant de toute façon obligatoirement déplacé pour atteindre les couches de minerais exploitables. De plus, le topsoil constitue un milieu vivant dont la formation est très lente au regard des générations et des phénomènes de dégradations auxquels il est exposé, et doit être aussi considéré comme une ressource limitée qu'il convient de protéger. Aussi, la récupération et l'utilisation des topsoils sont à mettre en œuvre le plus souvent possible.

Toutefois, la littérature démontre que les caractéristiques des topsoils, tout comme les résultats obtenus sont hétérogènes, en raison des conditions climatiques, topographiques et biologiques dépendantes de leur environnement direct. L'utilisation efficace des topsoils apparaît ainsi soumise à la connaissance préalable de plusieurs de leurs caractéristiques selon les objectifs de restauration fixés.

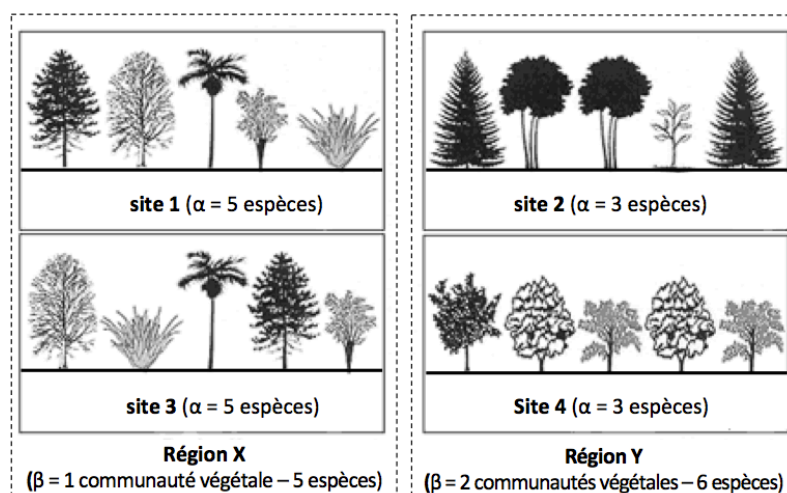
### III/ CONNAISSANCES NECESSAIRES A L'UTILISATION DES TOPSOILS EN RESTAURATION ECOLOGIQUE

#### III.1/ LA TYPOLOGIE DES TOPSOILS

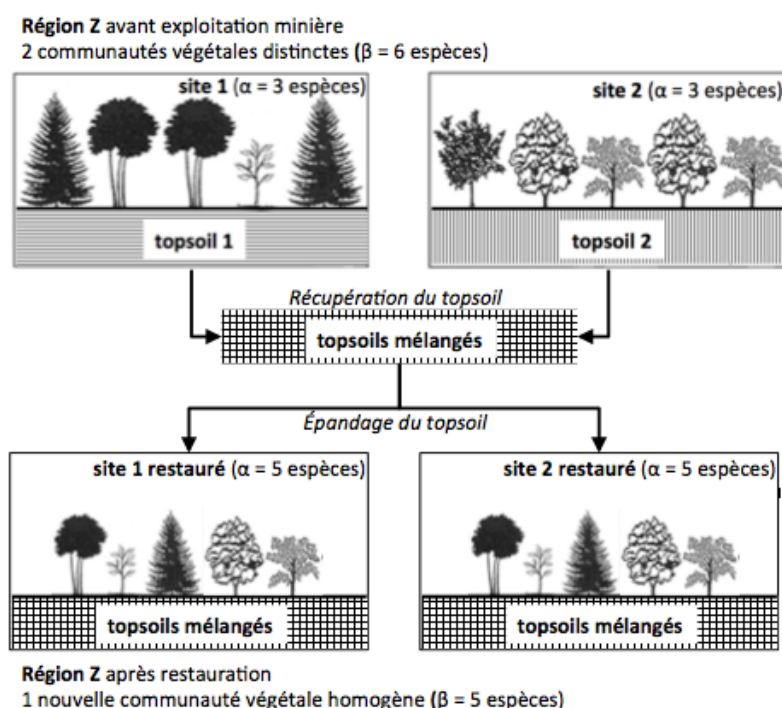
Les travaux de restauration des terrains miniers dégradés doivent considérer deux grands niveaux de diversité de végétation (Deput et al. 1984). Le premier niveau implique la diversité au sein des communautés individuelles des plantes établies, appelée diversité alpha ou diversité intra-communauté. Il correspond au nombre d'espèces coexistantes dans un milieu donné, c'est la richesse spécifique. Ce concept a été le premier pris en compte dans les travaux de restauration, et est encore aujourd'hui le premier souligné dans de nombreux résultats (Boruvka et al. 2012). Le second niveau implique la diversité des communautés végétales, appelé diversité bêta, ou diversité inter-communauté. Il se rapporte au nombre, aux caractéristiques et à la distribution spatiale des différentes communautés végétales individuelles à travers un paysage donné (**Fig. 7**).

Bien que des progrès considérables aient été réalisés en terme de restauration de la diversité alpha sur les terrains miniers dégradés, notamment grâce à l'utilisation des topsoils (Koch et al. 2007), la restauration de diversité des communautés végétales avant exploitation en utilisant le topsoil s'est révélée être un objectif plus difficile à atteindre. Dans sa revue, « Potential topsoiling strategies for enhancement of vegetation diversity on mine lands », Deput (1984) observait que la gestion et l'épandage de topsoils sans distinction particulière de leur origine, tendait à la création de communautés végétales restaurées « homogénéisées », présentant une augmentation de la diversité intra-communautaire, mais une forte diminution de la diversité inter-communauté (**Fig. 8**).

En reprenant les idées de Schafer (1982), Deput a alors fait l'hypothèse de l'influence variée de l'origine du topsoil sur leur potentiel de restauration et suggérait qu'un certain degré de ségrégation des topsoils selon les origines et les caractéristiques de leur potentiel de restauration, favoriserait la restauration de la diversité inter-communautaire végétale. Depuis, de nombreuses études ont donné raison à ces deux auteurs, mettant en évidence une typologie des topsoils selon la structuration de leur potentiel de restauration. Il est aujourd'hui reconnu que l'évaluation du potentiel germinatif de la banque de graines des topsoils, comme la compréhension des modèles de distribution spatiale des communautés microbiennes sont des étapes essentielles à la mise en place de mesures de gestion des topsoils adaptées à la restauration écologique de la diversité des communautés végétales (Richardson et al. 2012 ; Yu et al. 2012, Etten, van et al. 2014).



**FIGURE 7.** Principes des indices de diversité Alpha et Bêta. La diversité alpha est mesurée localement, pour un site donné. Ici le site 1 présente une diversité alpha plus forte que le site 2. La diversité Beta mesure la quantité de changement entre deux sites, ou le long d'un gradient, comme pour les régions X et Y. La région Y a une diversité Beta plus élevée que la région X, étant donné un plus grand turnover d'espèces entre les sites.



**FIGURE 8.** Schématisation du problème potentiel de la non ségrégation des topsoils (L. Bordez d'après Deput, 1984). Le mélange des topsoils entraîne une augmentation de la diversité alpha, mais une diminution de la diversité beta due aux phénomènes de compétitions entre les espèces pour l'accès aux ressources. Elle entraîne également une diminution de la diversité des communautés végétales en favorisant une homogénéisation de la réponse du potentiel biologique de restauration.

### III.1.1/ STRUCTURE ET POTENTIEL DE LA BANQUE DE GRAINES

A travers le monde, de nombreuses études ont mis en évidence une structure de la banque de graines des topsoils à différentes échelles spatiales (Lortie et al. 2005), temporelles (Caballero et al. 2008). D'autres études ont démontré une variation du potentiel de restauration (Etten, van et al. 2014), et son rôle dans le déterminisme des communautés végétales restaurées (Fenner & Thompson, 2005). Par conséquent, la caractérisation de la banque de graines des topsoils et de sa variation dans et entre les échelles spatiales et temporelles sert d'indicateur clé pour l'évaluation de son potentiel de restauration des communautés végétales et un préalable indispensable à l'utilisation des topsoils.

#### III.1.1.1/ STRUCTURE SPATIALE

De nombreux auteurs ont mis en évidence une structure spatiale de la banque de graines, majoritairement déterminée par les tendances spatiales du couvert végétal, en raison principalement de la pluie de graines selon leur capacité de dispersion (Lemenih & teketa, 2006), ou la présence de disséminateurs (Jimenez & Armesto, 1992), qui alimentent la banque de graines (Salomon, 2011). Dans des expériences d'écoulements, Maza-Villalobos et al. (2011) ont montré un changement de la composition spécifique de la banque de graines de topsoils le long d'un gradient de succession végétale dans des milieux arides du Mexique. Avec le même dispositif expérimental, Goma (2012) et Etten, van et al. (2014) ont rapporté des résultats similaires en étudiant respectivement un gradient de succession dans les habitats arides d'Égypte, et d'Australie. Dans les étages subalpins du plateau Tibétain, Ma et al. (2013) ont rapporté une augmentation de la richesse le long d'un gradient de succession. Alvarez-Aquino et al. (2014), Vieira et Scariot (2006) ont montré dans des forêts tropicales sèches d'Amérique de plus faibles densités de graines dans les milieux ouverts par rapport aux milieux fermés, c'est-à-dire, respectivement, des milieux dont la couronne végétale aérienne est discontinue, et continue.

#### III.1.1.2/ STRUCTURE TEMPORELLE

La structure de la banque de graines varie également dans le temps selon les saisons de fructifications (Walck et al. 2005), les conditions de persistance des semences (ibid), mais aussi selon les événements climatiques prévisibles et imprévisibles (Wright & Clarke, 2009; Tessema et al, 2012). De la même façon que pour la structure spatiale, Meave et al. (2012) ont montré un effet saisonnier sur la richesse spécifique de la banque de graines entre les saisons sèche et humide au Mexique, avec une plus grande densité d'émergence pendant la saison sèche. Les mêmes observations ont été rapportées par Dalling et al. (2007) pour des forêts tropicales sèches du Panama, et du Mexique par Pérez & Santiago (2001). Guo et al. (1998, 1999) ont montré une fluctuation saisonnière de la

densité des émergences dans les plaines de Chine, et Olano et al. (2012) pour des milieux de type méditerranéens. A l'inverse, les résultats de Maza-Villalobos et al. (2011) n'ont pas montré d'effet saisonnier de la banque de graines des topsoils dans les milieux arides du Mexique.

### III.1.1.3/ POTENTIEL DE RESTAURATION DE LA BANQUE DE GRAINES

Enfin, même si le rôle majeur de la banque de graines dans le déterminisme spécifique des communautés végétales restaurées a été démontré (Fenner & Thompson, 2005), la composition spécifique de celle-ci ne ressemble pas toujours à celle des communautés végétales sus-jacentes qui l'ont alimenté. Lorsque ces différences sont trop importantes, il peut alors apparaître difficile d'atteindre les objectifs de restauration fixés. Ce manque de correspondance entre la banque de graines et le couvert végétal semble principalement provenir de facteurs de persistance (Shen et al. 2006), et de prédation (Alvarez-Aquino et al. 2014). En se basant sur la comparaison d'indice de similarité, Alvarez-Aquino et al. (2014) ont mis en évidence un potentiel de restauration limité des banques de graines des topsoils des forêts tropicales sèches du Mexique, notamment en raison de l'absence presque totale d'espèces ligneuses. Etten, van et al. (2014) ont rapporté les mêmes observations pour les habitats arides d'Australie occidentale, Eler et al. (2010) pour des forêts tempérées anglaises, Yan et al. (2010) pour des forêts tempérées de Chine, soulignant la faiblesse de la banque de graines de ces topsoils pour la restauration des communautés végétales d'origine. A l'inverse, Ma et al. (2013) ont trouvé une forte ressemblance de la banque de graines et du couvert végétal sus-jacent dans les prairies du plateau Tibétain. Oke et al. (2007) ont également montré une forte ressemblance spécifique de la banque de graines et du couvert végétal pour des habitats arides du Nigéria, et Martinez-Duro et al. (2012) pour des habitats Méditerranéens.

### III.1.2/ STRUCTURE DES POPULATIONS MICROBIENNES ET POTENTIEL MICROBIEN

Comme décrit précédemment, les micro-organismes jouent un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes. Ils sont à l'interface entre le sol et les végétaux et assurent des fonctions écologiques telle que la minéralisation de la matière organique, essentielle à la fertilité des sols (Gobat et al. 2010). La compréhension des modèles de distribution spatiale des micro-organismes est ainsi reconnue comme indispensable pour anticiper les réactions des écosystèmes aux changements globaux (Singh et al. 2010), pour surveiller leurs réponses à ces changements (McHugh et al. 2014), et permettre leur restauration si nécessaire (Yu et al. 2012). Par ailleurs, Griffiths et al. (2008) ont montré que

la résilience des fonctions microbiennes des sols dépend de la structure des communautés microbiennes, et leur rôle dans la restauration des communautés végétales a été signalé comme essentiel à la succession végétale par Vogel-Mikus et al. (2006), et Rajkumar et al. (2009). Ainsi, de la même façon que pour la banque de graines, il apparaît essentiel de connaître la structure des populations de micro-organismes afin de mieux comprendre la contribution microbienne à la dynamique végétale (Gobat et al. 2010) et d'en favoriser la restauration.

En raison des limites des techniques d'études des communautés microbiennes, les réponses à ces questions sont restées incomplètes au cours des dernières décennies. Cependant, l'avènement récent des techniques biochimiques et moléculaires (Faugier, 2010), a fourni un regain d'intérêt pour ces questions et l'étude des communautés microbiennes est devenue un domaine émergent de la métagénomique (Smith & Peay, 2014).

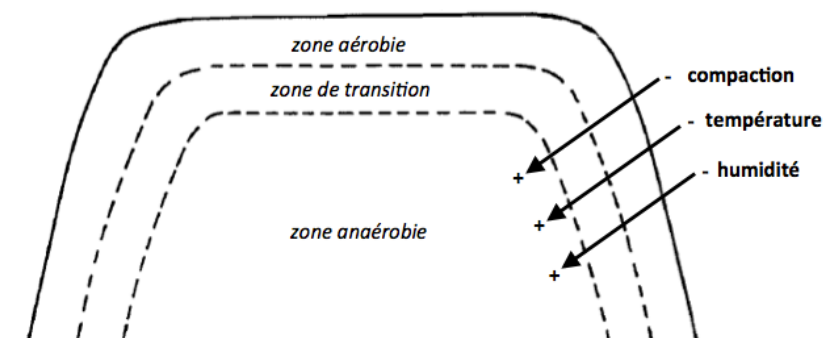
Grâce à ces techniques, des études récentes ont été menées pour explorer les modèles de distribution des communautés microbiennes du sol et étudier les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent ces modèles. Plusieurs études ont rapporté les propriétés du sol comme principaux facteurs structurant les communautés microbiennes du sol. Le pH du sol a été montré comme un prédicteur de la composition des communautés bactériennes (Lauber et al. 2008 ; Rousk et al. 2010), tandis que la composition de la communauté fongique a été plutôt associée aux changements dans l'état des nutriments du sols (Waldrop et al. 2006 ; Lauber et al. 2008). D'autres études ont également rapporté une covariation spatiale entre les communautés végétales et microbiennes (Djukic et al. 2010 ; Yergeau et al. 2010). Nielsen et al. (2010) suggèrent que les communautés fongiques sont plus étroitement associées aux communautés végétales que les bactéries, ces dernières étant plus influencées par les propriétés du sol. En outre, en raison de la rareté des études détaillées comparant directement la distribution spatiales exposées par des bactéries et des champignons, il est difficile de tirer des conclusions solides concernant les similitudes ou différences entre les facteurs environnementaux qui influent sur la composition de ces communautés dans le sol. Finalement, les modèles de structuration et de diversité de ces deux domaines microbiens sont encore une boîte noire (Branco & Ree, 2010).

Ainsi, la caractérisation du potentiel biologique des topsoils et leur variation dans et entre les échelles spatiales et temporelles sont maintenant reconnues comme un indicateur clé dans l'évaluation du potentiel de restauration des communautés végétales (Martinez-Duro et al. 2012). De telles études sont importantes pour optimiser les méthodes de gestion du topsoil et prédire quelles espèces sont peu susceptibles de répondre à la méthode d'épandage de topsoil afin qu'elles puissent être restaurées par d'autres moyens (Van Etten et al. 2014). Une question centrale de la recherche, suggérée par Van Etten et al. (2014),

est de savoir si la séparation du topsoil provenant clairement de différents habitats est utile pour aider à la restauration de la diversité Bêta et des différentes communautés végétales qui étaient présentes avant l'exploitation minière.

### **III.2/ LE STOCKAGE DU TOPSOIL : UN EFFET DEPRESSIF SUR LE POTENTIEL BIOLOGIQUE DE RESTAURATION DES TOPSOILS**

La deuxième connaissance importante liée à l'utilisation des topsoils concerne son stockage. En raison de la logistique d'exploitation minière, l'utilisation du topsoil pour les travaux de restauration ne peut intervenir qu'après l'achèvement de l'exploitation d'un site ; bien qu'il soit possible d'organiser cette pratique pour transférer rapidement un topsoil décapé vers une zone dont l'exploitation est terminée, à condition que les travaux aient commencé depuis quelques années. Il est ainsi souvent constaté que la période entre la récupération d'un topsoil et sa réapplication finale sur un terrain à restaurer peut être très longue. En attendant une utilisation ultérieure, le topsoil est alors récupéré des sites qui vont être impactés et placé en tas pour stockage sur des périodes qui peuvent s'étendre parfois au-delà de 10 ans (Johnson et al. 1991). Cette étape de stockage des topsoils n'est pas sans impacts sur la conservation des potentialités biologiques de celui-ci. Depuis plus de 40 ans, de nombreux auteurs ont rapporté un effet dépressif du stockage sur la conservation des potentialités biologiques de restauration des topsoils, par rapport à un topsoil frais, utilisé en réapplication directe après décapage. Ces observations ont été faites à la fois pour la banque de graines (Koch et al. 2007), les micro-organismes (Stahl et al. 2002), et la fertilité générale des topsoils (Ghose et al. 2012). Elles résultent majoritairement de phénomènes de compaction qui peuvent apparaître au sein des stocks de topsoil, provoquant la mise en place de zone aérobie en surface, d'une zone anaérobie en profondeur, séparées par une zone intermédiaire de transition, en lien direct avec le maintien des caractéristiques biologiques (**Fig. 9**) (Ghose, 2004). La dégradation des potentialités biologiques des topsoils pendant stockage est reconnue pour être continue et finalement totale jusqu'à l'obtention d'un topsoil fortement appauvri, (biologiquement improductif). Dans ces conditions, il peut apparaître difficile d'atteindre les objectifs de restauration des écosystèmes fixés. Toutefois, le développement récent du concept de « durée maximale de conservation » (shelf life period) permet aujourd'hui d'envisager la mise en place d'outils d'évaluation destinés à favoriser la conservation du potentiel de restauration biologique des topsoils pendant stockage (Ghose, 2012).



**FIGURE 9.** Schéma des phénomènes physico-chimiques et de zonations se mettant en place pendant le stockage du topsoil (Ghose, 2001). Les limites entre les zones dépendent de la texture du topsoil et des moyens mécaniques mis en œuvre lors du montage des stocks de topsoils (ibid).

### III.2.1/ DEGRADATION DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES

#### III.2.1.1/ DEGRADATION DU POTENTIEL GERMINATIF DE LA BANQUE DE GRAINES

Les diminutions du nombre d'émergences de plantules et de la richesse spécifique de la banque de graines causées par le stockage des topsoils ont été constatées à travers le monde. Dans une expérience de germinations sur un topsoil des forêts de Jarrah, en Australie occidentale, Koch et al. (1996) ont montré une diminution d'environ 50% du taux de germination après 10 ans de stockage, à une profondeur de 15cm par rapport à un topsoil frais. Toujours en Australie, Rockich et al. (2000) ont trouvé une diminution du nombre de recrutement de 34 et 54% pour des topsoils issus des forêts de Banksia et stockés sur 3m de hauteur pendant 1 et 3 ans respectivement. Des résultats similaires ont été rapportés par Erickson et al. (2010) dans la région de Pilbara en Australie, dans un essai d'enfouissement de semences. Dans leur étude sur les topsoils des grands déserts Australiens, Golos & Dixon (2014) ont montré qu'il y avait une tendance plus faible à la levée des semis (68% de moins) et de la richesse spécifique (30% de moins) pour un topsoil stocké pendant 2 ans en surface, alors qu'aucun changement significatif n'avait été observé la première année. Une observation similaire de lent déclin du nombre de germination en milieu aride a été rapportée par Scoles-Sciulla & DeFalco (2009) pour un topsoil stocké, issu du désert des Mojaves aux USA. Ils ont noté une diminution de seulement 7% après 4 mois de stockage. Dans les forêts japonaises, Hosogi & Matsue (2010) ont montré une diminution de 20% du recrutement après 1 an de stockage d'un topsoil stocké sur une hauteur de 1,5m. A travers un essai d'enfouissement de semences dans un topsoil issu des prairies espagnoles, Rivera et al. (2012) ont montré une réduction de la viabilité des graines de 40% après 6 mois de stockage à une profondeur de 50cm.

Meney et al (1994), Ryckboer et al. (2002) ont montré que la persistance de la banque de graines au sein des stocks de topsoils pouvait être impactée par des



phénomènes de décomposition pouvant se produire en conditions aérobies de surface. De nombreuses études ont également montré que la persistance des semences était liée à la fois au type de dormance et aux conditions de chaleur, d'humidité et d'anaérobiose qui augmentent avec la profondeur et les phénomènes de compaction des stocks de topsoils. Auld (1995), Owens et al. (1995), Tozer et al. (2012) ont montré que la persistance des semences présentant une dormance physique étaient supérieure à celle de semences présentant une dormance transitoire, physiologique, morphologique ou morpho-physiologique. La dormance physique qui attribue aux téguments la capacité d'être imperméables, prévient l'absorption d'eau qui favorise la germination. Murcdoch & Ellis (1992), Pakeman et al. (2012) ont ainsi montré que la longévité des graines était favorisée dans des conditions froides ou sèches présentes en surface des tas de topsoils, alors qu'elle est diminuée en profondeur avec l'augmentation des conditions chaudes et humides, et qui induisent la perte de dormance et/ou la germination de ces semences à des profondeurs non favorables au développement de plantules (Meney et al, 1994 ; Morimoto & Kameyam, 2001 ; Golos & Dixon, 2014). Les espèces ne présentant pas de dormance physique sont donc particulièrement susceptibles de disparaître pendant stockage. La perte de ces espèces pendant le stockage est d'autant plus dramatique que celles-ci sont traditionnellement difficiles à réintroduire lors des travaux de restauration par les techniques traditionnelles.

### III.2.1.2/ DEGRADATION DU POTENTIEL MICROBIEN

De la même façon que pour la banque de graines, un grand nombre d'études ont montré un déclin général de l'activité des micro-organismes associé au stockage des topsoils, en comparaison avec des topsoils frais, qui augmente avec le temps et la profondeur de stockage.

#### III.2.1.2.1/ Dégradation du potentiel bactérien

Au Royaume-Uni, Harris et al. (1989) ont constaté une diminution du nombre d'Unités Formant une Colonie (UFC) et de l'activité microbienne mesurée par ATP, de façon progressive avec la profondeur de stockage d'un topsoil stocké pendant 2 ans. Cette diminution est de 50% en surface et de 75% à 2m de profondeur. Par la technique de fumigation-extraction, Johnson et al. (1991) ont montré que moins de 50% de la population bactérienne initiale persistait à des profondeurs inférieures à 50cm. En Inde, Ghose & Kundu (1998) ont rapporté des valeurs de biomasse de 5 à 8 fois plus basses pour un topsoil stocké par rapport à un topsoil non perturbé, sur des mines de charbon après un an, avec une dégradation continue pendant 6 ans, jusqu'à atteindre une valeur minimale. Aux Etats-Unis,

Stahl et al. (2002) ont observé des résultats similaires à la surface de topsoils stockés sur des mines d'uranium.

#### III.2.1.2.2/ Dégradation du potentiel mycorhizien

Au Royaume-Uni, dans une étude sur le stockage de topsoils de taille, d'âge et d'origines différentes, Abdul-Karrem & McRae (1984) ont montré une diminution continue du Potentiel EndoMycorhizogène (PEM) et de la biomasse microbienne fongique par rapport à des topsoils *in-situ*. Avec une méthode identique, Williamson & Johnson (1990) ont rapporté des valeurs de PEM 2 à 3 fois plus basses dans des topsoils stockés pendant 4 et 12 ans sur une épaisseur de 3m. Par des mesures de biomasses, des résultats similaires ont été signalés par Johnson et al. (1991) et Harris et al (1993) au Royaume-Uni, par Kundu & Ghose (1998) en Inde, par Stahl et al (2002) aux Etats-Unis et Japser et al. (1989) en Australie.

De manière générale, la diminution du potentiel microbien (bactérien et fongique) est observée de façon plus marquée en profondeur des tas de topsoils, où les conditions deviennent de plus en plus anoxiques par rapport à la surface des monticules (Sheoran et al. 2010). Après une stimulation initiale du nombre de bactéries suivant la construction d'un stock de topsoil, Johnson et al. (1991) ont montré une augmentation du nombre de bactéries anaérobies augmentant avec la profondeur, ainsi qu'une augmentation du nombre de bactéries sporulées. Les mêmes observations ont été décrites par Stahl et al (2002), et Ghose (2012). Comme pour la banque de graines, Miller, Carnes et Moorman (1985) ont montré que des conditions anaérobies avaient un effet significatif négatif sur la conservation du PEM. Ces auteurs ont également décrit qu'un taux d'humidité élevée pouvait être néfaste à la conservation du PEM. Celui-ci favoriserait une germination des spores AMF sans qu'elles puissent survivre par la suite du fait de l'absence d'hôte.

Finalement la dégradation du potentiel microbien pendant le stockage des topsoils peut s'avérer problématique pour les travaux de restauration. La perte des micro-organismes symbiotiques (bactéries et champignons) peut empêcher ou retarder le retour d'espèces végétales symbio-dépendantes dont la présence est bénéfique pour la succession végétale (Ghose et al. 2012). Plus globalement, cela peut conduire à une perturbation du cycle des éléments nutritifs et une diminution de leur disponibilité pour les plantes (Stark & Redente, 1987 ; Sheoran et al. 2010).

### III.2.1.3/ DEGRADATION DU POTENTIEL DE FERTILITE CHIMIQUE

Les phénomènes de compaction qui se produisent au sein des stocks de topsoil pendant stockage sont également connus pour entraîner une dégradation du potentiel de fertilité chimique. Les conditions d'anoxie favorisent le développement de bactéries anaérobies et une diminution significative des bactéries aérobies (Stahl et al. 2002 ; Ghose, 2012). Ce phénomène peut inhiber la nitrification due à une mauvaise aération des tas de topsoils et conduit à une accumulation d'ammoniac dans les zones anaérobies. Cela peut poser de graves problèmes lorsque le topsoil stocké est enfin utilisé si les taux d'ammoniac sont trop élevés ; la quantité de nitrates alors générée par les bactéries nitrifiantes est susceptible de dépasser des taux normaux. Il en résulte également un risque plus grand de perte d'azote dans l'environnement par lessivage des nitrates et/ou dénitrification (Johnson & Williams, 1994). Dans leur étude sur des stocks de topsoils allant de 1,5 à 7 années, Abdul-Kareem & McRae (1984) ont corrélé l'augmentation des bactéries anaérobies avec des augmentations d'ammonium, de dioxyde de carbone d'éthylène et de méthane, ainsi qu'avec le fer ferreux et le manganèse extractibles, nocifs aux végétaux. Ces auteurs rapportent également une perte allant jusqu'à 85% de la matière organique présente à l'origine. De tels changements peuvent alors faire obstacle à l'installation d'un couvert végétal lors des travaux de restauration.

### III.2.2/ SHELF LIFE PERIOD, LA CARACTERISATION DU TEMPS DE STOCKAGE D'UN TOPSOIL

Le stockage du topsoil et la préservation de sa qualité sur une période de temps prolongée sont souvent considérés par les acteurs miniers comme une des tâches les plus ardues du processus minier (Ghose, 2012). En conséquence, il n'est pas rare qu'en cas d'impossibilité d'utiliser directement le topsoil dans un cycle décapage-réapplication immédiate, celui-ci ne soit pas pris en compte et soit alors considéré comme stérile minier et finalement perdu car traité comme tel (Ghose, 2012). Compte tenu de l'importance des topsoils pour les travaux de restauration des terrains miniers, et de l'inévitabilité de leur stockage, il est apparu essentiel de mettre en place des outils visant à protéger leur potentiel biologique durant ce stockage. En 2001, Ghose et al. définissent ainsi le concept de « Shelf Life Period » ou durée de conservation maximale, comme la période durant laquelle les pertes des potentialités biologiques des topsoils ne nuisent pas de façon significative aux objectifs de la restauration écologique. Au-delà de cette période, une revalorisation biologique est alors nécessaire pour rétablir une qualité biologique suffisante pour que le topsoil puisse à nouveau complètement jouer son rôle d'outil de restauration écologique. Ce principe vise à sensibiliser les acteurs miniers sur la possibilité de conserver le topsoil et son

intérêt pour la restauration. Ghose préconise ainsi d'intégrer au plan minier un suivi de l'évolution des potentialités biologiques des topsoils pendant leur stockage. Au-delà des faits déjà connus, cet outil donne une nouvelle interprétation de la préservation du topsoil. Il est attendu que les connaissances acquises permettront aux opérateurs miniers de mettre en place, selon leurs objectifs de restauration des stratégies de gestion des topsoils qui leur sont appropriées, selon les pertes biologiques constatées. Les implications de concept de Shelf Life Period sont nombreuses pour la restauration des terrains miniers dégradés et la méthodologie adoptée pour ce type d'étude peut former une ligne directrice pouvant ensuite être appliquée à l'échelle industrielle (Ghose, 2012). Citons comme exemple, le projet « Gorgon Gas Development and Jansz Feed Gas Pipeline », centre d'exploitation de gaz en Australie qui a intégré ce principe à son plan de restauration post-exploitation depuis 2009 (Chevron Australia, 2014).

Ainsi, si une diminution du potentiel biologique de restauration des topsoils apparaît comme inévitable pendant stockage, il apparaît également que des études en amonts d'un stockage à grande échelle pourraient favoriser une meilleure gestion et conservation de ce potentiel. La compréhension des effets du stockage et des mécanismes responsables de la dégradation du potentiel biologique, permettrait alors d'orienter les temps et modes de stockage et les mesures de réajustements nécessaires au retour d'une qualité biologique suffisante pour pouvoir utiliser le topsoil malgré cette étape défavorable.

### **III.3/ REVITALISATION DES TOPSOILS**

Deuxième partie du concept de SHELF LIFE PERIOD présenté précédemment, la revitalisation est une étape importante de la gestion des topsoils pour les travaux de restauration des terrains miniers dégradés (Ghose et al. 2001). Il s'agit de la revalorisation biologique d'un topsoil, rendu infertile (biologiquement improductif) après stockage, en visant à rétablir une qualité biologique suffisante pour que celui-ci puisse à nouveau complètement jouer son rôle d'outil de restauration écologique. Cette étape a pour but de sensibiliser d'avantage les acteurs miniers sur l'intérêt de la conservation du topsoil pour les travaux de restauration malgré l'effet dépressif que peut avoir une période de stockage sur le maintien de leurs potentialités biologiques. En effet, ces effets doivent être considérés dans leur ensemble, dans le cadre de la restauration des terrains miniers dégradés. Par exemple, les impacts négatifs du stockage du topsoil sont relativement mineurs par rapport à la perte complète de celui-ci (Stahl et al. 2002). Rappelons que les travaux de restauration des terrains miniers dégradés se confrontent aux problèmes de réussir à recréer les conditions des sols de surface, le premier facteur essentiel de la restauration étant la nature physico-

chimique du substrat (Ghose, 2001). Les moyens à mettre en œuvre pour la restauration des terrains miniers dégradés nécessitent alors d'améliorer les conditions abiotiques avant de pouvoir procéder aux manipulations biotiques utiles (Hobbs & Harris, 2001). Ainsi, l'utilisation du topsoil, même fortement appauvri par le stockage, résout ce premier problème. Elle améliore les surfaces rendues abiotiques par l'exploitation minière pour les rendre végétalisables en fournissant un substrat physique favorable à la croissance végétale, tout en diminuant les travaux et les coûts de préparation des terrains. Par ailleurs, la formation d'un topsoil étant très lente au regard des générations et des phénomènes de dégradation auxquels il est exposé, celui-ci doit être considéré comme une ressource limitée qu'il convient de protéger.

De fait, les méthodes, voies et moyens de revitalisation des topsoils, pour la restauration écologique ou d'autres domaines (agriculture, sylviculture...), font l'objet d'un intérêt croissant (Séré et al. 2008). Parallèlement, ces méthodes s'appliquent aussi aujourd'hui à la « vitalisation » de milieux de croissance alternatifs aux topsoils, tels que les stériles miniers. La raison étant que malgré les soins apportés à la gestion du topsoil, les terrains miniers à restaurer en manqueront tout de même (Philipps, 1993 ; Sheoran, 2009 ; Zipper et al. 2011). Cela est due à la difficulté qui peut exister à récupérer du topsoil (topsoil trop mince, sur pente...) ou par les phénomènes de compaction pendant stockage qui complique leur réapplication à volume égal.

A ce jour, de nombreux résultats positifs des travaux de revitalisation/vitalisation ont été rapportés à travers le monde, mettant en œuvres différents outils. Toutefois, comme pour les aspects précédents, la littérature rapporte une variabilité de résultats selon les méthodes utilisées et les conditions locales, soulignant la nécessité de la recherche pour définir des méthodes de revitalisation adaptées à chaque contexte.

### III.3.1/ PRINCIPES ET METHODES DE REVITALISATION

De manière générale, topsoils dégradés ou substrat de substitution sont caractérisés par un appauvrissement ou par l'absence de matière organique et d'éléments nutritifs, qui peuvent faire obstacle à l'installation d'un couvert végétal (Stahl et al. 2002 ; Sourkova et al. 2005 ; Walker, 2005). Ils présentent également en général un appauvrissement ou l'absence d'édaphon qui peut conduire à une perturbation du cycle des éléments nutritifs et une diminution de leur disponibilité pour les plantes (Sheoran et al., 2010), et peut empêcher ou retarder le développement d'espèces symbio-dépendantes (Strullu et al. 1999). Les travaux de revitalisation/vitalisation doivent donc répondre à deux exigences : la première est de répondre aux carences en éléments nutritifs afin d'accélérer l'installation des espèces plantées ouensemencées, ainsi que leur croissance et les taux de recouvrement (Ben Feldt

et al. 2001). La seconde est de restaurer les cycles des éléments nutritifs, notamment par l'inoculation de micro-organismes, afin d'assurer la durabilité des systèmes restaurés, et permettre le retour d'espèces symbio-dépendantes (Sheoran et al. 2010).

### III.3.1.1/ REPONSES APPORTEES AUX CARENCES NUTRITIVES

Les réponses apportées aux carences nutritives sont traditionnellement de deux natures : chimique, par apport de fertilisants inorganiques, et biologiques par l'utilisation d'amendements organiques (O'Dell & Claassen, 2009). (i) Les fertilisants inorganiques rassemblent les engrais minéraux produits par l'industrie chimique, ou par l'exploitation de gisements naturels (phosphate, potasse...), qui comportent un ou plusieurs des éléments nutritifs majeurs (N, P, K), tandis que les amendements organiques désignent une matière fertilisante constituée d'une forte teneur en matière organique (>30%). Les amendements organiques sont traditionnellement classés en quatre catégories : les amendements d'origine animale, d'origine végétale, les boues STEP et la tourbe de sphaigne. Les propriétés et caractéristiques de ces amendements sont revues dans O'Dell & Claassen (2009).

Dorénavant, l'utilisation des fertilisants inorganiques est peu recommandée, car peu adaptée à la croissance végétale sur le long terme (O'Dell and Claassen, 2009). En effet, hormis le phosphore, capable de se fixer sur les oxydes de fer présents dans certains sols (cas des sols serpentiniques (L'Huillier et al. 2010)), la majorité des autres éléments (notamment l'azote et le potassium) sont très peu retenus dans les sols en raison d'une déficience de matière-organiques, et sont donc rapidement lixiviés lors d'épisodes pluvieux. Par ailleurs, bien qu'il existe des fertilisants inorganiques à dégradation lente (ex: fertilisants enveloppés d'un polymère biodégradable), leur coût d'utilisation peut s'avérer particulièrement élevé (L'Huillier et al., 2010) et leur durée ne dépasse guère les 18 mois (J.R. Simplot Company, 2008; Scotts Company, 2008). Pour ces raisons, l'utilisation des amendements organiques leur est aujourd'hui préférée. Les amendements organiques permettent une augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs sur le long terme pour la croissance végétale, en fournissant un engrais à libération lente (Tordoff et al. 2000). La matière organique augmente en effet la capacité d'échange cationique (C.E.C) du sol et diminue fortement les phénomènes de lixiviation, favorisant la constitution d'une réserve d'éléments nutritifs (Soltner, 2003). La décomposition graduelle de la matière organique par les phénomènes de minéralisation (microbienne ou non) libère des éléments nutritifs bio-assimilables, améliorant la fertilité globale sur le long terme (Petersen et al. 2003 ; Vieira et al., 2005). Par ailleurs, les amendements organiques ont également été rapportés pour améliorer les propriétés physiques des substrats à revitaliser/vitaliser. Ils améliorent la porosité des substrats (Sort and Alcañiz, 1999), l'infiltration et la capacité de rétention des eaux (Moffet et al., 2005), et leur résistance à l'érosion (Logan, 1992; Ojeda et al. 2008).

Balasdent (1996) rapporte également que les amendements organiques augmentent le pouvoir tampon des sols, permettant de diminuer la biodisponibilité des métaux lourds potentiellement phytotoxiques.

### III.3.1.2/ RESTAURATION DU CYCLE DES ELEMENTS NUTRITIFS

Le rétablissement du cycle des éléments nutritifs, nécessaire à l'autonomie des systèmes restaurés par la restauration des activités microbiennes, est généralement obtenue soit par des apports de topsoils frais (Lindeman et al. 1984 ; Davies et al. 1995 ; Eichberg et al. 2010), soit par la plantation d'espèces inoculées par des champignons mycorhiziens ou des bactéries symbiotiques (Gobat et al. 2010). Cela peut également être réalisé par l'utilisation de graines utilisées en ensemencement, enrobés d'inoculas (Gobat et al. 2010).

L'inoculation de champignons mycorhiziens joue un rôle significatif dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques végétales et la mobilisation des nutriments au bénéfice de la plante hôte (Lambers et al. 2008 ; Gobat et al. 2010). Elle jouent également un rôle clef dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes en intervenant significativement dans la coexistence des plantes, améliorant ainsi la productivité et le fonctionnement des substrats et des écosystèmes restaurés (van der Heijden et al. 1998a,b ; Sanon et al. 2006 ; Kisa et al. 2007). En effet l'inoculation de champignons mycorhiziens lors de la revitalisation, vitalisation constitue un réservoir de propagules facilitant l'infection de jeunes plants, et donc leur survie (Simard & Durall, 2004). Par ailleurs, l'établissement de la symbiose mycorhizienne a également un effet qualitatif et quantitatif sur la structure de la microflore globale du sol en privilégiant en particulier la multiplication de micro-organismes saprophytes présentant des propriétés bénéfiques pour le développement des plantes et le cycle des éléments nutritifs (Johansson et al. 2004). L'inoculation bactérienne permet d'enrichir le sol en azote, élément rare dans les milieux miniers, et est donc d'une grande importance pour la revitalisation des topsoils afin d'y stimuler le cycle de l'azote (Gobat et al. 2010).

### III.3.2/ BILAN DES TRAVAUX DE REVITALISATION/VITALISATION REALISES

De nombreux travaux rapportent aujourd'hui l'efficacité des techniques de fertilisation et d'inoculation, seules ou en combinaison, pour la revitalisation/vitalisation de substrats miniers, et leur intérêt à promouvoir l'installation pérenne d'un couvert végétal diversifié à travers de nombreux écosystèmes et dans de nombreux pays. Dans leur étude sur la vitalisation de stériles miniers de mines de charbon de Corée du Sud, Lee et al. (2012) ont montré que l'utilisation d'amendements organiques a permis d'augmenter significativement les taux de colonisation racinaires par des champignons endomycorhiziens, impliquant des

effets positifs sur la croissance végétale. Sur des mines de charbon en République Tchèque, Puschel et al. (2008) ont montré que la présence de plants inoculés par des champignons endomycorhiziens favorisait une infection rapide des plants alentour, mais également la diversité végétale. Sur des mines des charbons du Montana (USA), Gitt & Dollhopf (1991) ont montré que l'utilisation d'amendement végétaux (résidus de bois) favorisait à la fois la croissance et la germination des plantes. Dans un essai de revitalisation de topsoil dégradé par le stockage et de vitalisation de stériles miniers sur une mine d'or du Colorado (USA), Sydnor & Redente (2002) ont montré que l'utilisation de Boues de station d'épuration, et de compost inoculé par des mycorhizes favorisaient la biomasse aérienne des plants. Leurs résultats soulignent également une amélioration des conditions de structure et de capacité de rétention des sols. Travaillant sur des mines de cuivre du Canada, Gardner et al. (2012) ont rapporté une relation linéaire entre les taux d'application de boues de station d'épuration (50 à 250 tonnes.ha<sup>-1</sup>) et les taux observés de croissance végétale. De même, Brofas et al. (2000), dans des essais de vitalisation de stériles de mines de bauxite en Australie, rapportent une augmentation graduelle de la densité, de la biomasse et de la couverture foliaire, corrélativement à des apports de boues de station d'épuration de plus en plus importants (variant de 0 à 120 tonnes.ha<sup>-1</sup>).

Toutefois, il apparaît également à travers la littérature que les performances des moyens mis en œuvre pour la revitalisation/vitalisation de substrats édaphiques varient selon l'origine (animale ou végétale) des amendements organiques, mais aussi en fonction de facteurs biotiques et abiotiques (caractéristiques physico-chimiques des sols, caractéristiques du couvert végétal...). Dans des essais de vitalisation de stériles miniers dans la région d'Alberta (Canada), Dimitriu et al. (2010) ont rapporté que la structure des communautés microbiennes établies dépendait de la nature des substrats, et des apports en matière organique liés au couvert végétal qui s'y développe. Dans leur travaux, Lee et al. (2012) ont montré que l'utilisation d'amendements organiques pouvait entraîner une diminution des taux de colonisation de certaines espèces ectomycorhiziennes. Puschel et al. (2008) a rapporté que le potentiel AMF des sols peut être diminué par la présence d'espèces végétales non mycotrophes, capables par leurs exsudats racinaires de supprimer la germination des spores, ou de faire obstacle au développement du mycélium. Gardner et al. (2012) rapportent que les effets de l'application d'amendements organiques ou de fertilisants inorganiques varient selon la texture du substrats sur lequel ils sont appliqués. Brofas et al. (2000) rapportent un effet diminuant après 4 ans d'application des boues de station d'épuration sur les taux observés de croissance végétale. De plus, leurs résultats soulignent que l'application des volumes trop important de boues peut conduire à une contamination du milieu par des métaux lourds.

Ainsi, bien que souvent performantes, le choix et l'utilisation des techniques de



revitalisation/vitalisation de substrats édaphiques doivent donc être réalisés en fonction de leurs propriétés, de leur disponibilité à l'échelle locale, mais également des objectifs finaux de restauration (Zipper et al. 2011). En outre, Kelly (2006) soulignent que le choix des techniques repose principalement sur leur disponibilité et les coûts associés à leur utilisation (particulièrement le transport). Des recherches sur les méthodes adaptées au contexte local doivent donc être menées afin de garantir le succès à long terme des travaux de restauration (Zipper et al. 2011).

#### **IV/ ETAT DES CONNAISSANCES EN NOUVELLE-CALEDONIE SUR L'UTILISATION DE TOPSOILS EN RESTAURATION ECOLOGIQUE**

En Nouvelle-Calédonie, l'utilisation des topsoils ne date que des années 2000. Les connaissances actuelles locales liées à cet outil sont encore fragmentaires, parfois internes aux compagnies minières. En outre, les caractéristiques des topsoils, tout comme les résultats obtenus lors de leur utilisation en restauration sont hétérogènes, ce qui n'encouragent pas assez à leur utilisation (L'Huillier et al. 2010). Les inconvénients majeurs résident dans le manque fréquent d'un topsoil de qualité, et dans la difficulté de sa manipulation pour qu'il conserve ses qualités. Pourtant, scientifiques et compagnies minières s'accordent à dire que des efforts sont à faire sur le recyclage des topsoils. Ils n'ont certes pas de valeurs marchandes mais ils sont au cœur des problèmes de restauration écologique. Soulignée dès 2003, lors du colloque international « Préservation et restauration écologique en milieu tropical minier » de Nouméa (Amir et al. 2003), l'importance de poursuivre les recherches fondamentales sur les topsoils a été récemment renouvelée lors de la conférence de la Society for Ecological Restoration Australasia (SERA) de Nouméa en 2014.

Cette volonté affichée s'est traduite par la mise en place de deux projets de recherches centrés sur la compréhension du fonctionnement des topsoils et leur gestion lors de l'exploitation minière. Le projet Ecomine Biotop, financé par le CNRT « Nickel et son Environnement », associe différents acteurs scientifiques du territoire, tels que l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), l'Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), ainsi que des partenaires de France métropolitaine. Mis en place en 2010, ce projet intitulé « caractérisation et fonctionnement du système sol/plante/microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d'application à la restauration écologique », s'est orienté sur l'étude de topsoils de massifs miniers du Sud de la Nouvelle-Calédonie. Cette thèse est le second projet de recherche et associe également l'UNC, l'IAC et l'IRD comme acteurs scientifiques et Koniambo Nickel SAS (KNS) comme

partenaire industriel. Mis en place en 2012, cette étude porte sur la caractérisation de topsoils associés à un massif du Koniambo, situé au Nord du territoire. Les conclusions de ces études seront complémentaires et devraient permettre d'adapter les itinéraires techniques associés à l'utilisation des topsoils au contexte local et d'en optimiser les bénéfices pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés. Les orientations communes de ces deux études portent notamment sur l'évaluation des caractéristiques du potentiel biologique des topsoils, leur évolution pendant stockage et l'effet de différentes techniques d'amendement, de fertilisation, et d'inoculation de micro-organismes sur la dynamique de fertilité des topsoils.

#### **IV.1/ TYPOLOGIE DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS**

Les substrats ultramafiques néo-calédoniens abritent de nombreuses formations végétales, parfois sur des surfaces relativement restreintes (L'Huillier et al. 2010). Par exemple, onze formations végétales distinctes ont été recensées à l'intérieur des 14 000 hectares concernés par la zone d'exploitation du projet minier de Koniambo Nickel SAS. Mais cette diversité s'observe pour la majorité des projets miniers du pays. La diversité des formations végétales observée dans le pays, s'explique par les variations importantes des caractéristiques chimiques et physiques des sols, de la topographie, de la pluviométrie, de l'altitude (du niveau de la mer à 1618m) et des stades d'évolution ainsi que de l'isolement géographique de plusieurs massifs favorisant des phénomènes de spéciations allopatriques (Jaffré, 1992). Un des défis de la restauration écologique des terrains miniers de Nouvelle-Calédonie est de parvenir à recréer la complexité des écosystèmes miniers avant exploitation, à la fois dans leur diversité intra et inter-communautaire. Comme décrit dans la première partie de cette synthèse bibliographique, le potentiel biologique des topsoils joue un rôle déterminant dans la restauration des communautés végétales. La caractérisation du potentiel biologique des topsoils et leur variation dans et entre les échelles spatiales et temporelles sont alors des étapes clés dans l'évaluation du potentiel de restauration de la diversité des communautés végétales. A l'heure actuelle, peu d'études de ce genre ont été menées sur le territoire, et les inconvénients liés à l'utilisation du topsoil résident d'abord dans le manque fréquent d'un topsoil de qualité. Par ailleurs, les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des topsoils de Nouvelle-Calédonie étaient encore récemment peu appréhendées (Amir et al. 2009). Il importe ainsi de savoir si la séparation de topsoils provenant d'habitats clairement différents pourrait aider à recréer la répartition spatiale des types de végétation qui étaient présents avant l'exploitation minière.

A ce jour, plusieurs études tendent à démontrer l'influence du couvert végétal sur la distribution de potentiel de la banque de graines. Dans des expériences de germinations en

serre visant à comparer le potentiel germinatif de la banque de graines de topsoils associés à différents types de maquis (maquis arbustif, ligno-herbacé et paraforestier), Ruiz (2006), et Goxe (2010) ont démontré que la quantité et la composition de la banque de graines contenue dans les topsoils varie fortement selon l'origine du topsoil et les formations végétales associées. Ces différences peuvent aller de 0 à 10 000 graines par m<sup>2</sup>, avec une richesse spécifique variant de 0 à plus de 130 espèces, variant notamment selon la richesse spécifique en Cyperaceae des formations végétales en place (Amir et al. 2009). Dans le cadre du projet Biotop, les travaux de L'Huillier & Fogliani (2014) tendent eux à souligner un effet saisonnier de la récupération des topsoils, sur le potentiel germinatif de la banque de graines.

S'agissant de la microflore, les connaissances des modèles de distribution spatiale des communautés microbiennes des substrats ultramafiques du territoire sont également encore très partielles. De nombreuses études ont porté sur le rôle des micro-organismes symbiotiques pour la croissance végétale telles que les bactéries rhizosphériques fixatrices d'azote (Jaffré et al. 1994), les associations endomycorhiziennes (Lagrange et al. 2011; Amir et al. 2013, Gensous, 2014) ou les champignons ectomycorhiziens (Jourand et al. 2014b), alors que peu d'études existent sur les champignons saprophytiques. Par des PCR nichées, les travaux de Prin et al. (2012), et de Jourand et al. (2014a) et plus généralement ceux du projet Biotop (2014), ont montré une importante diversité des champignons ectomycorhiziens (ECM) en termes de genres rencontrés, mais également une importante diversité des champignons endomycorhiziens. En utilisant la technique d'Amplification aléatoire d'ADN polymorphe, les travaux de Lenczewski et al. (2009) ont montré une augmentation de la diversité des communautés microbiennes le long d'un gradient de succession végétale. Plus tôt, dans leurs travaux Ruiz (2006) et Goxe (2010) rapportaient une variation du nombre des densités des spores endomycorhiziennes selon la densité du couvert végétal en place.

L'ensemble de ces études et les résultats obtenus ont permis d'envisager des perspectives de gestion des topsoils pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés du territoire, cependant, elles ont aussi laissé plusieurs interrogations. En effet, ces études n'ont pas permis de quantifier l'influence des facteurs édaphiques, floristiques ou leur interaction sur la distribution du potentiel germinatif, ou microbien des topsoils. Ces études se sont aussi principalement basées sur la comparaison de différents maquis répartis sur des massifs ultramafiques du Sud du territoire néo-calédonien. En outre, vu la rareté des études détaillées comparant directement les configurations spatiales exposées du potentiel séminal et microbien (bactéries et des champignons), il est difficile de tirer des conclusions solides concernant les similitudes ou différences entre les facteurs environnementaux qui influent sur la composition des différentes potentialités biologiques de restauration des topsoils.

## IV.2/ LE STOCKAGE DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS

Le second aspect des topsoils néo-calédoniens, nécessitant d'améliorer les connaissances locales se rapporte à leur stockage. En effet, la Nouvelle-Calédonie est aujourd'hui dans une phase de développement minier sans précédent devant aboutir à une extraction annuelle de 16 millions de tonnes de minerais humides de nickel à l'horizon 2013-2015 contre 7 en 2010 (L'Huillier et al. 2010). Cette augmentation de la production est liée à l'arrivée de nouveaux opérateurs, ce qui conduit à l'ouverture de nouvelles zones d'exploitation et par conséquent par l'excavation de nouvelles zones d'exploitations minières. Les volumes de topsoils générés à court terme seront, et sont déjà, dans certains cas, supérieures aux besoins immédiats pour les travaux de restauration (c'est notamment le cas pour KNS). Comme énoncé plus haut, l'utilisation du topsoil pour les travaux de restauration ne peut intervenir qu'après l'achèvement de l'exploitation d'un site. Le stockage des topsoils est alors une étape indispensable de leur gestion. De même que cela a été décrit précédemment à l'échelle internationale, plusieurs études ont montré localement un effet dépressif du stockage des topsoils sur la conservation de leurs potentialités biologiques. Il n'est alors pas rare qu'en cas d'impossibilité d'utiliser directement le topsoil dans un cycle décapage-réapplication immédiate, celui-ci ne soit pas pris en compte et soit alors considéré comme stérile minier et finalement perdu car traité comme tel. A travers la bibliographie, il apparaît désormais possible de mettre en œuvre des outils visant à protéger le potentiel biologique de ces topsoils durant le stockage (Ghose, 2012). Cela passe par l'acquisition des connaissances des mécanismes qui influencent l'évolution des potentialités biologiques des topsoils.

Sur le territoire, dès 1995, Pelletier & Esterle, et plus récemment Ruiz (2006), ont rapporté de plus faibles densités de germinations ainsi que de plus faibles richesses spécifiques de la banque de graines des topsoils pour des tas inférieurs à 2m, d'âge et d'origine différents par rapport à un topsoil frais. Toutefois, dans ces deux études, un manque d'information sur les stocks de topsoils (épaisseur et saison de décapage, conditions de montage...) n'a pas permis de tirer de conclusions définitives. Plus récemment, les travaux menés dans le cadre du projet Biotop ont permis d'apporter de nouvelles réponses. Leur étude visait à suivre l'évolution pendant stockage de deux topsoils d'origine distinctes (associé à une formation de maquis ligno-herbacé et paraforestier), selon deux conditions de stockage (andain-hauteur des tas de 2m, et étalé, hauteur de tas de 50cm). Leur résultats ont montré une conservation du pouvoir de germination après 36 mois de la majorité des espèces à graines dormantes. Concernant les graines non dormantes, les résultats semblent indiquer une meilleure conservation en conditions sèches, pouvant aller jusqu'à 24 mois. Les résultats tendent également à indiquer l'absence d'effet profondeur sur la conservation du potentiel germinatif.

Concernant la composante microbienne, les résultats du projet Biotop montrent une diminution importante de spores AMF dès le 3<sup>e</sup> mois, ainsi qu'une meilleure conservation en surface des tas de topsoils. De même, ces travaux rapportent de fortes baisses des densités bactériennes, notamment après 12 mois de stockage.

Ces résultats, bien qu'améliorant nos connaissances, restent peu nombreux à l'heure actuelle, et doivent impérativement être complétés. D'une part, les résultats de ces études sont difficilement applicables à l'échelle d'une exploitation minière. Les dispositifs expérimentaux mis en place dans ces études ont parfois été éloignés des contraintes du terrain. Elles ont souvent été menées sur de petits volumes de topsoils stockés et parfois mis en place dans des conditions idéales, faisant intervenir des engins légers pour la construction des stocks de topsoil. D'autre part, peu de recherches ont été effectuées sur la méthode la plus appropriée pour le stockage des topsoils en vue d'optimiser la conservation de leurs potentialités biologiques. Les pratiques de stockage actuelles envisagent un stockage sous forme de verse (ce mode de stockage fait référence auprès des exploitants miniers calédoniens depuis maintenant trente ans pour la gestion des stériles miniers et tendrait à s'appliquer au topsoil), mais l'évolution des potentialités biologiques au sein de ces structures, ainsi que les facteurs qui interviennent sur leur conservation sont inconnus. Ainsi, de nombreuses questions de recherches quant à l'évolution des potentialités biologiques des topsoils néo-calédoniens restent encore à traiter.

### **IV.3/ REVITALISATION DES TOPSOILS NEO-CALEDONIENS**

Enfin, il est essentiel dans le contexte local, de développer des outils de revitalisation des topsoils dont le potentiel biologique de restauration pourrait être dégradé par les phases de stockages inhérentes à leur gestion. Pour cela, les travaux de recherche s'orientent aujourd'hui vers une revalorisation biologique du topsoil afin de leur permettre de retrouver un potentiel de restauration favorable au retour durable d'un couvert végétal.

Ces travaux font de plus en plus l'objet de recherches en Nouvelle-Calédonie, et l'apport d'amendements organiques, notamment les boues de station d'épuration (boues de STEP), constitue la solution la plus testée (Laroche 2011 ; Velayoudon, 2014 ; Amir et al. 2014). Dans une étude initiée en 2008, l'application de boues de STEP sur topsoil a mis en évidence une augmentation significative de la croissance de nombreuses espèces pionnières de maquis miniers telles *Alphitonia neocaledonica*, *Austrobuxus carunculatus* (Laroche, 2011). Toujours en 2008, Velayoudon a rapporté des effets similaires des fientes de poules et des boues de STEP pour la revitalisation de stériles miniers, sur la croissance de trois espèces indigènes des maquis miniers néo-calédoniens (*Gymnostoma deplancheum*, *Grevillea exul rubiginosa* et *Carpolepis laurifolia*). Dans un autre essai, mené

sur cinq années, Velayoudon et al. (2014) ont testé l'application de différentes masses de boues de STEP sur la régénération naturelle des topsoils issus de plantation de pins (*Pinus caribaea*). Leurs résultats ont montré que de faibles apports favorisaient la diversité végétale, mais entraînait une biomasse aérienne faible. A l'inverse, ces travaux ont également rapporté, que des apports de boues plus importants tendaient à diminuer la diversité végétale et la germination mais, favorisaient un accroissement de la biomasse des plants. Dans le cadre du projet Biotop (2014) des essais de revitalisation de topsoil dégradé ont été menés afin d'évaluer l'apport relatif d'une inoculation contrôlée avec des souches fongiques sélectionnées (Jourand et al. 2014), en termes de croissance et d'adaptation des plantes aux maquis miniers et les effets de synergie possible avec un apport de boues de STEP. Les résultats ont montré des effets très importants de l'inoculation endomycorhizienne sur la croissance, la nutrition minérale et l'adaptation au milieu. De plus, les résultats combinant « inoculation en AMF + Boues de STEP » ont montré une biomasse végétale plus de 7 fois supérieure à celle du témoin.

L'ensemble des résultats obtenus apporte de nombreuses informations permettant d'envisager le développement d'outils pertinents de revitalisation des topsoils dégradés. Toutefois, les travaux mettant en œuvre l'utilisation de boues de STEP n'ont recueilli aucune information quant à une possible augmentation des teneurs en éléments tels que des métaux lourds, qui peuvent être toxiques pour les végétaux. Ainsi d'autres recherches sur l'utilisation des boues de STEP sont encore à mener. Par ailleurs, il est également envisagé pour la revitalisation des sols dégradés, l'utilisation d'autres types d'amendements organiques disponibles sur le territoire tel que les amendements organiques d'origine végétale tels que le compost mais aussi les algues marines (notamment les sargasses) (Laroche, 2011). Mais l'utilisation de tels amendements organiques à l'échelle de l'industrie minière reste soumise à leur disponibilité. Là encore, des recherches sont à mener, mais sont à mener également de façon plus globale afin d'identifier les combinaisons de facteurs les mieux adaptés à revitaliser un sol, selon leur disponibilité, les résultats obtenus et les objectifs de restauration fixés (Laroche, 2011).



**CHAPITRE 1**

**ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES**

**TOPSOILS**





## I/ INTRODUCTION

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, un des défis des travaux de restauration des terrains miniers dégradés est de parvenir à recréer la complexité des écosystèmes miniers avant exploitation, à la fois dans leur diversité végétale, intra et inter-communautaire (Etten, van et al. 2014). Dans cette perspective, de nombreux travaux mettant en œuvre l'outil topsoil, ont rapporté, à travers le monde, une variation du potentiel biologique de restauration de celui-ci selon différentes échelles spatiales et temporelles, et son rôle dans le déterminisme des communautés végétales restaurées (Fenner & Thompson, 2005). Il est aujourd'hui reconnu que l'évaluation du potentiel germinatif de la banque de graines des topsoils, comme la compréhension des modèles de distribution des communautés microbiennes sont des étapes essentielles à la mise en place de mesure de gestion des topsoils adaptées à la restauration écologique de la diversité des communautés végétales (Martinez-Duro et al., 2012 ; Richardson et al., 2012 ; Yu et al., 2012). Une question centrale de ces recherches, comme suggérée par Van Etten et al. (2014), est de savoir si la séparation des topsoils en fonction de leur potentiel biologique est utile pour aider à la restauration de la diversité des différentes communautés végétales présentes avant l'exploitation minière.

En Nouvelle-Calédonie, les connaissances actuelles liées aux caractéristiques du topsoil sont encore fragmentaires (L'Huillier et al. 2010). En dépit des informations existantes, le degré de sélectivité possible/nécessaire, les avantages réels et la faisabilité pratique d'une gestion séparée des topsoils restent à déterminer par la recherche. Plusieurs questions se posent alors, notamment sur les paramètres de distribution des potentialités biologiques des topsoils, et sur les caractéristiques de celles-ci en fonction de leur situation dans le paysage (effet du type de sol, de la végétation...) et leurs implications pour la restauration écologique des écosystèmes. Pour répondre à ces questions, ce premier temps de recherche a pour objectif de caractériser la distribution des potentialités biologiques des topsoils (potentiel microbien, potentiel de fertilité chimique, potentiel séminal) à travers un paysage ultramafique en mettant l'accent sur les relations avec le couvert végétal et le substrat édaphique.

Six topsoils provenant de six formations végétales différentes, distribuées le long d'un gradient de succession végétales différentes ont été comparés. Il s'agit d'un maquis dominé par *Araucaria montana*, un maquis arbustif dominé par *Tristaniopsis guillainii*, un maquis ligno-herbacé dominé par *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* et *Costularia spp.*, un maquis para-forestier dominé par *Tristaniopsis callobuxus*, et de deux formations forestières

respectivement dominée par *Nothofagus codonandra* et *Nothofagus balansae*, et par *Cocconerion minor* et *Dacrydium balansae*. Pour chacune de ces formations végétales, la caractérisation des communautés microbiennes (bactériennes et fongiques) des topsoils a été étudiée grâce à une approche métagénomique, utilisant le micro-séquençage de régions codes-barres (barcoding) en combinaison avec des amorces taggées. La caractérisation de la banque de graines des topsoils a été évaluée au cours d'expériences de germination par lesquelles le potentiel germinatif est suivi via l'identification et le dénombrement des plants émergés, lors d'expérience en serres. Pour évaluer la variabilité spatiale de ces deux composantes et l'influence du couvert végétal ou du substrat, des inventaires floristiques et des analyses physico-chimiques ont été réalisés au sein de chaque formation végétale.

Les résultats de ce premier temps de recherche ont été rédigés sous forme de publication scientifique. Les résultats métagénomiques ont été soumis à la revue *Molecular Ecology* dans un article intitulé, « Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenomic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits ». Les résultats liés au potentiel germinatif des topsoils ont été soumis à la revue *Restoration Ecology* dans un article intitulé, « Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia ». Ce chapitre présente donc ces deux articles l'un après l'autre. Enfin, une conclusion générale reprend les principaux résultats de ce chapitre et présente les perspectives d'application à la restauration de la diversité végétale des terrains miniers après exploitation du nickel.

**Title:** Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits

**Authors:** Bordez L<sup>1,2</sup>, Jourand P<sup>3</sup>, Ducouso M<sup>4</sup>, Carriconde F<sup>5</sup>, Cavaloc Y<sup>1</sup>, Santini S<sup>6</sup>, Claverie J.M<sup>6</sup>, Wantiez L<sup>1</sup>, Leveau A<sup>2</sup>, Amir H<sup>1,\*</sup>

**Author affiliations:**

<sup>1</sup>Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE), BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>2</sup>Koniambo Nickel SAS (KNS), BP 696, 98860 Koné, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup>IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM, UMR040), TA A-82/J, 34398 Montpellier cedex 5, France.

<sup>4</sup>CIRAD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM, UMR082), TA A-82/J, 34398 Montpellier cedex 5, France.

<sup>5</sup>Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), BPA5, 98848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

<sup>6</sup>Laboratoire Information Génomique et Structurale (IGS), UMR7256 CNRS, Aix-Marseille Université, 13288, Marseille cedex 09, France.

**Keywords:** metagenetic, microbial communities, topsoil, ultramafic ecosystems

**\*Corresponding author.** Hamid Amir. Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE), Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), BP R4, Avenue James Cook, Nouméa 98851, Nouvelle-Calédonie. Tel. +687 29 02 72; Fax. +687 25 48 29; E-mail hamid.amir@univ-nc.nc

**Running title:** microbial community patterns in ultramafic system

## Summary

Microbial species richness and assemblages across ultramafic ecosystems were investigated to assess the relationship between their distributional patterns and environmental traits. The structure of microorganism communities in the Koniambo massif, New Caledonia, was investigated using a metagenetic approach correlated with edaphic and floristic factors. Vegetation cover and soil properties significantly shaped the large phylogenetic distribution of operational taxonomic unit within microbial populations, with a mean per habitat of 3,477 ( $\pm 317$ ) for bacteria and 712 ( $\pm 43$ ) for fungi. Using variance partitioning, we showed that the effect of aboveground vegetation was the most significant descriptor for both bacterial and fungal communities. The floristic significant predictors explained 43% and 43% of the variation of the bacterial and fungal community structures, respectively, while the edaphic significant predictors explained only 32% and 31% of these variations. These results confirm the previous hypothesis, which reported that the distribution of microorganisms was more structured by the vegetal cover rather than the edaphic characteristics and that microbial diversity is not limited in ultramafic ecosystems.

Microorganisms play a key role in ecosystems. They connect plants and soil and provide environmental services such as biogeochemical cycling and soil fertility (Gobat *et al.*, 2010). For instance, mycorrhizae are crucial for plant phosphate (P) uptake and may affect other elements as well as the water balance (Smith *et al.*, 2011). Rhizospheric bacteria are a major source of input of atmospheric nitrogen (N) into terrestrial ecosystems (Gage, 2004) and regulate plant growth (Frankenberg and Arshad, 1995). Identifying the causes behind the spatial distribution patterns of microbial communities is crucial to anticipating ecosystem responses to global changes (Singh *et al.* 2010), monitoring their responses to these changes (McHugh *et al.*, 2014), and facilitating their restoration, if necessary (Yu *et al.*, 2012). To understand microbial contributions to plant phenotypes and community dynamics, the first step is to identify which microbes are present and how abundant they are. Due to limited techniques, answers to these questions have remained incomplete over the past few decades. However, recent technical progresses have made these problems more easily tractable, in particular with the democratization of large-scale metagenetic analyses (Smith and Peay, 2014).

Based on these techniques, recent studies were conducted to explore the distributional patterns exhibited by soil microbial communities and the biotic and abiotic factors driving them. Numerous studies have reported soil properties as the main forces shaping the composition of microbial communities. Soil pH has been shown to be the best predictor of bacterial composition (Lauber *et al.*, 2008; Rousk *et al.*, 2010), whereas the composition of fungal communities was mainly governed by changes in soil nutrient status (Waldrop *et al.*, 2006; Lauber *et al.*, 2008). Spatial co-variation between the plant communities and microbial communities has also been reported (Yergeau *et al.*, 2010; Zinger *et al.*, 2011). Furthermore, a recent study suggested that fungi are more closely associated with plants than are bacteria, themselves being more influenced by soil properties (Nielsen *et al.* 2010). However, most of

these studies did not identify the relative contribution of soil properties or plant cover to the spatial patterning of soil microbes. Moreover, the paucity of detailed studies directly comparing the spatial patterns exhibited by soil bacteria and fungi does not allow robust conclusions regarding the similarities or differences in the environmental factors shaping the composition of these communities. Finally, the pattern of structure and diversity of these two microbial domains remains largely unknown.

Ultramafic soils are derived from submarine rock forming the mantle and oceanic crust that became stranded on the continental crust during the process of subduction. These soils are characterized by low concentrations of major plant nutrients (N, P, K), poor water retention, an unbalanced Ca/Mg ratio and high levels of heavy metals, such as nickel (Ni), chromium (Cr), manganese (Mn) and cobalt (Co) (Harrison and Rajakurana, 2011). This unusual and challenging chemistry strongly restricts vegetation growth and select for metal-tolerant populations (Whiting *et al.*, 2004). Ultramafic soils often occur as discontinuous "island-like" areas, truly "unearthly" in their appearance, that form striking boundaries with neighboring soils (Davies *et al.*, 2005). Ultramafic soils have given rise to spectacular levels of endemism among both flora (Chiarucci and Baker, 2007) and fauna (Sadler *et al.*, 2009). These soils constitute a model system for understanding mechanisms of adaptation, ecotypic differentiation, and the linkage between natural selection and speciation (Harrison and Rajakurana, 2011). In the unfavorable ultramafic soil conditions, numerous studies have reported the critical role of microbial communities in the enhancement of the survival and vigor of plants and through the improvement of plant tolerance to metals (Vogel-Mikus *et al.*, 2006; Rajkumar *et al.*, 2009). In addition, the presence of specific microbial symbionts is essential for some plants (Strullu *et al.*, 1999). In recent years, the ultramafic metal-resistant bacterial communities associated with the roots of serpentine-endemic hyperaccumulating plants received a great deal of attention for their potential exploitation in phytoremediation



processes (reviewed in Rajkumar *et al.*, 2009). Similarly, a large body of works characterized a portion of the fungal population of ultramafic systems, and there are many comparative ecophysiological studies dealing with serpentine/non-serpentine ecotypes of the same plant species (Schechter and Bruns, 2012). However, Mengoni *et al.* (2009) and Wettberg and Wright (2011) emphasized the lack of knowledge on the diversity and structure of ultramafic microbial populations, which precludes an understanding of their evolutionary dynamics and the role of interactions with serpentinophytes. To our knowledge, no comprehensive study of the patterns exhibited by fungal and bacterial ultramafic communities at the scale of the vegetation group has yet been conducted.

New Caledonia is a biodiversity hotspot where endemic ecosystems have evolved (Myers *et al.*, 2000) and a hotspot of metallophytic flora (Whiting *et al.*, 2004). In this South Pacific Ocean archipelago, ultramafic ecosystems cover one-third of the main island and provide a unique opportunity to assess the factors affecting the spatial patterning of microbial communities, as steep environmental gradients cause abrupt changes in plant species over short distances (Jaffré and L'Huillier, 2010). In these soils, a specific flora (Jaffré and L'Huillier, 2010) as well as adapted fungi and microorganism populations have been reported (Amir and Ducouso, 2010). However, little work has been done on New Caledonian microorganisms until fairly recently (L'Huillier *et al.*, 2010). To date, researches focused on the role of symbiotic microorganisms in plant growth, such as N-fixing rhizospheric bacteria (Jaffré *et al.*, 1994) and arbuscular mycorrhizal (Lagrange *et al.*, 2011; Amir *et al.*, 2013) or ectomycorrhizal fungi (Jourand *et al.*, 2014), whereas little is known about saprophytic fungi. In the present study, we hypothesize i) that the ultramafic ecosystems does not limit the microbial diversity and ii) that the distribution of microorganisms is more structured by the vegetal cover rather than the edaphic characteristics. We assessed the influence of vegetation cover and soil properties on the assemblage of microbial communities across six habitat types

in ultramafic ecosystems. Using metagenetic data, we determined the abundance, taxonomic diversity and composition of the microbial communities across the New Caledonian ultramafic system of the Koniambo massif. Understanding the microbial community composition and dynamics in these ultramafic soils may lead to a better understanding of the processes facilitating vegetation succession from shrub land to forest on these high-metal substrates and provide useful information to guide vegetal restoration attempts following nickel mining.

## **Materials and methods**

### **Sites description and sampling**

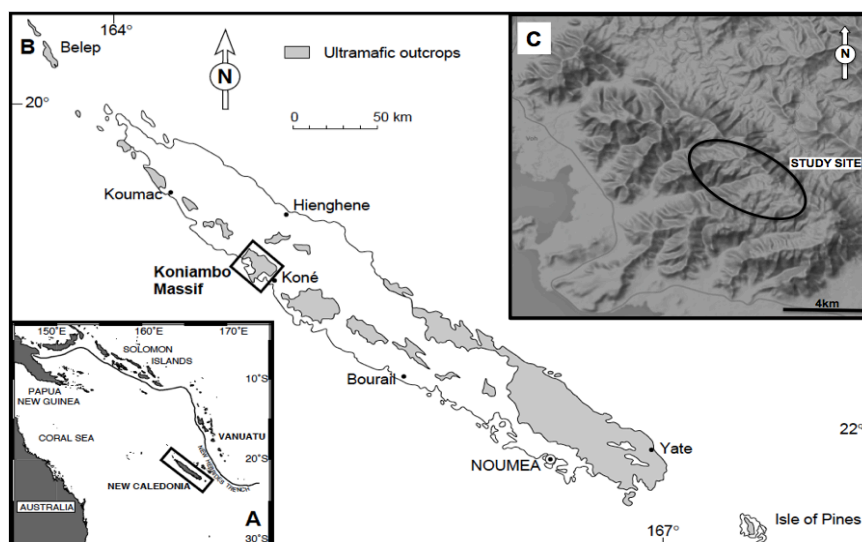
The study area is located in the northern province of New Caledonia on the Koniambo massif (20°56'08"S, 164°43'55"E; altitude 460-930 m) (Fig. 1). This site has been used several times to study models of New Caledonian ultramafic substrates (Perrier, 2005). The mean annual precipitation is 957 mm (range per month: 45-270 mm), with a dry season from May to September. The mean minimum and maximum temperatures are 14°C and 22°C, respectively. The dominant soil units are ferralitic soil (Perrier, 2005).

In this area, we investigated the microbial communities of six types of topsoil, each one associated with specific vegetation communities and thus considered as distinct habitats. These habitats represent different stages of plant succession. A detailed description of each habitat can be found in Table 1. A detailed diagram of the complete material and method is given in Table S1. A total of 36 soil samples were collected, corresponding to six replicates per habitat, as following.

In each habitat, six plot replicates (10 x 10 m) were randomly chosen (Dagnelie, 2012). Within each plot, a total of 12 systematically distributed cores were collected using an auger (D= 5 cm; h= 15cm). This sampling depth allowed access to the major portion of plant

fine roots and microorganisms within the soil samples as reported by Gobat et al. (2010). Soil cores from each plot were pooled to produce a homogenized soil sample per plot (Heerdt et al., 1996). Then, the 36 soil samples were sieved (2 mm) and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until molecular analyses were performed.

To evaluate the influence of the established vegetation on the soil microbial community, the composition of the vegetation of each plot was described using the Braun Blanquet abundance index (Meddour, 2011). In addition, to evaluate the influence of the physicochemical properties of the soil, a part of each soil samples was sent to the LAMA laboratory (IRD, NOUMEA). The following characteristics were evaluated according to the method reported by Perrier (2005): pF4.2, pH H<sub>2</sub>O, organic C, total N, available P (Olsen), total P, DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) extractable metals (Mn, Ni, Fe, Cr, Co, Al), K, Ca, Mg, Si, CEC, and granulometry (clays, silts, and sands). The complete physical and chemical characteristics of the soil samples are reported in Table S1.



**Fig. 1** (A) Location of New Caledonia in the South West Pacific. (B) Map of the ultramafic outcrops of New Caledonia (in grey). (C) Shaded relief map of the Koniambo Massif with study site location.

**Table 1.** Descriptions of the habitat types investigated

<b>Successional stage</b>	<b>Description</b>
<b>(Ab)</b> Bushy shrub maquis dominated by <i>Tristaniopsis guillainii</i>	On plateaus. Widely open group (bare soil > 35%) from 50 cm to 1.5 m in height. Characterized by an extreme reduction herbaceous whose recovery rate does not exceed 5% and a shrub stratum > 50%.
<b>(L)</b> Ligno-herbaceous maquis dominated by <i>Hibbertia altigena</i> , <i>Eucarpha deplanchei</i> and <i>Costularia</i> spp.	On slopes. Significant development of the herbaceous layer (>50%). The low shrub layer (1.20 m average) is discontinuous and has a recovery rate lower than the herbaceous layer. With light demanding, mesophilic and pioneers species and larger species. Bare soil > 10%
<b>(A)</b> Maquis dominated by <i>Araucaria montana</i>	On the ridges and submittal plateaus. Characterized by an <i>Araucaria</i> tree stratum dominating a heterogeneous ligno-herbaceous or shrub stratum. Consisting mainly of orophiles small species or creeping. Bare soil > 10%. Group close to the previous.
<b>(P)</b> Pre-forest maquis dominated by <i>Tristaniopsis callobuxus</i>	Located on the edge of forest formations. Maquis higher and denser than the previous two types. Extremely diverse. The shrub layer is larger (two-thirds of the surface), dominated by <i>Tristaniopsis callobuxus</i> . One-third is covered by a herbaceous layer. No tree layer.
<b>(N)</b> Forest dominated by <i>Nothofagus codonandra</i> and <i>Nothofagus balansae</i>	In zone troughs. Some maquis species ( <i>Tristaniopsis guillainii</i> and <i>Tristaniopsis callobuxus</i> ) represented by trees from 8 to 10 m, associated with forest species. Facies dominated by <i>Nothofagus</i> ( <i>Nothofagus codonandra</i> and <i>N. balansae</i> )
<b>(C)</b> Forest dominated by <i>Cocconerion minus</i> and <i>Dacrydium balansae</i>	Same features as above. Facies dominated by <i>Cocconerion cf. minor</i> and <i>Dacrydium balansae</i>

The groups that ranged from 200 m to 900 m above sea level, occupying the slopes and hills lateritic soils.

### **Soil DNA-extraction and bar-coded pyrosequencing of bacterial and fungal communities**

For each soil sample, eight DNA extractions were performed as replicates from 0.25 g subsamples using the Mobio PowerSoil extraction kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). The alternative lysis method proposed by the manufacturer was performed. Thus, soil subsamples were vortexed for 3-4 seconds, then heated to 70°C for 5 min, three times. The remaining steps were performed as directed by the manufacturer's original instructions. DNA samples were stored at -20°C until needed. The bacterial community diversity was assessed using the DNA ~545 bp region covering V1-V3 within the 16S gene region and considered as the broadly conserved DNA barcode according to Woese (1987). The primers 27F and 553R were used to amplify this region. The fungal community was analyzed by targeting the DNA region of the ITS2 rRNA gene, which is widely used as a DNA metabarcoding marker (Bates et al., 2013). Moreover, White et al. (1990) have shown that the primer set provides 95% of fungal and 99% of Glomeromycota DNA. The primers ITS3 and ITS4 were used to amplify this region. The full set of primers used in the study is reported in (Table S2). The PCR reactions were conducted in 25  $\mu$ l reactions with 0.625  $\mu$ l (0.25  $\mu$ M) of each primer, 2.5 ng of the template DNA for each soil subsample, 1 X PCR reaction buffer, and 0.08 U of GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min, and finally a 10 min extension at 72°C. Amplified DNA was purified by filtration (Sephadex G50, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The product purity was visualized on agarose 1.5% gel in a TAE buffer. Gels were stained with ethidium bromide (0.5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) and visualized under UV light. After DNA quality control, the subsamples replicates of PCR products from a same soil sample were pooled to obtain one final amplicon per soil sample, according the microbial domain. Thus, we obtained 36 bacterial amplicons and 36 fungi amplicons. Then, the DNA concentration of

each amplicons was determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Finally, both the bacteria and the fungi, 4 libraries of 9 amplicons pooled in equimolar ratios were generated, as recommended by 454 Life Sciences (Margulies et al., 2005). The pyrosequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA).

### **Processing of pyrosequencing data**

The quality of the data was analysed as described by Nilsson et al. (2012) and processed using the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) toolkit (Caporaso et al., 2010). In brief, bacterial and fungal sequences were quality trimmed to a score > 25 and assigned to soil samples based on their barcodes. Ambiguous bases and mismatches in primer sequences were not admitted. Chimeras were checked and removed with the Chimera Slayer algorithm in QIIME. Both bacterial and fungal sequences were binned into operational taxonomic units (OTUs) using a 97% identity threshold with uclust (Kunin et al., 2010), and the most abundant sequence from each OTU was selected as a representative sequence for that OTU. Singletons were removed. Specifically, we used ITSx software (version 1.0.10) (Bengtsson-Palme et al., 2013) to remove non-fungal ITS2 sequences. Taxonomy was assigned to bacterial OTUs by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) for each representative sequence against a subset of the Silva database (the full database filtered at 97% sequence identity using BLAST) (SILVA SSU 111) (Quast et al., 2013). The fungal pyrosequencing reads were BLASTed against a database of the ITS2 rRNA sequences from UNITE-INSD V6 (Abarenkov et al., 2010) using the species hypothesis (Kõljalg et al., 2013). The percentage similarity to the assigned sequence ranged from 97% to 98.5%, with an average value of 98.3%. After this step, the unidentified fungi sequences were extracted and

BLASTed against the MaarjAM database using a 97% identity threshold (Opik et al., 2010) to identify the Glomerocota.

According to McMurdie and Holmes (2014), who showed that the rarefaction of microbiome count data is inefficient in the statistical sense, we used the edgeR package within the R statistical environment (“edgeR package”, Robinson et al. 2010), to normalize the differential sequencing depth analysis and the OTU composition for the two microbial domain. We used the « calcNormFactors » function to find a set of scaling factors for the library sizes that minimize the log-fold changes between the samples for most genes. Thus, we generated an OTU normalized matrix, both for fungi and bacteria. These new matrixes were used to the downstream statistical analysis.

### **Statistical analyses**

We used several multivariate statistical analyses to compare habitats using four groups of parameters (physico-chemical and floral parameters, fungal and bacterial communities). Hellinger-transformed data (square root of relative abundance) were used to generate Bray-Curtis dissimilarity matrices for floristic, fungal and bacterial variables. An Euclidian dissimilarity matrix was generated after standardization of the data for the physico-chemical variables. The statistical significance for all tests was set at  $p$ -value <0.05. The difference between habitats was tested using a permutational analysis of variance fixed model (PERMANOVA) (Anderson, 2001) (PRIMER V7, Primer-E Ltd, 239 Plymouth, UK). In case of significant differences, PERMANOVA pairwise comparisons were used to identify the origin of the differences. The results were illustrated by Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) analysis using the vegan package within the R statistical environment (“vegan package”, R.3.1.1, R foundation).

The relationship between fungal or bacterial communities and floristic or

edaphic variables was tested using Relate tests (PRIMER V7). When a significant relationship was found, a distance-based linear model (DISTLM) was built to identify the significant predictors for floristic or edaphic variables. This model does a partitioning of variation using a multiple regression model. Permutation methods are used to assess statistical significance of each predictor variable. In addition, preliminary diagnostics are made to assess and to avoid multi-collinearity among predictor variables that could bias the results (McArdle & Anderson, 2001). The fitted DISTLM models were visualized in multi-dimensional space, using the distance-based redundancy analysis (dbRDA) routine (PRIMER V7). The details of each DISTLM model are given in Fig. S2, and Tab S3 to Tab. S6.

To assess the amount of the variation explained by each sets of significant predictors (floristic and edaphic), we partitioned the overall variation of the bacterial or fungal communities using a DISTLM model which included only the significant predictors of both sets of predictors (physico-chemical and floral).

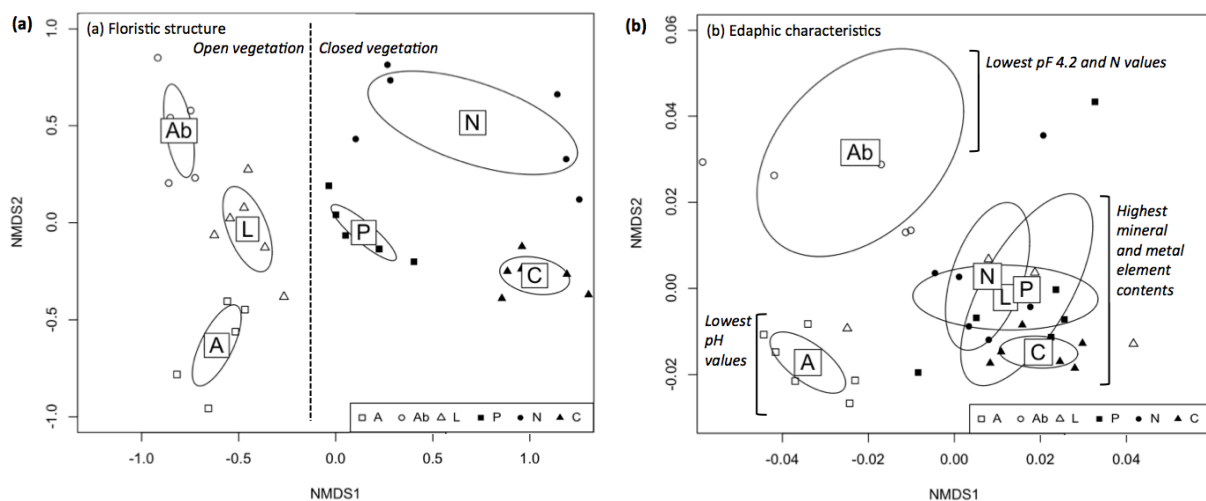
## **Results**

### **Vegetation and soil characteristics of the studied area**

The location of the studied area is described in Fig. 1 and detailed descriptions of the vegetation and edaphic characteristics of each habitat type are given in Table 1 and Table S2, respectively. The permutational analysis of variance of the floristic characteristics revealed that a unique vegetation community characterized each habitat ( $p < 0.001$ ). This marked contrast is shown by the nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot ordination of the vegetation-dissimilarity matrix (Fig. 2a). This figure illustrates the gradient of vegetation succession and the contrast between more open habitats (habitats A, Ab and L), where bare soil or rock is exposed between plants, and completely vegetated habitats (habitats P, N and C), where vegetation cover is continuous. This second group was the richest in species and



plant abundance. The PERMANOVA analysis of the soil characteristics revealed four significantly distinct groups ( $p < 0.01$ ). This is illustrated by the NMDS (Fig. 2b). Two groups corresponded to the Ab habitat and the A habitat, which had the lowest value in withering point (pF4.2), nitrogen and pH H<sub>2</sub>O, respectively. The third (habitats P, N and L) and the fourth group (habitats P and C) corresponded to the habitats with most mature soils. The Relate test revealed a significant relationship between aboveground vegetation and edaphic characteristics ( $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.27$ ). The distance-based linear model (DISTLM) approach showed that nitrogen, pH, pF4.2, silts and DTPA extractible manganese significantly explained 50% of the variability in the vegetation community (26%, 11%, 6%, 4% and 3%, respectively,  $p < 0.001$ ) (Table S3).



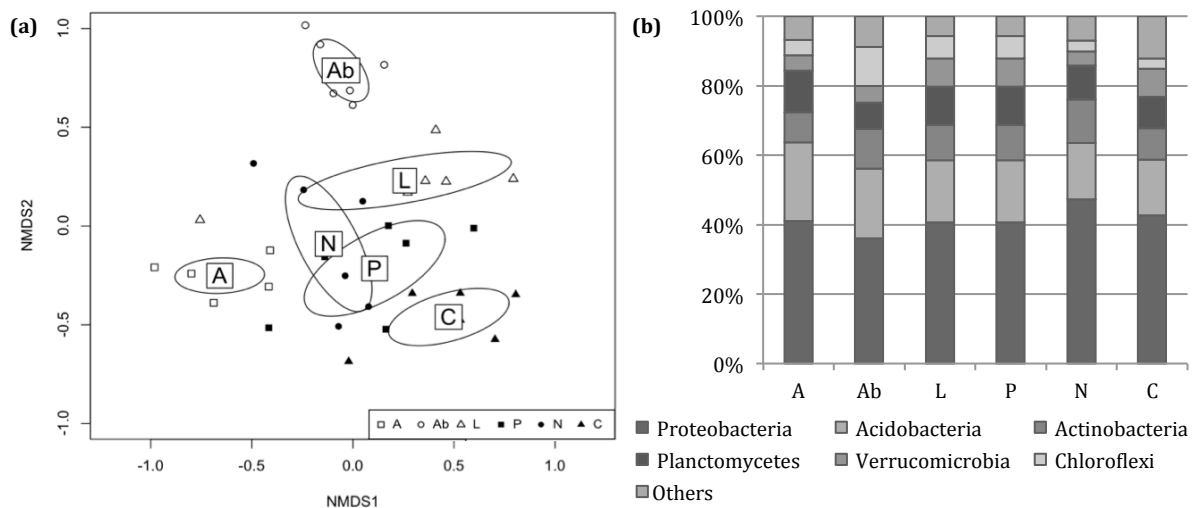
**Fig. 2** Two-dimensional NMDS ordination of (a) floristic structure and (b) edaphic characteristics per habitat at Koniambo massif, in New Caledonia. Stress level = 0.13 and 0.12 respectively. Ordination was based on the distance dissimilarities matrix. Ellipsoids represent the standard error confidence limit (95%) per habitat. The location of ellipsoids within each diagram indicates their degree of similarity. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).

### Assessing the compositions of bacterial communities

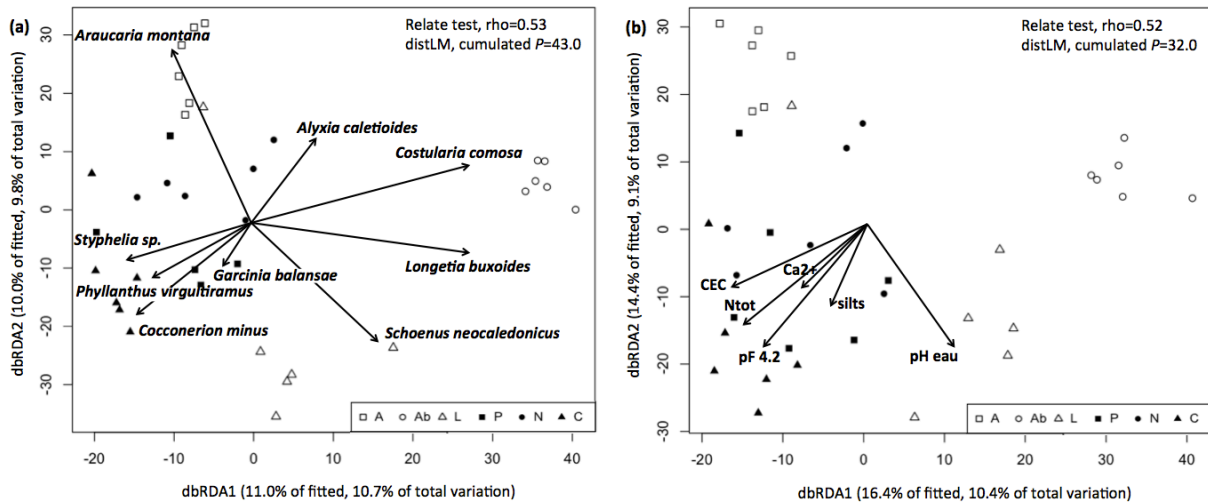
From the 454 pyrosequencing data, we obtained a total of 391,716 exploitable sequences (77% of the total 511,626) that could be classified in 40,559 OTUs with a mean of  $34,767 \pm 317$  per sample (ranging from  $2,564 \pm 273$  in the L habitat to  $4,731 \pm 589$  in the P habitat) (Table S3). A distinct assemblage of bacterial OTUs characterized each studied habitat. This is revealed by the permutational analysis ( $p = 0.01$ ) and it is illustrated by the NMDS (Fig. 3a). At the phylum level, there were 40 major bacterial taxa present within most habitats. Once averaged across all habitats, the most abundant bacterial groups were Proteobacteria ( $41.38\% \pm 1.26$ ) and Acidobacteria ( $18.49\% \pm 1.01$ ), followed by Actinobacteria ( $10.29\% \pm 0.77$ ), Planctomycetes ( $10.06\% \pm 0.86$ ), Verrucomicrobia ( $6.24\% \pm 1.38$ ), and Chloroflexi ( $< 6\%$ ) (Table S3). The 34 remaining bacterial phyla accounted for less than 8% of the sequence data and less than 1% each. The taxa exhibited different relative abundances among habitats (Fig. 3b). The abundance of Proteobacteria was greater in the N habitat ( $47.27\% \pm 1.31$ ) and lower in the Ab habitat ( $35.97\% \pm 1.31$ ) compared to other habitats. Acidobacteria and Actinobacteria were most abundant, albeit not significantly so, in habitat A and habitat N ( $22.51\% \pm 1.24$  and  $12.50\% \pm 0.77$ , respectively). Habitat Ab exhibited a significantly greater proportion of Chloroflexi ( $11.35\% \pm 0.65$ ).

The bacterial community was significantly related to the above ground veg (Relate test,  $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.53$ ) and soil characteristics (Relate test,  $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.52$ ). A DISTLM model indicated that 9 vegetation species were significant predictors of the bacterial community structure, explaining 43% of the overall variation. Similarly, DISTLM model indicated that 6 edaphic characteristics were significant predictors of bacterial community structure and explained a proportion (32%) of the overall variability (Fig4a). These 6 predictors were nitrogen (9%), pH (9%), pF 4.2 (5%), Ca, CEC and silts (3% each) (Fig 4b). Consequently, the aboveground vegetation had a stronger influence on the composition of

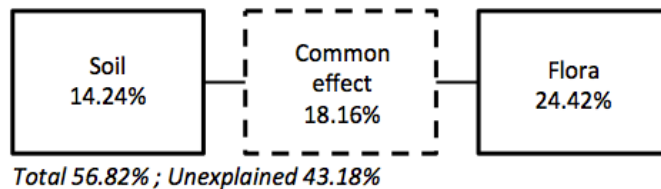
bacterial communities across the ultramafic ecosystem than the edaphic characteristics. The detail of significant species and edaphic characteristics included in distLM is given in Table S4 and Table S5, respectively. The significant predictors of the above ground vegetation species and edaphic characteristics predicted 56.82% total of the variation of bacterial community structure. The floristic significant predictors explained 22.42%, the edaphic predictors explained only 14.24%, and 18.16% were explained by both sets of predictors (Fig 5).



**Fig. 3** Bacterial community characteristics for the different habitats. (a) Two-dimensional NMDS ordination of bacterial community structure. Stress =0.18. Ordination was based on the distance dissimilarities matrix. Ellipsoids represent the standard error confidence limit (95%) per habitat. The locations of ellipsoids within each diagram indicate their degree of similarity. (c) Relative abundance of bacterial phyla identified in all samples. Others = Cyanobacteria, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, TM6, Armatimonadetes, Candidate\_division\_OD1, Nitrospirae, Candidate\_division\_TM7, Elusimicrobia, Thermotogae, Candidate\_division\_OP11, Candidate\_division\_OP3, WCHB1-60, Candidate\_division\_WS3, Spirochaetes, Candidate\_division\_BRC1, SM2F11, Fibrobacteres, Tenericutes, Deinococcus-Thermus, Lentisphaerae, Fusobacteria, Synergistetes, Deferribacteres, Caldiserica, Chlamydiae, Aquificae, Candidate\_division\_OP9, Chlorobi Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).



**Fig. 4** distance based redundancy analysis from distance based linear models between bacterial communities and (a) the floristic structure and (b) the edaphic characteristics. Only explanatory significant variables are shown. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).



**Figure 5.** Variance partitioning distance-based linear model (DISTLM) shows the relative effects of the two significant variable sets on the composition of bacterial taxa. The full squares represent the effect of individual significant variable sets by partitioning out the effects of the other significant variable sets. The discontinuous square between the full squares represent the combined effects from the significant variables on either side of the discontinuous square.

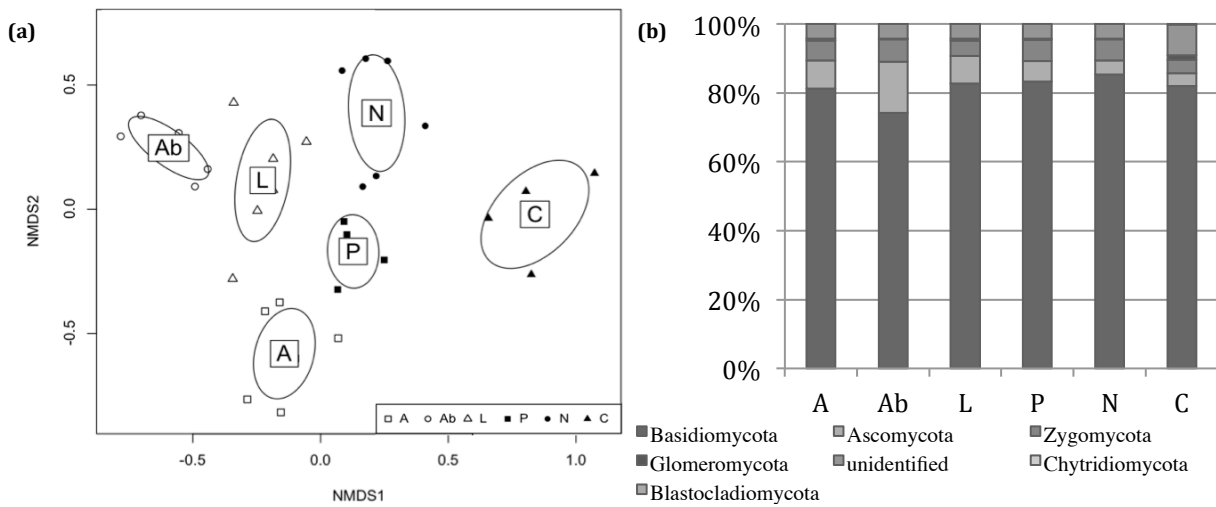
### Assessing the fungal communities

From the fungal community analyses in the 36 soil samples from across the six ultramafic habitats, we obtained a total of 490,898 exploitable sequences (83% of the total 591,019). Classification of the sequences revealed 9,555 OTUs. The number of OTUs varied from  $534 \pm 34$  in the L habitat to  $965 \pm 101$  in the P habitat (Table S3). Permutational

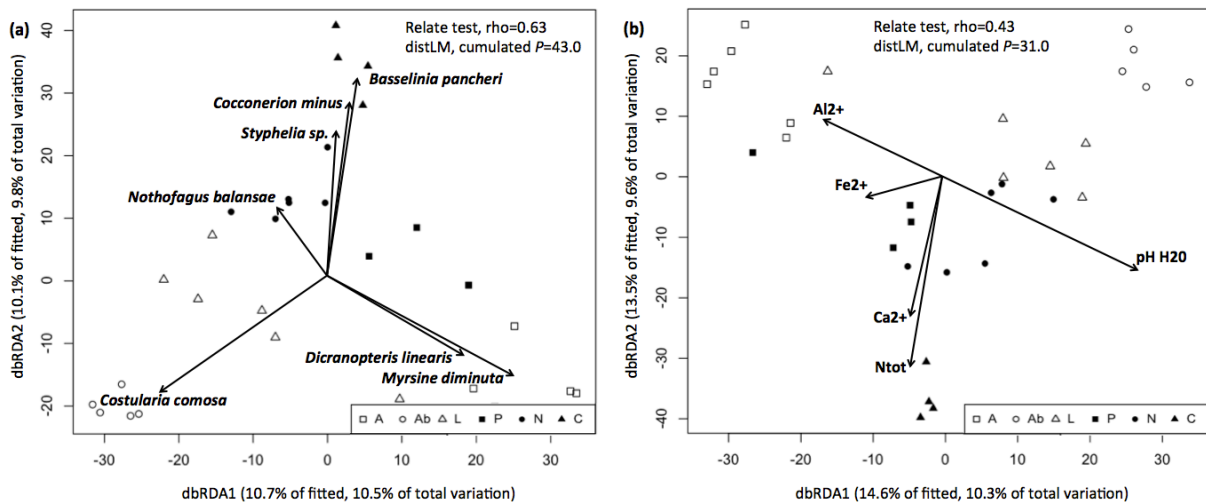
analyses (Fig. 6a) indicated that each habitat type was associated with a specific fungal community ( $p < 0.001$ ). Basidiomycota and Ascomycota represented a majority of the fungal sequences in this study ( $81.46\% \pm 1.86$  and  $7.44\% \pm 1.16$ , respectively) (Table S3). Unidentified fungi accounted for  $4.98\% \pm 0.81$  sequences. The remaining taxa included Zygomycota ( $5.51\% \pm 0.77$ ), Glomeromycota ( $< 1\%$ ), Chytridiomycota ( $< 0.1\%$ ), and Blastocladiomycota ( $< 0.1\%$ ). The relative abundance of fungal phyla in Fig. 6b shows little variation among habitats. The presence of Ascomycota was significantly greater in the Ab habitat ( $14.86\% \pm 1.11$ ) and lower in the C habitat ( $3.61\% \pm 1.20$ ) compared to other habitats. Habitat N included the highest percentage of Basidiomycota ( $85.40\% \pm 1.83$ ), and habitat Ab, the lowest value ( $74.14\% \pm 2.04$ ).

As with the bacterial communities, the fungal community was significantly related to the above ground veg (Relate test,  $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.63$ ) and soil characteristics (Relate test,  $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.43$ ). The DISTLM model indicated that 7 vegetation species were significant predictors of the fungal community structure, explaining 43% of the overall variation. Moreover, DISTLM model indicated that 5 edaphic characteristics were significant predictors of bacterial community structure and explained a proportion (31%) of the overall variability (Fig7a). These 6 predictors were pH (9%), nitrogen (8%), calcium (5%), aluminum (5%), and iron (4%) (Fig 7b). Thus, the aboveground vegetation had a stronger influence on the composition of fungal communities across the ultramafic ecosystem than the edaphic characteristics. The detail of significant species and edaphic characteristics included in distLM is given in Table S6 and table S7 respectively.

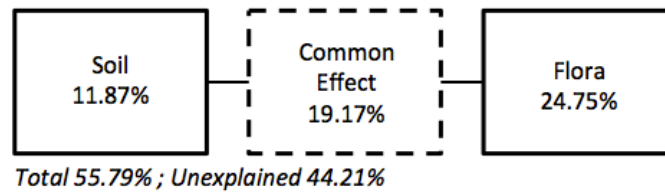
The significant predictors of the above ground vegetation species and edaphic characteristics predicted 55.79% total of the variation of fungal community structure. The floristic significant predictors explained 24.75%, the edaphic predictors explained only 11.87%, and 19.17% were explained by both sets of predictors (Fig 8).



**Fig. 6** Fungal community characteristics for the different habitat. (a) Two-dimensional NMDS ordination of fungal community structure. Stress =0.10. Ordination was based on the distance dissimilarities matrix. Ellipsoids represent the standard error confidence limit (95%) per habitat. The locations of ellipsoids within each diagram indicate their degree of similarity. (b) Relative abundance of fungal phyla identified in all samples. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).



**Fig. 7** distance based redundancy analysis from distance based linear models between fungal community and (a) the floristic structure and (b) the edaphic characteristics. Only explanatory significant variables are shown. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).



**Figure 8. Variance partitioning distance-based linear model (DISTLM)** shows the relative effects of the two significant variable sets on the composition of fungal taxa. The full squares represent the effect of individual significant variable sets by partitioning out the effects of the other significant variable sets. The discontinuous square between the full squares represent the combined effects from the significant variables on either side of the discontinuous square.

## Discussion

An increasing number of studies have attempted to characterize how microbial distribution patterns respond to environmental factors (Nielsen *et al.*, 2010; Rousk *et al.*, 2010). The previous conclusions of studies regarding ultramafic ecosystems have been limited by the techniques used (Lenczewski *et al.*, 2009) or by the focus on a single microbial domain, such as bacteria (Herrera *et al.*, 2007). The application of the metagenetic analysis to ultramafic ecosystems was expected to greatly expand our knowledge of the microorganisms populating these systems (Wettberg and Wright, 2011). The present study is the first to use this approach to assess the richness and taxonomic diversity of bacterial and fungal communities across an ultramafic system, and their dependency from edaphic properties and vegetation cover.

## Structure of bacterial and fungal communities

Rothschild and Mancinelli (2001) emphasized the tendency to consider extreme environments as hosting low biodiversity. For instance, Mengoni *et al.* (2009) stated that the low fertility of ultramafic soils was thought to be due to "little diversity, as well as a general paucity, in the bacterial flora of the serpentine soils". Similarly, Branco and Ree (2010)

highlighted the fact that ultramafic characteristics were considered most likely detrimental to the establishment of fungi because high levels of heavy metals are almost universally toxic directly via the enzymatic inhibition and disruption of cellular integrity (Gadd, 1993) and indirectly through the production of free radicals (Dowling and Simmons, 2009). However, recent studies have tended to demonstrate that serpentine soils do not limit bacterial (Oline, 2006) or mycorrhizal fungal diversity (Branco, 2010).

The metagenetics data gathered in study confirm these recent findings by showing an unexpectedly high richness of bacterial and fungal species in ultramafic soils. Moreover our results are similar to those found in non-ultramafic natural environments such as forest, which are considered the most complex and richest terrestrial ecosystems (Myers, 1992). Indeed, at the 97% similarity threshold, we found a mean of  $3,477 \pm 317$  OTUs per habitat for bacteria, while Kim *et al.* (2014) found a mean of 3,500 OTUs in a South Korean temperate forest and 2,500 in a Malaysian tropical rainforest, and Nacke *et al.* (2011) found 3,212 OTUs in a German temperate forest. For fungi, we found a mean of  $712 \pm 43$  OTUs, similar to the numbers reported for temperate forests in France (Buée *et al.* 2009) and Japan (Kadowaki *et al.* 2013), and for an Amazonian forest (Fierer *et al.* 2007).

In addition to revealing an number of fungal phyla equal to those reported in ultramafic soil studies (Daghino *et al.*, 2012) and non-ultramafic studies (Lim *et al.*, 2010), the results showed that the abundance of bacterial species is distributed among a wide array of 40 phyla. In comparison, Lauber *et al.* (2008) reported 25 bacterial phyla based on their studies in 88 soils across North and South America. Nacke *et al.* (2011) reported 17 bacterial phyla in German forests, and Uroz *et al.* (2010) reported 15 phyla in French forests. In addition, 34 bacterial phyla counted less than 1% each, corresponding to rare taxas. Given that many rare species play unique ecological roles (Mouillot *et al.* 2013), this suggest that ultramafic ecosystems are homes to highly complex microbial communities.



Finally, the results confirmed that serpentine soils do not limit bacterial and fungal diversity, as recently hypothesized (Oline, 2006; Branco, 2010). On the contrary, these ecosystems might be among the most complex terrestrial systems.

### **Distribution patterns of microbial domains**

The results showed that each habitat is characterized by a unique microbial community, both for bacteria and fungi. In addition, an apparent successional gradient from maquis to forest was found in terms of changing microbial communities, with higher diversity in the more developed forest soils. To understand this pattern, it was attempted to characterize the relationship between microbial communities and the edaphic properties and vegetation cover of each habitat, using variance partitioning. The effect of vegetation and edaphic characteristics were the same between the two microbial domains investigated. In both cases, the effect of aboveground vegetation was the most significant descriptor. Although weaker, the relationships with the edaphic characteristics were also significant. These results are at odd with previous studies suggesting that fungi are more closely associated with plants than are prokaryotes, the latter being more influenced by soil properties (Fierer and Jackson, 2006; Millard and Singh, 2009), in particular the pH (Rousk *et al.*, 2010). This apparent discrepancy might be due to the relatively narrow range of pH (5.27 to 5.65, with an extreme pH value in site Ab of 4.64) characterizing the environments we sampled. In a similar case, Bonito *et al.* (2014) showed that host associations played a role in moderating community structures. However, the results support the existence of spatial covariations between plant communities and microbial communities reported in studies investigating different environments (Kennedy *et al.*, 2005; Zinger *et al.*, 2011).

Among soil properties, the distribution patterns of the two communities were significantly influenced by nitrogen, pH and calcium. The results are broadly consistent with previous studies showing that shifts in the structure of bacterial and fungal communities can be associated with changes in a number of soil properties, including soil texture (Girvan et al., 2003), soil pH (Fierer and Jackson, 2006) and soil nitrogen availability (Frey et al., 2004). Patterns of dissimilarity among fungal communities were related to nitrogen, which is consistent with the typical saprophytic status of most fungi and their higher capacity than bacteria to grow on complex substrates (Romaní et al., 2006). As reported by Zinger et al. (2011), the significant covariation between pH and bacterial diversity may be related to Acidobacteria, a dominant group of soil Bacteria known to be highly responsive to soil pH. In addition, the variation of soil pH may reflect the differences in the availability of simple organic substrates in soils for which bacteria are more competitive (Boer et al. 2005). By contrast, if fungal communities are considered to be less sensitive to soil pH, fungal biomass has been reported to covary with soil pH and so explaining significant covariations between fungi and soil pH (Zinger et al., 2011). The observed nitrogen effect on fungal communities may be direct, but it may also reflect the recruitment of different types of mycorrhizal associations in ecosystems that display contrasted nitrogen and nutrient cycles. Ectomycorrhizal associations are usually more prevalent in ecosystems with lower rates of organic matter recycling (Chapman et al., 2006). Soil texture was also correlated with bacterial community composition, a pattern consistent with previous studies (Girvan et al., 2003; Lauber et al., 2008).

Most of the above edaphic factors are known to be influenced by vegetation (Eviner and Chapin III, 2003). Moreover, our results showed a strong relationship between the vegetation cover and these edaphic factors. Many authors have reported that plants can influence soil properties through litter and rhizodeposition, with changes in the rate and

quality of substrate input due to alterations in plant species composition and diversity. Binkley et al. (1995) and Thomsen et al. (2003) reported that plant species can control physicochemical properties such as soil pH, carbon to nitrogen ratio, consequently the cation capacity exchange and texture. Such mechanisms can subsequently influence the structure of microbial populations (Gobat et al., 2010) and may explain the important influence of the vegetation cover than edaphic factors on microbial communities. Similar results have been reported by Zinger et al. (2011) in alpine systems and by Kadowaki et al. (2013) in mixed Japanese forests. Therefore, these results could explained the combined effect of edaphic variables and plant community composition noticeably also explained bacterial and fungal community variation.

In this study, a metagenetics approach was used to assess the influence of vegetation cover and soil properties on the assemblages of bacterial and fungal communities across six habitat types in ultramafic systems. First, the ultramafic microbial systems are among the richest and most complex natural terrestrial systems analyzed to date. This result confirms the hypothesis that the properties of ultramafic soils do not limit microbial diversity. Second, there is a complex interaction between plant species composition, the above ground vegetation, the edaphic characteristics and the partitioning of microbial diversity with respect to these different descriptors. At the ultramafic landscape scale of a massif, the bacterial and fungal beta diversity are likely driven by the vegetation cover rather than edaphic properties. The structure of soil microbial communities in ultramafic systems might find an application in the design of new strategies for the restoration of these sites, especially for the management of topsoil. As suggested by Van Etten *et al.*, (2014) a central issue about separating topsoil of the different communities to help recreating spatial patterns of vegetation types following mining remains. The present study shows that the separation of topsoils with clearly distinct

microbial communities could help to recreate spatial patterns of vegetation types following mining.

### **Acknowledgements**

This work was conducted as part of an industrial agreement on training through research (CIFRE No. 2011/0861) involving Koniambo Nickel SAS and the University of New Caledonia. We thank Michael Mozar and Emilie Villar at the PACA-Bioinfo Bioinformatics platform (supported by France-Génomique: ANR-10-INBS-0009), Marseille, France, for their help with the analysis of 454 sequencing data. Special thanks to Henrik Nilsson for his help in denoising the fungi sequences (Department of Biological & Environmental Sciences, University of Gothenburg, Sweden).

## References

- Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K-H *et al.* (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi--recent updates and future perspectives. *The New phytologist*, **186**, 281–5.
- Amend AS, Seifert K, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular ecology*, **19**, 5555–65.
- Amir H, Ducouso M (2010) Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: Les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Noumea, New Caledonia: Editions IAC, pp. 129-145.
- Amir H, Lagrange A, Hassaine N, Cavaloc Y (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza*, **23**, 585–95.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, **26**, 32–46.
- Bates ST, Ahrendt S, Bik HM *et al.* (2013) Meeting Report : Fungal ITS Workshop ( October 2012 ) Activities. , **8**.
- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M *et al.* (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data (M Bunce, Ed.). *Methods in Ecology and Evolution*, **4**, 914-919.

- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC, *et al.* (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 795–811.
- Bonito G, Reynolds H, Ii MSR, Nelson J (2014) Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. , 3356–3370.
- Branco S (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Molecular ecology*, **19**, 5566–76.
- Branco S, Ree RH (2010) Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. *PloS one*, **5**, e11757.
- Buée M, Reich M, Murat C *et al.* (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *The New phytologist*, **184**, 449–56.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, **7**, 335–6.
- Chapman SK, Langlely JA, Hart SC, Koch GW (2006) Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. *The New phytologist*, **169**, 27–34.
- Chiarucci A, Baker AJM (2007) Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant and Soil*, **293**, 1–2.
- Daghino S, Murat C, Sizzano E, Girlanda M, Perotto S (2012) Fungal diversity is not determined by mineral and chemical differences in serpentine substrates. *PloS one*, **7**, e44233.
- Dagnelie, Pierre (2012) *Principes d'expérimentation (deuxième édition)*. Presses Agronomiques de Gembloux.

- Davies KF, Chesson P, Harrison S *et al.* (2005) Spatial heterogeneity explains the scale dependence of the native-exotic diversity relationship. *Ecology*, **86**, 1602–1610.
- Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **276**, 1737–45.
- Eviner VT, Chapin III FS (2003) FUNCTIONAL MATRIX : A Conceptual Framework for Predicting Multiple Plant Effects on Ecosystem Processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**, 455–485.
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J *et al.* (2007) Metagenetic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and environmental microbiology*, **73**, 7059–66.
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 626–31.
- Frankenberg, W. T. and Arshad M (1995) *Phytohormones in Soils Microbial Production & Function*. CRC Press.
- Frey SD, Knorr M, Parrent JL, Simpson RT (2004) Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management*, **196**, 159–171.
- Gadd GM (1993) Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytologist*, **124**, 25–60.

- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **68**, 280–300.
- Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Osborn AM, Ball AS (2003) Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1800–1809.
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2010) *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques.
- Harrison S, Rajakaruna N (2011) *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. Berkeley, CA: University of California Press.
- Heerdt GNJ Ter, Verweij GL, Bekker RM, Bakker JP (1996) An Improved Method for Seed-Bank Analysis: Seedling Emergence After Removing the Soil by Sieving. *Functional Ecology*, **10**, 144.
- Herrera A, Héry M, Stach JEM *et al.* (2007) Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology*, **43**, 130–139.
- Jaffré T, Rigault F, Sarrailh JM (1994) La végétalisation des anciens sites miniers. *Bois et Forêts des Tropiques*, 45–57.
- Jaffré T, L'Huillier L (2010) La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. In *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: Les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Noumea, New Caledonia: Editions IAC, pp. 45-103.



- Jourand P, Hannibal L, Majorel C *et al.* (2014) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *Journal of plant physiology*, **171**, 164–72.
- Kadowaki K, Sato H, Yamamoto S *et al.* (2013) Detection of the horizontal spatial structure of soil fungal communities in a natural forest. *Population Ecology*, **56**, 301–310.
- Kennedy N, Edwards S, Clipson N (2005) Soil bacterial and fungal community structure across a range of unimproved and semi-improved upland grasslands. *Microbial ecology*, **50**, 463–73.
- Kim M, Kim W, Tripathi BM (2014) Distinct Bacterial Communities Dominate Tropical and Temperate Zone Leaf Litter. *Microbial Ecology*, **67**, 837–848.
- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K *et al.* (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular ecology*, **22**, 5271–5277.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental microbiology*, **12**, 118–23.
- Lagrange A, Ducousso M, Jourand P, Majorel C, Amir H (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian journal of microbiology*, **57**, 21–8.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 2407–2415.

- Lenczewski M, Rigg L, Enright N, Jaffre T, Kelly H (2009) Microbial communities of ultramafic soils in maquis and rainforest at Mont Do, New Caledonia. *Austral Ecology*, **34**, 567–576.
- L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (2010) *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. Noumea, New Caledonia: Editions IAC.
- Lim YW, Kim BK, Kim C *et al.* (2010) Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, **48**, 284–289.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**, 376–380.
- McArdle BH & Anderson MJ (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, **82**, 290-297.
- McHugh TA, Koch GW, Schwartz E (2014) Minor changes in soil bacterial and fungal community composition occur in response to monsoon precipitation in a semiarid grassland. *Microbial ecology*, **68**, 370–378.
- McMurdie PJ, Holmes S (2014) Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. (AC McHardy, Ed.). *PLoS computational biology*, **10**, e1003531.
- Meddour, R. (2011) La méthode phytosociologique sigmatiste. [WWW document]. URL [http://www.tela-botanica.org/page:methode\\_phytosociologique\\_sigmatiste](http://www.tela-botanica.org/page:methode_phytosociologique_sigmatiste)
- Mengoni A, Schat H, Vangronsveld J (2009) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant and Soil*, **331**, 5–16.

- Millard P, Singh BK (2009) Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **88**, 147–158.
- Mouillot D, Bellwood DR, Baraloto C *et al.* (2013) Rare species support vulnerable functions in high-diversity ecosystems. *PLoS biology*, **11**, e1001569.
- Myers N (1992) *The Primary Source: Tropical Forests and Our Future*. Norton.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A *et al.* (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PloS one*, **6**, e17000.
- Nielsen UN, Osler GHR, Campbell CD, Burslem DFRP, Van Der Wal R (2010) The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. *Journal of Biogeography*, **37**, 1317–1328.
- Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Ryberg M *et al.* (2012) Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys* **4**: 37–63.
- Oline DK (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. *Applied and environmental microbiology*, **72**, 6965–6971.

- Opik M, Vanatoa A, Vanatoa E *et al.* (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *The New phytologist*, **188**, 223–241.
- Perrier N (2005) Bio-géodiversité fonctionnelle des sols latéritiques miniers: application à la restauration écologique (Massif du Koniambo, Nouvelle-Calédonie). PhD thesis, University of New Caledonia, New Caledonia.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, **41**, D590–6.
- Rajkumar M, Vara Prasad MN, Freitas H, Ae N (2009) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Critical reviews in biotechnology*, **29**, 120–30.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, 139–140.
- Romaní AM, Fischer H, Mille-Lindblom C, Tranvik LJ (2006) Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, **87**, 2559–2669.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092–101.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC *et al.* (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, **4**, 1340–1351.

- Sadlier RA, Smith SA, Whitaker A, Bauer AM (2009) A New Live-Bearing Species of Scincid Lizard (Reptilia: Scincidae) from New Caledonia, Southwest Pacific. *Pacific Science*, **63**, 123–136.
- Schechter SP, Bruns TD (2012) Edaphic sorting drives arbuscular mycorrhizal fungal community assembly in a serpentine/non-serpentine mosaic landscape. *Ecosphere*, **3**, art42.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS (2010) Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature reviews. Microbiology*, **8**, 779–790.
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, **156**, 1050–1057.
- Smith DP, Peay KG (2014) Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PloS one*, **9**, e90234.
- Strullu DG, Frenot Y, Maurice D *et al.* (1999) Première contribution à l'étude des mycorhizes des îles Kerguelen. *Compte rendu académie des sciences*, **322**: 771–777.
- Thomsen IK, Schjønning P, Olesen JE *et al.* (2003) C and N turnover in structurally intact soils of different texture. *Soil biology and biochemistry* **35**: 765–774.
- Etten EJB van, Neasham B, Dalglish S (2014) Soil seed banks of fringing salt lake vegetation in arid Western Australia – density, composition and implications for postmine restoration using topsoil. *Ecological management and restoration*, **15**: 239–242.

- Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental microbiology reports*, **2**, 281–288.
- Vogel-Mikus K, Pongrac P, Kump P, Necemer M, Regvar M (2006) Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, **139**, 362–371.
- Waldrop MP, Zak DR, Blackwood CB, Curtis CD, Tilman D (2006) Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. *Ecology letters*, **9**, 1127–1135.
- Wettberg EJ von, Wright J (2011) Genomic approaches to understanding adaptation. In *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. Harrison S, Rajakaruna N (eds). Berkeley, CA: University of California Press, pp. 139–154.
- White TJ, Bruns T, Lee S *et al.* (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). New York: Academic Press, pp. 315–322.
- Whiting SN, Reeves RD, Richards D *et al.* (2004) Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restoration Ecology*, **12**, 106–116.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, **51**, 221–271.

Yergeau E, Bezemer TM, Hedlund K *et al.* (2010) Influences of space, soil, nematodes and plants on microbial community composition of chalk grassland soils. *Environmental microbiology*, **12**, 2096–2106.

Yu L, Nicolaisen M, Larsen J, Ravnskov S (2012) Molecular characterization of root-associated fungal communities in relation to health status of *Pisum sativum* using barcoded pyrosequencing. *Plant and Soil*, **357**, 395–405.

Zinger L, Lejon DPH, Baptist F *et al.* (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PloS one*, **6**, e19950.

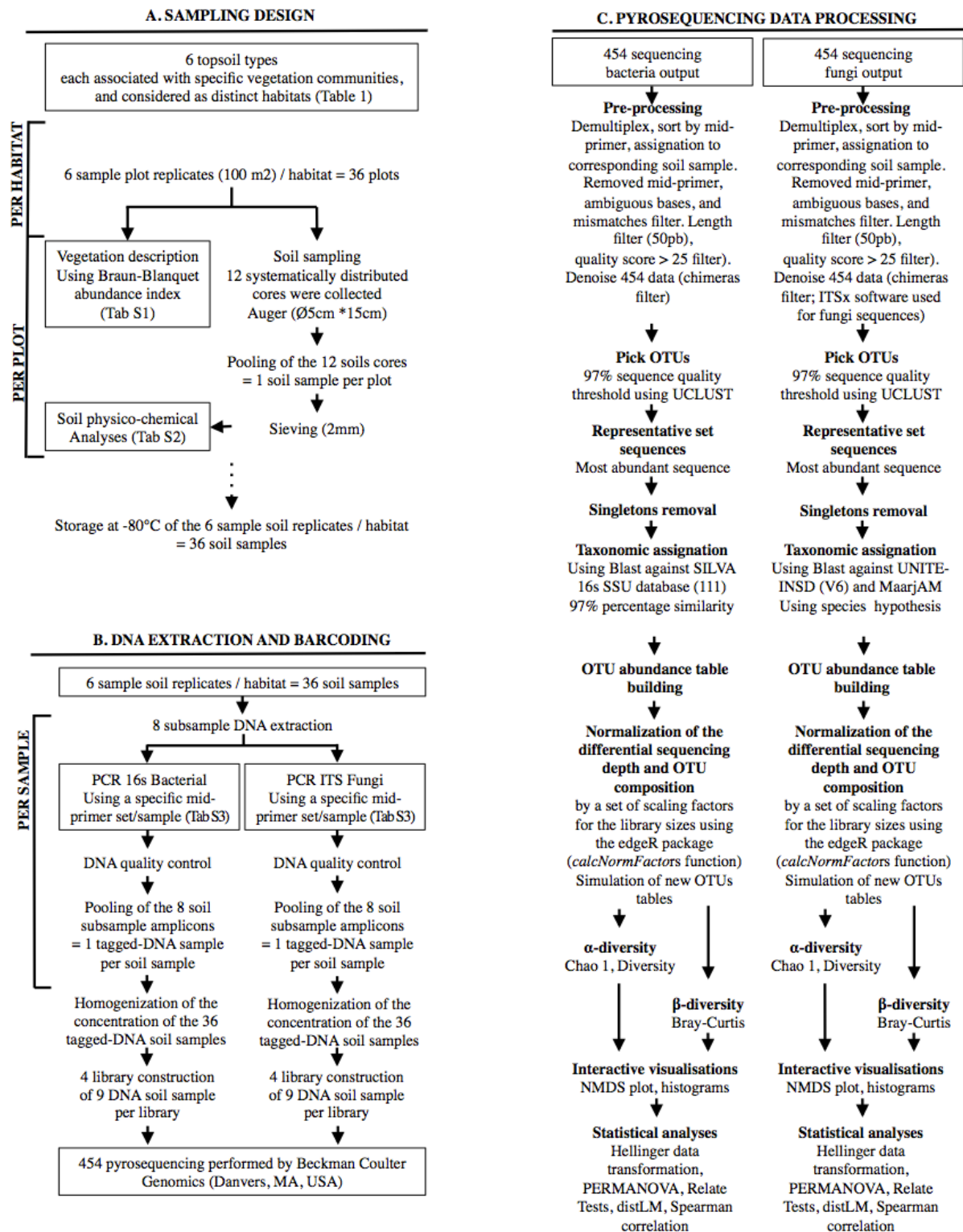
### **Author contribution**

- Bordez L: PhD student : paper writing, experiment achievement, data process and analyses
- Amir H : PhD director, general coordinator of the study
- Amir H, Ducouso M, Jourand P: design experiment, paper writing management and paper review
- Ducouso M : field experiment management
- Cavaloc Y: design experiment, technical and scientific advices
- Carriconde F: advices and paper review
- Claverie JM, Santini S : bioinformatic contribution
- Wantiez L : Statistical analyses
- Leveau A : Representative of Industrial partner

### **Data Accessibility**

DNA sequences: NCBI SRA: SRP052988.

**SUPPLEMENTARY DATA FOR THE ARTICLE :**  
 Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits



**Figure S1.** Detailed diagram of the complete material & method. A. Design sample; B. DNA extraction and barcoding; C. Pyrosequencing data processing.



**Table S1** Environmental characteristics of sampling habitats

	A	Ab	L	P	N	C
pF4.2	12.10 ±1.41a	6.02 ±0.35b	14.85 ±1.80a	16.07 ±1.96a	14.38 ±2.36a	24.67 ±2.19c
pH H2O	4.44 ±0.08a	5.57 ±0.06b	5.44 ±0.17b	5.36 ±0.15b	5.28 ±0.07b	5.55 ±0.12b
P assim mg/kg	0.00 ±0.00a	0.50 ±0.50b	0.00 ±0.00a	0.33 ±0.33b	0.17 ±0.17b	0.00 ±0.00a
P mg/kg	234.36 ±18.14a	191.48 ±32.75ab	120.48 ±20.31bd	126.91 ±6.66bd	148.36 ±13.94b	109.03 ±3.33d
Mn DTPA mg/kg	68.38 ±15.82a	471.62 ±134.80b	667.61 ±134.91b	629.21 ±131.22b	872.55 ±66.81b	806.13 ±75.33b
Ni DTPA mg/kg	6.92 ±1.08a	8.73 ±2.95a	76.69 ±28.55b	108.43 ±40.42b	57.66 ±13.32b	137.79 ±33.13b
Fe DTPA mg/kg	182.53 ±54.37abcd	70.89 ±11.65ab	77.05 ±5.75a	129.62 ±19.89bd	268.59 ±41.51c	120.28 ±7.88d
Cr DTPA mg/kg	0.70 ±0.12a	0.67 ±0.35a	0.54 ±0.18a	0.27 ±0.07a	0.44 ±0.13a	0.22 ±0.05a
Co DTPA mg/kg	2.10 ±0.48a	31.83 ±11.99b	121.86 ±34.36c	112.88 ±37.55bc	74.78 ±9.79b	116.41 ±16.34b
CEC m <sub>q</sub> %	9.88 ±0.83a	2.82 ±0.20b	7.50 ±0.51c	9.81 ±0.90ac	9.69 ±1.18ac	14.55 ±1.02d
K CE m <sub>q</sub> %	0.10 ±0.01a	0.02 ±0.00b	0.08 ±0.01a	0.11 ±0.02a	0.12 ±0.03a	0.26 ±0.04c
Ca g/kg	0.42 ±0.09	0.12 ±0.03	0.65 ±0.23	0.60 ±0.16	0.61 ±0.15	1.57 ±0.32
Mg mg/kg	3055.37 ±379.33a	1520.38 ±233.83b	7871.02 ±4177.08abc	8228.49 ±2066.05c	7060.45 ±1889.24ac	10563.91 ±1938.54c
Si g/kg	5.61 ±1.13a	6.14 ±1.19a	49.78 ±17.66b	53.44 ±7.01b	36.22 ±11.34b	68.98 ±17.21b
argiles %	15.15 ±4.58abc	4.87 ±1.01a	11.83 ±1.77bc	12.15 ±2.69bc	8.58 ±1.12b	17.06 ±1.71c
limons %	16.51 ±3.68abc	6.47 ±1.59a	34.56 ±5.69bd	28.06 ±4.44bcd	16.4 ±2.45c	30.4 ±3.26d
sables %	68.34 ±8.17ac	88.66 ±2.51b	53.61 ±6.95a	59.79 ±6.92ac	75.02 ±3.33c	52.54 ±4.80a
N mg/g	0.79 ±0.12a	0.37 ±0.01b	0.88 ±0.08a	1.30 ±0.11c	1.37 ±0.26c	2.26 ±0.18d
C cg/g	29.44 ±3.04a	9.30 ±0.25b	24.73 ±1.28a	40.72 ±4.41cd	47.96 ±7.62cd	54.03 ±4.57d

Habitat type: A Maquis dominated by *Araucaria Montana*. Ab bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*. L Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*. P Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*. N Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*. C Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*. <sup>a</sup> significant difference with other.

**Table S2** 454 primer set sequences and barcode

primer_forward 16s bacteria	Pos	Pool	MID Sequence	primer	Fusion MID+Template	length
MID1_16S-0027F	A1	1	ACGAGTGCGT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGAGTGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID2_16S-0027F	A2	1	ACGCTCGACA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGCTCGACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID3_16S-0027F	A3	1	AGACGCACTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGACGCACTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID4_16S-0027F	A4	1	AGCACTGTAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGCACTGTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID5_16S-0027F	A5	1	ATCAGACACG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATCAGACACGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID6_16S-0027F	A6	1	ATATCGCGAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATATCGCGAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID7_16S-0027F	Ab1	1	CGTGTCTCTA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CGTGTCTCTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID8_16S-0027F	Ab2	1	CTCGCGTGTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CTCGCGTGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID9_16S-0027F	Ab3	1	TAGTATCAGC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TAGTATCAGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID1_16S-0027F	Ab4	2	ACGAGTGCGT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGAGTGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID2_16S-0027F	Ab5	2	ACGCTCGACA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGCTCGACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID3_16S-0027F	Ab6	2	AGACGCACTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGACGCACTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID4_16S-0027F	L1	2	AGCACTGTAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGCACTGTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID5_16S-0027F	L2	2	ATCAGACACG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATCAGACACGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID6_16S-0027F	L3	2	ATATCGCGAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATATCGCGAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID7_16S-0027F	L4	2	CGTGTCTCTA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CGTGTCTCTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID8_16S-0027F	L5	2	CTCGCGTGTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CTCGCGTGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID9_16S-0027F	L6	2	TAGTATCAGC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TAGTATCAGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID1_16S-0027F	P1	3	ACGAGTGCGT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGAGTGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID2_16S-0027F	P2	3	ACGCTCGACA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGCTCGACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID3_16S-0027F	P3	3	AGACGCACTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGACGCACTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID4_16S-0027F	P4	3	AGCACTGTAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGCACTGTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID5_16S-0027F	P5	3	ATCAGACACG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATCAGACACGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID6_16S-0027F	P6	3	ATATCGCGAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATATCGCGAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID7_16S-0027F	N1	3	CGTGTCTCTA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CGTGTCTCTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID8_16S-0027F	N2	3	CTCGCGTGTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CTCGCGTGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID9_16S-0027F	N3	3	TAGTATCAGC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TAGTATCAGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID1_16S-0027F	N4	4	ACGAGTGCGT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGAGTGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID2_16S-0027F	N5	4	ACGCTCGACA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGCTCGACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID3_16S-0027F	N6	4	AGACGCACTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGACGCACTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID4_16S-0027F	C1	4	AGCACTGTAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AGCACTGTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID5_16S-0027F	C2	4	ATCAGACACG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATCAGACACGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID6_16S-0027F	C3	4	ATATCGCGAG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ATATCGCGAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID7_16S-0027F	C4	4	CGTGTCTCTA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CGTGTCTCTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID8_16S-0027F	C5	4	CTCGCGTGTC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CTCGCGTGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID9_16S-0027F	C6	4	TAGTATCAGC	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TAGTATCAGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30

Habitat type: A Maquis dominated by *Araucaria Montana*. Ab bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*. L Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*. *Eucarpa deplanchei* and *Costularia sp.*. P Pre-forest dominated by *Tristaniopsis collobuxus*. N Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*. C Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*.

primer_reverse 16s bacteria	Pos	Pool	MID Sequence	primer	Fusion MID+Template	length
MID1_16S-0533R	A1	1	ACGAGTGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGAGTGC	29
MID2_16S-0533R	A2	1	ACGCTCGACA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGCTCGACATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID3_16S-0533R	A3	1	AGACGCACTC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGACGCACTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID4_16S-0533R	A4	1	AGCACTGTAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGCACTGTAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID5_16S-0533R	A5	1	ATCAGACACG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATCAGACACGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID6_16S-0533R	A6	1	ATATCGCGAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATATCGCGAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID7_16S-0533R	Ab1	1	CGTGTCTCTA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CGTGTCTCTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID8_16S-0533R	Ab2	1	CTCGCGTGTCT	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CTCGCGTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID9_16S-0533R	Ab3	1	TAGTATCAGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	TAGTATCAGCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID1_16S-0533R	Ab4	2	ACGAGTGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGAGTGC	29
MID2_16S-0533R	Ab5	2	ACGCTCGACA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGCTCGACATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID3_16S-0533R	Ab6	2	AGACGCACTC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGACGCACTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID4_16S-0533R	L1	2	AGCACTGTAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGCACTGTAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID5_16S-0533R	L2	2	ATCAGACACG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATCAGACACGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID6_16S-0533R	L3	2	ATATCGCGAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATATCGCGAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID7_16S-0533R	L4	2	CGTGTCTCTA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CGTGTCTCTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID8_16S-0533R	L5	2	CTCGCGTGTCT	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CTCGCGTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID9_16S-0533R	L6	2	TAGTATCAGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	TAGTATCAGCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID1_16S-0533R	P1	3	ACGAGTGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGAGTGC	29
MID2_16S-0533R	P2	3	ACGCTCGACA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGCTCGACATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID3_16S-0533R	P3	3	AGACGCACTC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGACGCACTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID4_16S-0533R	P4	3	AGCACTGTAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGCACTGTAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID5_16S-0533R	P5	3	ATCAGACACG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATCAGACACGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID6_16S-0533R	P6	3	ATATCGCGAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATATCGCGAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID7_16S-0533R	N1	3	CGTGTCTCTA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CGTGTCTCTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID8_16S-0533R	N2	3	CTCGCGTGTCT	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CTCGCGTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID9_16S-0533R	N3	3	TAGTATCAGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	TAGTATCAGCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID1_16S-0533R	N4	4	ACGAGTGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGAGTGC	29
MID2_16S-0533R	N5	4	ACGCTCGACA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ACGCTCGACATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID3_16S-0533R	N6	4	AGACGCACTC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGACGCACTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID4_16S-0533R	C1	4	AGCACTGTAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	AGCACTGTAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID5_16S-0533R	C2	4	ATCAGACACG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATCAGACACGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID6_16S-0533R	C3	4	ATATCGCGAG	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	ATATCGCGAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID7_16S-0533R	C4	4	CGTGTCTCTA	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CGTGTCTCTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID8_16S-0533R	C5	4	CTCGCGTGTCT	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	CTCGCGTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID9_16S-0533R	C6	4	TAGTATCAGC	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	TAGTATCAGCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29

Habitat type: A Maquis dominated by *Araucaria Montana*. Ab bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*. L Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia aliigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*. P Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*. N Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*. C Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*.

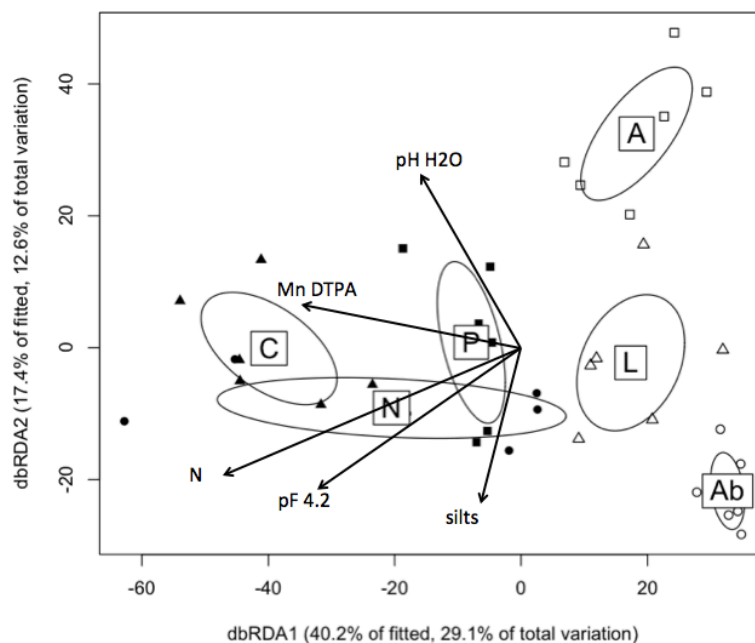
CHAPITRE 1 – ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES DES TOPSOILS

primer_forward ITS fungi	Pos	Pool	MID Sequence	primer	Fusion MID+Template	length
MID001_ITS3	A1	1	ACGAGTGCCT	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGACTACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID002_ITS3	A2	1	ACGCTCGACA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	CGTAGACTAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID003_ITS3	A3	1	AGACGCACTC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACGAGTATGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID004_ITS3	A4	1	AGCACTGTAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACTCTCGTGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID005_ITS3	A5	1	ATCAGACACG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TAGAGACGAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID006_ITS3	A6	1	ATATCGCGAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TCGTTCGCTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID007_ITS3	Ab1	1	CGTGTCTCTA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACATACGCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID008_ITS3	Ab2	1	CTCGCGTGTG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGCGAGTATGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID009_ITS3	Ab3	1	TAGTATCAGC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACTACTATGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID001_ITS3	Ab4	2	ACGAGTGCCT	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGACTACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID002_ITS3	Ab5	2	ACGCTCGACA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	CGTAGACTAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID003_ITS3	Ab6	2	AGACGCACTC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACGAGTATGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID004_ITS3	L1	2	AGCACTGTAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACTCTCGTGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID005_ITS3	L2	2	ATCAGACACG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TAGAGACGAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID006_ITS3	L3	2	ATATCGCGAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TCGTTCGCTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID007_ITS3	L4	2	CGTGTCTCTA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACATACGCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID008_ITS3	L5	2	CTCGCGTGTG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGCGAGTATGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID009_ITS3	L6	2	TAGTATCAGC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACTACTATGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID001_ITS3	P1	3	ACGAGTGCCT	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGACTACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID002_ITS3	P2	3	ACGCTCGACA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	CGTAGACTAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID003_ITS3	P3	3	AGACGCACTC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACGAGTATGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID004_ITS3	P4	3	AGCACTGTAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACTCTCGTGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID005_ITS3	P5	3	ATCAGACACG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TAGAGACGAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID006_ITS3	P6	3	ATATCGCGAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TCGTTCGCTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID007_ITS3	N1	3	CGTGTCTCTA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACATACGCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID008_ITS3	N2	3	CTCGCGTGTG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGCGAGTATGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID009_ITS3	N3	3	TAGTATCAGC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACTACTATGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID001_ITS3	N4	4	ACGAGTGCCT	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGACTACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID002_ITS3	N5	4	ACGCTCGACA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	CGTAGACTAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID003_ITS3	N6	4	AGACGCACTC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACGAGTATGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID004_ITS3	C1	4	AGCACTGTAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TACTCTCGTGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID005_ITS3	C2	4	ATCAGACACG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TAGAGACGAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID006_ITS3	C3	4	ATATCGCGAG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TCGTTCGCTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID007_ITS3	C4	4	CGTGTCTCTA	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACATACGCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID008_ITS3	C5	4	CTCGCGTGTG	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACGCGAGTATGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID009_ITS3	C6	4	TAGTATCAGC	GCATCGATGAAGAACGCAGC	ACTACTATGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30

Habitat type: A Maquis dominated by *Araucaria Montana*. Ab bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*. L Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia alitigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*. P Pre-forest dominated by *Tristaniopsis collobuxus*. N Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*. C Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*.

primer_rverse ITS fungi	Pos	Pool	MID Sequence	primer	Fusion MID+Template	length
MID001_ITS4	A1		1 ACGAGTGCGT	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGACTACAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID002_ITS4	A2		1 ACGCTCGACA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	CGTAGACTAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID003_ITS4	A3		1 AGACGCACTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACGAGTATGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID004_ITS4	A4		1 AGCACTGTAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACTCTCGTGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID005_ITS4	A5		1 ATCAGACACG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TAGAGACGAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID006_ITS4	A6		1 ATATCGCGAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TCGTGCTCGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID007_ITS4	Ab1		1 CGTGTCTCTA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACATACGCGTTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID008_ITS4	Ab2		1 CTCGCGTGTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGCGAGTATTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID009_ITS4	Ab3		1 TAGTATCAGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACTACTATGTTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID001_ITS4	Ab4		2 ACGAGTGCGT	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGACTACAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID002_ITS4	Ab5		2 ACGCTCGACA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	CGTAGACTAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID003_ITS4	Ab6		2 AGACGCACTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACGAGTATGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID004_ITS4	L1		2 AGCACTGTAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACTCTCGTGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID005_ITS4	L2		2 ATCAGACACG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TAGAGACGAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID006_ITS4	L3		2 ATATCGCGAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TCGTGCTCGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID007_ITS4	L4		2 CGTGTCTCTA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACATACGCGTTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID008_ITS4	L5		2 CTCGCGTGTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGCGAGTATTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID009_ITS4	L6		2 TAGTATCAGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACTACTATGTTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID001_ITS4	P1		3 ACGAGTGCGT	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGACTACAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID002_ITS4	P2		3 ACGCTCGACA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	CGTAGACTAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID003_ITS4	P3		3 AGACGCACTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACGAGTATGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID004_ITS4	P4		3 AGCACTGTAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACTCTCGTGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID005_ITS4	P5		3 ATCAGACACG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TAGAGACGAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID006_ITS4	P6		3 ATATCGCGAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TCGTGCTCGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID007_ITS4	N1		3 CGTGTCTCTA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACATACGCGTTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID008_ITS4	N2		3 CTCGCGTGTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGCGAGTATTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID009_ITS4	N3		3 TAGTATCAGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACTACTATGTTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID001_ITS4	N4		4 ACGAGTGCGT	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGACTACAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID002_ITS4	N5		4 ACGCTCGACA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	CGTAGACTAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID003_ITS4	N6		4 AGACGCACTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACGAGTATGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID004_ITS4	C1		4 AGCACTGTAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TACTCTCGTGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID005_ITS4	C2		4 ATCAGACACG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TAGAGACGAGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID006_ITS4	C3		4 ATATCGCGAG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	TCGTGCTCGTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID007_ITS4	C4		4 CGTGTCTCTA	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACATACGCGTTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID008_ITS4	C5		4 CTCGCGTGTC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACGCGAGTATTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID009_ITS4	C6		4 TAGTATCAGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACTACTATGTTCCCTCCGCTTATTGATATGC	30

Habitat type: A Maquis dominated by *Araucaria Montana*. Ab bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*. L Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia alitigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia sp.*. P Pre-forest dominated by *Tristaniopsis collobuxus*. N Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*. C Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*.



Distance based linear models							
<i>Resemblance worksheet</i>							
Name: Flora							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray Curtis similarity							
<i>Predictor variables worksheet</i>							
Name: Edaphic							
Data type: Environmental							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Normalise							
Selection criterion: R <sup>2</sup>							
Selection procedure: Step-wise							
SEQUENTIAL TESTS							
Variable	R <sup>2</sup>	SS trace	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+Ntot g/kg	0.25809	24862	11.827	0.001	0.25809	0.25809	34
+pH H2O	0.36517	10316	5.5668	0.001	0.10709	0.36517	33
+pF4.2	0.42538	5799.9	3.3528	0.002	6.0206E-2	0.42538	32
+silts %	0.4639	3710.9	2.2275	0.004	3.8521E-2	0.4639	31
+Mn mg/kg	0.49769	3255	2.018	0.017	3.3789E-2	0.49769	30
+Corg mg/kg	0.52141	2284.7	1.4371	0.095	2.3717E-2	0.52141	29
+K CE	0.54425	2200.6	1.4034	0.146	2.2843E-2	0.54425	28
+P mg/kg	0.56511	2009.1	1.2948	0.195	2.0856E-2	0.56511	27
+CEC méq%	0.58444	1862.1	1.2093	0.264	1.9329E-2	0.58444	26
+sands %	0.60473	1954.9	1.2835	0.201	2.0293E-2	0.60473	25
+ P.assim. mg/kg	0.6205	1518.9	0.99709	0.446	1.5767E-2	0.6205	24
+Fe mg/kg	0.63585	1478.9	0.9696	0.487	1.5351E-2	0.63585	23
+clay %	0.65126	1484.4	0.97204	0.426	1.5409E-2	0.65126	22
+Si g/kg	0.66477	1302.3	0.84684	0.621	1.3518E-2	0.66477	21
+Co mg/kg	0.67624	1104.7	0.70837	0.791	1.1467E-2	0.67624	20
+Ni mg/kg	0.68978	1304.6	0.82945	0.632	1.3543E-2	0.68978	19
+Mg méq%	0.70241	1216.6	0.76387	0.7	1.2629E-2	0.70241	18
+Ca méq%	0.7136	1077.8	0.6641	0.759	1.1188E-2	0.7136	17
+Cr mg/kg	0.72313	917.98	0.55069	0.864	9.5292E-3	0.72313	16

**Fig S2.** Distance based linear models between the floristic structure and the edaphic characteristics.

**Table S3** Summarize of sequencing data and relative abundance of major phyla

microbial domain	habitat	Mean of OTUs	Number total of OTUs	Proteobacteria	Acidobacteria	Actinobacteria	Planctomycetes	Verrucomicrobia	Chloroflexi	Others
Bacterial	A	2564.33 ±272.64a	10323.00	41.1 ±0.97a	22.51 ±1.24a	8.77 ±0.82a	11.87 ±0.78a	4.41 ±1.03a	4.56 ±0.88ab	6.77 ±1.2ab
	Ab	3625.83 ±153.96b	12579.00	35.97 ±0.95b	20.19 ±0.64ab	11.35 ±0.53bc	7.52 ±0.66b	4.79 ±0.36a	11.35 ±0.65c	8.83 ±1.37c
	L	2917.50 ±163.37a	12307.00	40.63 ±0.51a	17.97 ±1.52bc	10.02 ±0.6ab	11.02 ±0.63a	8.17 ±1.75a	6.4 ±1.19a	5.79 ±1.39a
	P	4730.67 ±588.76b	18386.00	40.63 ±1.58a	17.97 ±1.09abd	10.02 ±0.86ab	11.02 ±0.57a	8.17 ±2.13a	6.4 ±0.29a	5.79 ±0.9a
	N	4005.17 ±457.21b	15261.00	47.27 ±1.31c	16.3 ±0.88cd	12.5 ±0.77c	9.82 ±1.22ab	3.9 ±0.96a	3.28 ±0.24b	6.94 ±1.78a
	C	3018.00 ±264.49ab	11690.00	42.67 ±2.24ac	16.01 ±0.7c	9.07 ±1.04ab	9.09 ±1.26ab	7.98 ±2.05a	2.97 ±0.23b	12.22 ±4bc
	All	3476.92 ±316.74	40559.00	41.38 ±1.26	18.49 ±1.01	10.29 ±0.77	10.06 ±0.85	6.24 ±1.38	5.83 ±0.58	7.72 ±1.77
microbial domain	habitat	Mean of OTUs	Number total of OTUs	Ascomycota	Basidiomycota	Blastocladiomycota	Chytridiomycota	Glomeromycota	Zygomycota	unidentified
Fungal	A	714.00 ±36.08ac	2543.00	8.23 ±1.02a	81.18 ±0.64a	0.04 ±0.04a	0 ±0a	0.54 ±0.15a	5.82 ±0.71ab	4.17 ±0.61a
	Ab	546.60 ±61.57abc	1639.00	14.86 ±1.11b	74.14 ±2.04b	0 ±0c	0.04 ±0.04a	0.19 ±0.1a	6.62 ±1.23ab	4.15 ±0.56a
	L	533.67 ±34.09b	2069.00	8 ±1.37ac	82.7 ±1.9ac	0.08 ±0.08b	0 ±0a	0.42 ±0.14a	4.55 ±0.57ab	4.25 ±0.67ab
	P	965.25 ±101.02c	2702.00	6 ±1.17ac	83.31 ±1.77ac	0 ±0c	0 ±0a	0.45 ±0.18a	6.04 ±0.76ab	4.2 ±0.56a
	N	909.33 ±132.20c	3261.00	3.96 ±1.09c	85.4 ±1.83c	0 ±0c	0.02 ±0.02a	0.34 ±0.23a	6.11 ±0.47a	4.18 ±0.59a
	C	636.00 ±67.91abc	1788.00	3.61 ±1.2ac	82.02 ±2.97abc	0 ±0c	0.09 ±0.05a	1.45 ±0.74a	3.9 ±0.89b	8.92 ±1.84ab
	All	712.26 ±42.67	9557.00	7.44 ±1.16	81.46 ±1.86	0.02 ±0.02	0.03 ±0.02	0.56 ±0.26	5.51 ±0.77	4.98 ±0.81

**Tab S4.** Results of the distance based linear models between the bacterial structure and the floristic characteristics.

Distance based linear models							
<i>Resemblance worksheet</i>							
Name: Bact							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray-Curtis similarity							
<i>Predictor variables worksheet</i>							
Name: Flora							
Data type: Abundance							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Transform: Square root							
Selection criterion: R <sup>2</sup>							
Selection procedure: Step-wise							
<i>SEQUENTIAL TESTS</i>							
Variable	R <sup>2</sup>	SS trace	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+Longetia buxoides	0.085777	9412.1	3.19	0.001	0.085777	0.085777	34
+Araucaria montana	0.14739	6760.3	2.3846	0.001	0.06161	0.14739	33
+Schoenus neocaledonicus	0.20578	6406.8	2.3525	0.001	0.058388	0.20578	32
+Cocconerion minus	0.25832	5765.7	2.1963	0.001	0.052546	0.25832	31
+Costularia comosa	0.29937	4504	1.7576	0.001	0.041047	0.29937	30
+Alyxia caletioides	0.33411	3811.7	1.5129	0.006	0.034738	0.33411	29
+Phyllanthus virgultiramus	0.367	3608.8	1.4548	0.004	0.032889	0.367	28
+Styphelia sp.	0.39894	3504.9	1.4348	0.012	0.031942	0.39894	27
+Garcinia balansae	0.42951	3354.7	1.3934	0.016	0.030573	0.42951	26
+Cannaeorchis aff polycladium	0.45796	3121.2	1.312	0.091	0.028445	0.45796	25
+Arthropodium sp.	0.48573	3047.8	1.2963	0.137	0.027776	0.48573	24
+Schoenus tendo	0.51362	3059.8	1.3186	0.102	0.027885	0.51362	23
+Styphelia macrocarpa	0.54097	3001.6	1.3111	0.165	0.027355	0.54097	22
+Earina deplanchei	0.56792	2956.5	1.3095	0.135	0.026944	0.56792	21
+Calophyllum caledonicum	0.59377	2837.3	1.2731	0.19	0.025858	0.59377	20
+Gleichenia dicarpa	0.61958	2831.9	1.289	0.184	0.025808	0.61958	19
+Blechnum obtusatum	0.64462	2747.5	1.2682	0.143	0.025039	0.64462	18
+Rauvolfia balansae	0.66935	2713.6	1.2715	0.192	0.02473	0.66935	17
+Beauprea gracilis	0.69279	2571.4	1.2205	0.239	0.023434	0.69279	16
+Hibbertia pancheri	0.71559	2502	1.2026	0.244	0.022802	0.71559	15
+Myrsine modesta var coraria	0.73842	2505.1	1.2219	0.248	0.02283	0.73842	14
+Comptonella sessilifoliola	0.75993	2360	1.1646	0.31	0.021508	0.75993	13
+Nothofagus codonandra	0.78136	2351.7	1.1763	0.298	0.021432	0.78136	12
+Elaphanthera baumannii	0.80247	2316.7	1.1758	0.363	0.021113	0.80247	11
+Myrsine sp.	0.82288	2239.6	1.1524	0.343	0.020411	0.82288	10
+Stenocarpus umbelliferus	0.84276	2181.2	1.1378	0.356	0.019879	0.84276	9
+Marsdenia sp.	0.86267	2184.9	1.16	0.319	0.019912	0.86267	8
+Polyscias dioica	0.88156	2072.2	1.1161	0.402	0.018885	0.88156	7
+Polyscias sp.	0.90022	2047.2	1.1219	0.402	0.018657	0.90022	6
+Endiandra baillonii	0.91772	1920.9	1.0639	0.429	0.017506	0.91772	5
+Hibbertia lucens	0.93409	1795.6	0.99307	0.368	0.016364	0.93409	4
+Styphelia veillonii	0.94968	1711.1	0.92973	0.47	0.015594	0.94968	3
+Scaevola sp.	0.9643	1603.9	0.81881	0.591	0.014617	0.9643	2
+Lycopodium deuterodensum	0.97667	1357.2	0.53011	0.6904	0.012369	0.97667	1



**Tab S5.** Results of the distance based linear models between the bacterial structure and the edaphic characteristics.

Distance based linear models							
<i>Resemblance worksheet</i>							
Name: Bact							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray-Curtis similarity							
<i>Predictor variables worksheet</i>							
Name: Edaphic							
Data type: Environmental							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Normalise							
Selection criterion: R <sup>2</sup>							
Selection procedure: Step-wise							
SEQUENTIAL TESTS							
Variable	R <sup>2</sup>	SS trace	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+pH H2O	0.087612	9613.4	3.2648	0.001	0.087612	0.087612	34
+Ntot g/kg	0.174	9478.9	3.4513	0.001	0.086386	0.174	33
+pF 4.2	0.22445	5536.2	2.0818	0.001	0.050454	0.22445	32
+Ca méq%	0.25813	3694.9	1.4071	0.008	0.033673	0.25813	31
+CEC méq%	0.29213	3731.7	1.4413	0.003	0.034009	0.29213	30
+silts %	0.32242	3323.3	1.2963	0.023	0.030287	0.32242	29
+clay %	0.35011	3038.3	1.193	0.092	0.027689	0.35011	28
+Al mg/kg	0.37801	3061.3	1.2111	0.1	0.027899	0.37801	27
+Ni mg/kg	0.40392	2842.9	1.1301	0.214	0.025909	0.40392	26
+K méq%	0.43028	2893.1	1.157	0.197	0.026366	0.43028	25
+Corg mg/g	0.45516	2729.3	1.0957	0.302	0.024874	0.45516	24
+Fe mg/kg	0.47776	2480.2	0.99549	0.509	0.022604	0.47776	23
+sands %	0.50071	2517.8	1.0111	0.459	0.022946	0.50071	22
+Mg méq%	0.52336	2485.3	0.99793	0.509	0.02265	0.52336	21
+Co mg/kg	0.54553	2433.3	0.97591	0.537	0.022176	0.54553	20
+Na méq%	0.56769	2431.2	0.9738	0.545	0.022157	0.56769	19
+Mn mg/kg	0.58993	2440.1	0.97611	0.516	0.022238	0.58993	18
+Cr mg/kg	0.61335	2569.6	1.0296	0.448	0.023418	0.61335	17
+P.assim. mg/kg	0.63207	2055	0.81442	0.716	0.018728	0.63207	16

**Tab S6.** Results of the distance based linear models between the fungi structure and the floristic characteristics.

Distance based linear models							
<i>Resemblance worksheet</i>							
Name: Fungi							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray-Curtis similarity							
<i>Predictor variables worksheet</i>							
Name: Flora							
Data type: Abundance							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Transform: Square root							
Selection criterion: R <sup>2</sup>							
Selection procedure: Step-wise							
<i>SEQUENTIAL TESTS</i>							
Variable	R <sup>2</sup>	SS trace	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+Basselinia pancheri	0.084112	9024.6	2.6633	0.001	0.084112	0.084112	29
+Myrsine diminuta	0.16964	9176.5	2.884	0.001	0.085528	0.16964	28
+Nothofagus balansae	0.24011	7561.1	2.504	0.001	0.070472	0.24011	27
+Cocconerion minus	0.2991	6329.5	2.1884	0.001	0.058993	0.2991	26
+Costularia comosa	0.35592	6096	2.2053	0.001	0.056816	0.35592	25
+Styphelia sp.	0.39609	4310.2	1.5965	0.002	0.040172	0.39609	24
+Dicranopteris linearis	0.43186	3837.1	1.4478	0.007	0.035763	0.43186	23
+Citronella macrocarpa	0.46221	3257	1.2418	0.074	0.030356	0.46221	22
+Polyscias dioica	0.49172	3166.3	1.2193	0.115	0.029511	0.49172	21
+Austrobuxus eugeniifolius	0.52144	3188.1	1.2418	0.132	0.029714	0.52144	20
+Arthropodium sp.	0.55091	3161.6	1.2467	0.161	0.029467	0.55091	19
+Wikstroemia indica	0.57985	3105.6	1.2401	0.154	0.028945	0.57985	18
+Stenocarpus umbelliferus	0.60769	2987.5	1.2066	0.201	0.027845	0.60769	17
+Costularia arundinacea	0.6374	3187	1.3107	0.139	0.029704	0.6374	16
+Styphelia veillonii	0.66368	2820.2	1.1723	0.269	0.026285	0.66368	15
+Hibbertia pancheri	0.69068	2896.7	1.222	0.228	0.026998	0.69068	14
+Elaeocarpus kaalaensis	0.71711	2835	1.2143	0.29	0.026424	0.71711	13
+Eriaxis rigida	0.74353	2835	1.2363	0.243	0.026423	0.74353	12
+Osmanthus austrocaledonicus	0.7677	2593.7	1.1447	0.328	0.024174	0.7677	11
+Guettarda ngoyensis	0.79265	2676.8	1.2032	0.3	0.024949	0.79265	10
+Freycinetia sp.	0.81583	2487.1	1.1328	0.377	0.02318	0.81583	9
+Elaeocarpus alaternoides	0.83878	2462.6	1.139	0.377	0.022952	0.83878	8
+Scaevola sp.	0.86099	2382.9	1.1184	0.371	0.022209	0.86099	7
+Endiandra baillonii	0.8829	2350.4	1.1225	0.379	0.021906	0.8829	6
+Dracophyllum ramosum	0.90399	2262.8	1.0983	0.391	0.02109	0.90399	5
+Lycopodium deuterodensum	0.92439	2188.3	1.0789	0.411	0.020396	0.92439	4
+Polyscias sp.	0.94436	2143.4	1.0772	0.408	0.019977	0.94436	3
+Schoenus neocaledonicus	0.96151	1840.1	0.89126	0.517	0.01715	0.96151	2
+Dacrydium balansae	0.97703	1664.8	0.67554	0.6936	0.015517	0.97703	1

**Tab S7.** Results of the distance based linear models between the fungi structure and the edaphic characteristics.

Distance based linear models							
<i>Resemblance worksheet</i>							
Name: Fungi							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray-Curtis similarity							
<i>Predictor variables worksheet</i>							
Name: Edaphic							
Data type: Environmental							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Normalise							
Selection criterion: R <sup>2</sup>							
Selection procedure: Step-wise							
<i>SEQUENTIAL TESTS</i>							
Variable	R <sup>2</sup>	SS trace	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+pH H2O	0.093711	10055	2.9986	0.001	0.093711	0.093711	29
+Ntot g/kg	0.17726	8963.7	2.8432	0.001	0.083545	0.17726	28
+Ca méq%	0.22619	5250	1.7073	0.002	0.048932	0.22619	27
+Al mg/kg	0.27135	4845.2	1.6114	0.005	0.045159	0.27135	26
+Fe mg/kg	0.31037	4187.2	1.4148	0.017	0.039026	0.31037	25
+pF 4.2	0.3437	3575.2	1.2185	0.114	0.033322	0.3437	24
+Mg méq%	0.37652	3521.8	1.2109	0.123	0.032824	0.37652	23
+Corg mg/g	0.40843	3423.5	1.1866	0.164	0.031908	0.40843	22
+silts %	0.43934	3316.8	1.1579	0.234	0.030913	0.43934	21
+sands %	0.46989	3277.3	1.1524	0.245	0.030545	0.46989	20
+Na méq%	0.4987	3091.3	1.092	0.324	0.028812	0.4987	19
+Ni mg/kg	0.52467	2786.5	0.98348	0.524	0.025971	0.52467	18
+Mn mg/kg	0.55153	2882.1	1.0183	0.456	0.026862	0.55153	17
+Cr mg/kg	0.58122	3185.6	1.1344	0.306	0.029691	0.58122	16
+clay %	0.60739	2807.3	0.99964	0.503	0.026165	0.60739	15
+Co mg/kg	0.63293	2740.9	0.97432	0.512	0.025546	0.63293	14
+CEC méq%	0.66129	3043	1.0886	0.393	0.028361	0.66129	13
+K méq%	0.68619	2671.2	0.95203	0.52	0.024896	0.68619	12
+P.assim. mg/kg	0.70986	2539.8	0.89748	0.579	0.023672	0.70986	11

## **Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia**

**Running head:** Koniambo's seed bank in New Caledonia

Bordez Laurent<sup>1, 3, †</sup>, Mewissen Romain<sup>1</sup>, Fogliani Bruno<sup>2</sup>, L'Huillier Laurent<sup>2</sup>, Zongo Charly<sup>2</sup>, Wantiez Laurent<sup>1</sup>, Leveau Antoine<sup>3</sup>, Amir Hamid<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE), BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>2</sup> Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), « Diversités biologique et fonctionnelle des écosystèmes terrestres », BP 73, 98890 Paita, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup>Koniambo Nickel SAS (KNS), BP 696, 98860 Koné, Nouvelle-Calédonie.

<sup>†</sup> **Corresponding author:** Laurent Bordez. Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE), Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC), BP R4, Avenue James Cook, Nouméa 98851, Nouvelle-Calédonie. Tel. +687 29 02 72; Fax. +687 25 48 29. E-mail laurent.bordez@gmail.com

### **Author contributions:**

LB: paper writing, experiment achievement, data process and analyses. AH: PhD director, general coordinator of the study. AH, LL and BF: experiment design, paper writing management and paper review. LW: Statistical analyses. CZ, RM: experiment achievement, data process and analyses. LA: experiment design and paper review.

## Summary

This study aimed to investigate the spatial and temporal structure of the topsoil seed banks in six different ultramafic habitats and their potential for restoration. The seed banks were investigated using a greenhouse germination experiment and correlated with environmental factors of the Koniambo massif in New Caledonia. In other seed bank studies, large numbers of herbs and relatively small numbers of woody species emerged from the topsoil, even in communities where such species were dominant. Although floristic similarity between soil seed banks and corresponding aboveground vegetation was modest, significant differences in soil seed bank composition and density were detected between the open and closed habitats. This second group was the richest in species and seed density. The influence of the aboveground vegetation on the seed bank structure was stronger than edaphic characteristics. In addition, seed bank species richness and density correlated with the species richness and the abundance of vegetal cover. Finally, although no significant seasonal effect was found, variations were noticeable. Recommendations using topsoils in restoration operations after mining have been developed based on the study results.

**Keywords:** seed bank, topsoil, mining restoration, ultramafic ecosystems

## Highlights

- We suggest that the separation of topsoils with clearly distinct seed banks from open to closed habitats may help recreate spatial patterns of vegetation types following mining.
- We demonstrated that the use of non-stored topsoil in restoration practices can increase species diversity but is insufficient because the expressed diversity is dominated by only 3 to 4 Cyperaceae species.

- We suggest that plantation or seeding of other native species is needed to complete the restoration process.
- We demonstrated that there is a temporal structure of the topsoil seed bank for some habitats. We suggest using these results to manage the topsoil stripping time of these habitats, and for the management of the plantation or seeding of other additional native species.

## **Introduction**

The role of topsoil as a reservoir/source of seeds and vegetative propagules of indigenous plant species has been long recognized (Wade & Thompson 1990). Seed inputs into the topsoil seed bank are determined by seed rain from the standing vegetation (Salazar et al. 2011). Because the topsoil seed bank may reflect the specific range of plant species they support, the ex-situ transplantation of the topsoil seed bank is a recommended technique for restoration of vegetation of degraded lands across the world, particularly for the restoration of mining degraded land (Sheoran et al. 2010; Ghose, 2012). The use of a topsoil seed bank is a restoration method for species diversity and plant communities that have proven to be more effective than traditional planting and seeding techniques in a wide range of temperate or tropical ecosystems (Koch 2007; Scoles-Sciulla & DeFalco 2009; Hall et al. 2010). Bradshaw (2000) and Alday et al. (2011) demonstrated that the topsoil seed bank favors the rapid installation of vegetation and natural process of succession plants. Martínez-Ruiz & Fernández -Santos (2005) and Borůvka et al. (2012) found that the topsoil seed bank promotes the establishment of native species perfectly adapted to local conditions and substrates. A topsoil seed bank may also be the only means of reintroduction for native and endemic plant species with limited commercial availability and/or exceptional difficulty in initial establishment via conventional revegetation techniques (Mackenzie & Naeth 2010). Finally, the use of a seed bank of topsoil transplantation is considered one of the efficient restoration techniques for degraded lands.

Many studies have demonstrated seed bank variation at (i) different spatial (Lortie et al. 2005) or (ii) temporal scales (Caballero et al. 2008) as well as (ii) variability in the restoration potential (Van Etten et al. 2014) and its role in the determination of the restored plant communities (Fenner & Thompson 2005). For example, (i) Maza-Villalobos et al. (2011) and Gomaa (2012) reported a change in the species composition of the topsoil seed

bank along a vegetation successional gradient in the drylands of Mexico and in arid habitats of Egypt respectively. (ii) Pérez and Santiago (2001) and Meave et al. (2012) reported a seasonal effect on the soil seed bank species richness. In contrast, Maza-Villalobos et al. (2011) found no seasonal effects. (iii) Dalling & Denslow (1998), Alvarez-Aquino et al. (2014) demonstrated a limited recovery potential of topsoil seed banks in tropical dry forests of Mexico. Conversely, Koch (2007) found that the use of topsoils in Australia allowed the return of approximately 70% of species richness, suggesting a good potential for restoration. Therefore, characterization of the seed bank and its variation within and between spatial and temporal scales is now recognized as a key indicator in the evaluation of the potential for restoration of plant communities (Martinez-Duro et al., 2012). Those studies are important to optimize the management methods of the topsoil seed bank or predict which species are unlikely to respond to the topsoil transplantation method so they can be restored by other means (Van Etten et al. 2014).

Ultramafic ecosystems cover one-third of the main island in New Caledonia, a tropical archipelago located in the South Pacific Ocean (Latham, 1986). Those ultramafic soils include one-quarter of the world nickel (Ni) reserves (International Nickel Study Group 2014), and associated ecosystems are recognized as a hotspot of metallophytic flora (Whiting et al. 2004), represented by 2,150 species with 82% of endemism (Jaffré & L'Huillier 2010). As global Ni demand increases, the rapid development of the local mining industries causes the accelerated decline of New Caledonian ultramafic ecosystems. Thus, the country must develop techniques to restore degraded mining lands. The use of the topsoil seed bank to restore degraded mining lands in New Caledonia only began in the 2000s, and both the characteristics and results have been heterogeneous. Moreover, little research on the soil seed bank has been conducted (L'Huillier 2007). Based on previous results, this study aimed to assess the spatial and seasonal dynamics of the topsoil seed bank across six habitat types



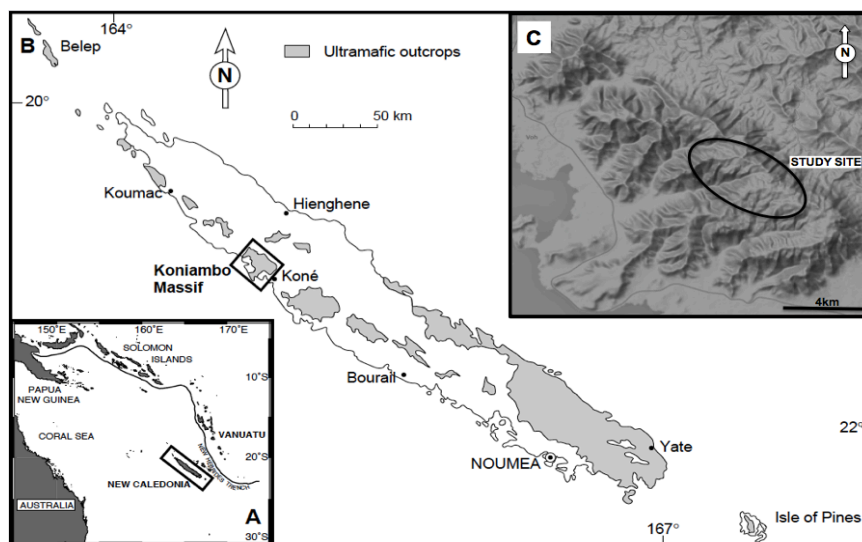
along a successional gradient. Using an emergent seed bank experiment in a greenhouse, we determined the abundance and composition of the seed bank across an ultramafic ecosystem of the Koniambo massif in New Caledonia. The restoration potential was evaluated by comparing the seed bank to the vegetal cover of each habitat. The objective was to characterize the topsoil seed bank structure and its implications for explaining the processes facilitating vegetation succession from shrubland to forest on these ultramafic substrates. We also intended to analyze improvement of approaches to successful revegetation following nickel mining. A central research question as suggested by Van Etten et al. (2014) is whether separating topsoils taken from clearly different habitats is worthwhile to help recreate spatial patterns of vegetation types that were present before mining.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study sites and sampling**

The study area is located in the North province of New Caledonia on the Koniambo massif (20°56'08"S; 164°43'55"E; altitude 460–930 m; Fig. 1). The mean annual precipitation is 957 mm (range per month: 45–270 mm), with a dry season from July to November. The mean minimum and maximum temperatures are 14 °C and 22 °C, respectively. The dominant soil units are ferralitic soil (Perrier 2005), corresponding to ferralsols in the world database (FAO, 2014), which are developed from ultramafic rocks. In this area, we investigated the topsoil seed bank of six topsoil types that are each associated with specific vegetation communities and are considered one habitat. Each habitat was named according to the dominant vascular species found, and two plant formations were considered. In the open plant formation, bare soil or rock is exposed between plants, grouped as a maquis dominated by *Araucaria montana* (A); a maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii* (Ab) and a maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* spp. (L). In the closed

plant formation, the vegetation cover is continuous, grouped as a pre-forest maquis dominated by *Tristaniopsis callobuxus* (P), a forest dominated by *Nothofagus codonandra* and *Nothofagus balansae* (N) and a forest dominated by *Cocconerion minus* and *Dacrydium balansae* (C). These habitats represent different stages of plant succession (Roche 2004), from scrub to forests, which become more complex and diversified. These habitats are described in Table 1. In each habitat, six plots of 10 x 10 m, corresponding to six replicates, were chosen randomly. To evaluate the influence of the established vegetation on the topsoil seed bank, the composition of the vegetation of each plot was evaluated using the Braun-Blanquet abundance scale (Meddour, 2011).



**Fig. 1** (A) Location of New Caledonia in the South West Pacific. (B) Map of the ultramafic outcrops of New Caledonia (in grey). (C) Shaded relief map of the Koniambo Massif with study site location.

**Table 1.** Descriptions of the habitat types investigated

<b>Successional stage</b>	<b>Description</b>
<b>(Ab)</b> Bushy shrub maquis dominated by <i>Tristaniopsis guillainii</i>	On plateaus. Widely open group (bare soil > 35%) from 50 cm to 1.5 m in height. Characterized by an extreme reduction herbaceous whose recovery rate does not exceed 5% and a shrub stratum > 50%.
<b>(L)</b> Ligno-herbaceous maquis dominated by <i>Hibbertia altigena</i> , <i>Eucarpha deplanchei</i> and <i>Costularia</i> spp.	On slopes. Significant development of the herbaceous layer (>50%). The low shrub layer (1.20 m average) is discontinuous and has a recovery rate lower than the herbaceous layer. With light demanding, mesophilic and pioneers species and larger species. Bare soil > 10%
<b>(A)</b> Maquis dominated by <i>Araucaria montana</i>	On the ridges and submittal plateaus. Characterized by an <i>Araucaria</i> tree stratum dominating a heterogeneous ligno-herbaceous or shrub stratum. Consisting mainly of orophiles small species or creeping. Bare soil > 10%. Group close to the previous.
<b>(P)</b> Pre-forest maquis dominated by <i>Tristaniopsis callobuxus</i>	Located on the edge of forest formations. Maquis higher and denser than the previous two types. Extremely diverse. The shrub layer is larger (two-thirds of the surface), dominated by <i>Tristaniopsis callobuxus</i> . One-third is covered by a herbaceous layer. No tree layer.
<b>(N)</b> Forest dominated by <i>Nothofagus codonandra</i> and <i>Nothofagus balansae</i>	In zone troughs. Some maquis species ( <i>Tristaniopsis guillainii</i> and <i>Tristaniopsis callobuxus</i> ) represented by trees from 8 to 10 m, associated with forest species. Facies dominated by <i>Nothofagus</i> ( <i>Nothofagus codonandra</i> and <i>N. balansae</i> )
<b>(C)</b> Forest dominated by <i>Cocconerion minus</i> and <i>Dacrydium balansae</i>	Same features as above. Facies dominated by <i>Cocconerion cf. minor</i> and <i>Dacrydium balansae</i>

The groups that ranged from 200 m to 900 m above sea level, occupying the slopes and hills lateritic soils.

To test the seasonal effect, soil samples from each plot were collected every 3 months; i.e., four times from August 2012 to June 2013. Within each 100 m<sup>2</sup> plot, 5 cm diameter soil cores were taken at a depth of 15 cm where the most viable seeds are known to be located (Gobat et al. 2010) using an auger before being homogenized (Ter Heerdt et al. 1996). Twelve systematically distributed cores were collected in each plot and aggregated to form a composite sample. A part of each topsoil sample was sent to the IRD analytical laboratory in Nouméa for characterization of the physicochemical properties according to the method described in Perrier et al. (2006). The following characteristics were performed: pF4.2, pH H<sub>2</sub>O, organic C, total N, available P (Olsen), total P, diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) extractable metals (Mn, Ni, Fe, Cr, Co), exchangeable K, Ca, Mg, total Si, CEC and granulometry (clays, silts and sands). Full physical and chemical characteristics of the soil samples are reported in Table S1.

### **Seed germination identification**

The topsoil samples were transported in a non-temperature controlled greenhouse located at the bottom of the massif. They were placed in trays (L38 x W124 x H8 cm) containing 2 cm of vermiculite for better drainage and retention of humidity, in layers approximately 2 cm in depth. Six control trays with autoclaved sterilized sampled soil were located randomly in the greenhouse to determine the presence of airborne seeds. To avoid overestimating the seed bank density for those species, all individuals that appeared in control trays were removed from the plot trays and were not counted. A regular sprinkler watered the trays for 5 minutes four times a day to keep samples in wet soil (Flow 80 L.h<sup>-1</sup>; Rain Bird series WP4, Azusa, CA, USA). Seedlings were counted, and identified seedlings were removed regularly. Seedlings were left in place until identification was possible. The germination experiment was conducted for 12 months for each sampling season from August

2, 2012 to July 15, 2014. During this period, the temperature in the greenhouse varied from 15° C to 25° C, consistent with the local temperature averages on the massif. At the end of each experiment, one soil tray from each habitat was randomly selected for each season to be sampled using the flotation method to determine if viable seeds remained (Mesgaran et al. 2007). A portion (450 g) of the tray soil was sieved (60-mesh) and washed with running water. The residues were placed in centrifugal tubes, and 100 mL of saccharose flotation solution was added (specific gravity 2 g.mL<sup>-1</sup>). The soil and solution mixture was homogenized and subjected to centrifugation at 2,408 g for 10 minutes. Supernatants were filtered, and seeds were counted and identified using a binocular stereomicroscope with variable magnification. No remaining seeds were found in the remaining soils.

### **Statistical analyses**

The data for each year were analyzed together first, followed by the data for each season. The germination seed values were converted to square meters to reflect seed density in the topsoil *in vivo* and to allow for comparisons with other studies. We used several multivariate statistical analyses for habitat comparisons for the three groups of parameters (i.e., physico-chemical, floristic and seed bank), using the PRIMER-6 software package (Clarke & Warwick, 2001), (Primer-E Ltd, 239 Plymouth, U.K.). First, Hellinger transformed data (square root of relative abundance) were used to generate Bray-Curtis dissimilarity matrices, except for the physico-chemical, for which a Euclidian dissimilarity matrix was generated. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis was performed using all distance matrices between different habitats, and the statistical significance was tested through permutational analysis of variance (PERMANOVA) (Anderson, 2001). Thus, the species richness, seedling density, and the species abundance and growth forms of the six habitats were compared. The growth form was defined according to the botany habit by stratum to

which the adult species belonged for each botany habit, by reference to the flora of New Caledonia (L’huillier et al., 2010; Suprin 2011a, 2011b). Three growth form groups were chosen: herbs (group forbs and grasses,  $\leq 1.5$  m), shrubs ( $\leq 7$  m) and trees ( $\geq 7$  m). The specific group liana was added to take into account this particular growth form type.

We used Relate tests to test for statistical significance between the composition of the topsoil seed bank per habitat and soil characteristics and aboveground vegetation (Primer V6). If significant, we created a distance-based linear model (distLM) to characterize the relationship and keep the significant descriptor for a  $p < 0.05$ . In addition, we performed Spearman correlation tests to investigate the supplementary relationship and details of the previous analysis between the biological and edaphic characteristics.

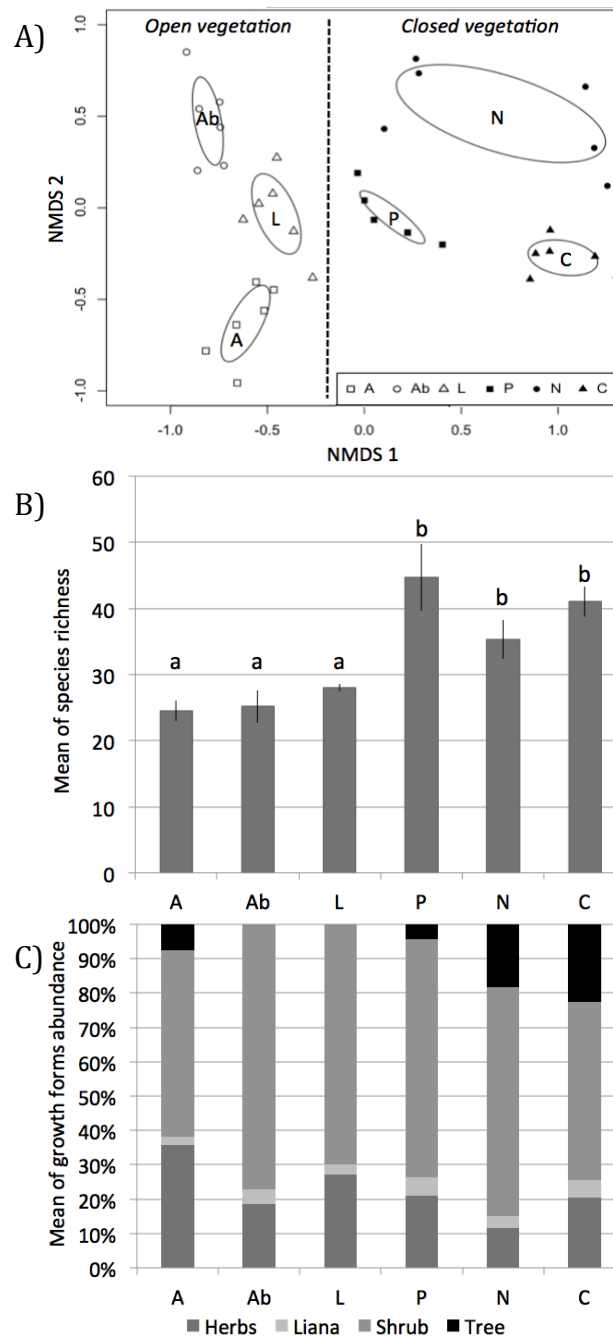
## RESULTS

### Plant community variations

A total of 206 species belonging to 66 families were recorded in the considered vegetation (Table 1) of the studied site (Fig. 1). The permutational analysis of species abundance variance revealed that a unique vegetation community characterized each habitat ( $P < 0.001$ ). This marked contrast is indicated by the nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot ordination of the vegetation-dissimilarity matrix (Fig. 2A). It illustrates the gradient of vegetal succession and opposes the habitat corresponding to the open vegetation (habitats A, Ab and L) and close vegetation (habitats P, N and C). The species richness per quadrat differed significantly between these two habitat groups from means of  $20.3 \pm 1.9$  to  $34.9 \pm 3.5$ , respectively (Fig. 2B).

The relative proportions of growth forms in the vegetal cover of the six habitats are displayed in Figure 2C, based on the abundance of species. The structures of growth forms differed significantly between all habitats ( $p < 0.05$ ). Shrubs were the dominant form in all habitats, which had a mean of  $64.4\% \pm 1.8$ , followed by herbs, with a mean cover of  $22.2\%$

±1.6. Only habitats A, P, N and C contained tree species. Lianas account for less than 5% in each habitat.



**Figure 2.** Vegetal cover characteristics for the different habitats. (A) Two-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of abundance of species per habitat. Linear fit,  $R^2 = 0.87$ . Ellipsoids represent the standard error confidence limit for ellipses per habitat (95%). The location of ellipsoids within each diagram indicates the degree of similarity between each one. (B) Mean of species richness ( $\pm$ SE). <sup>a</sup> indicates a significant difference. (C) Frequency distributions of growth forms among species based on the species abundance. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* and *Nothofagus balansae*) and C (Forest dominated by *Cocconerion minus* and *Dacrydium balansae*).

The Relate test revealed a significant relationship between aboveground vegetation and edaphic characteristics ( $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.27$ ). The distLM approach indicated that nitrogen, pH, pF4.2, silts and DTPA extractible Manganese significantly explained 50% of the vegetation community variability (26%, 11%, 6%, 4% and 3%, respectively,  $p < 0.001$ ; Table S2). Furthermore, the correlation Spearman test revealed a significant positive correlation between the abundance of vegetation and species richness of the vegetal cover with the fertility factors such as CEC, total nitrogen and organic carbon ( $\rho = 0.475$ ,  $0.773$  and  $0.773$ , respectively,  $p < 0.01$ ; Table S3).

### **Overall characterization of the seed bank**

A total of 5,154 seedling emergences were recorded from the soil seed bank of the six study habitats, corresponding to 17 families represented by 24 genera and 30 species (Table S4). Two species were only identified at the genera level (*Scaevola* sp. and *Smilax* sp.), and four species were not identified and named sp1 to sp4.

For the aboveground vegetation, the permutational analyses of species abundance of the seed bank distinguished the open habitat (A, Ab and L) and closed habitat (P, N and C;  $P < 0.001$ ). This finding is illustrated by the NMDS plot ordination of the seed bank-dissimilarity matrix (Fig. 3A). Species richness in the closed vegetation habitats differed significantly from the habitats associated with open vegetation (Fig. 3B). Mean species richness in the seed bank from the closed habitats P, N and C almost tripled the value observed for the seed bank of the open habitats A, Ab and L ( $2.4 \pm 0$  and  $0.9 \pm 0$ , respectively).

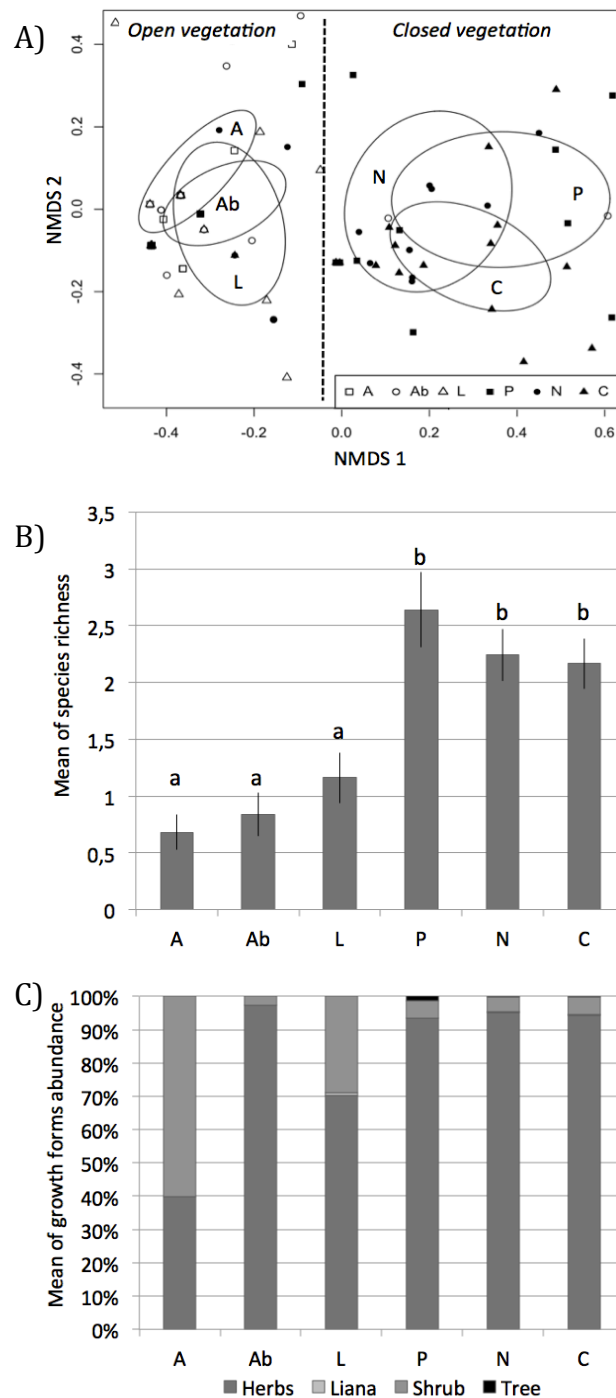
The aboveground vegetation exerted a stronger influence on the structure of the seed bank than edaphic characteristics (Relate test,  $p < 0.0001$ ,  $\rho = 0.30$  and  $p < 0.01$ ,  $\rho = 0.14$ ) (Table S3). The detailed analysis of the Spearman correlation highlighted other significant relationships between the seed bank and environmental characteristics.



Specifically, the density of the seed bank was positively correlated with the density and species richness of the vegetal cover ( $p < 0.001$ ,  $\rho = 0.79$  for both) and some edaphic characteristics (pF 4.2, organic carbon, total nitrogen, CEC, K, Ca, Mg, Mn, Ni, Co, Si, clays and silts;  $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.56, 0.67, 0.70, 0.46, 0.49, 0.49, 0.57, 0.47, 0.41, 0.56, 0.63, 0.39$  and  $0.45$ , respectively). In addition, the seed bank species richness was positively correlated with the same floristic variables (density and species richness of the vegetal cover,  $p < 0.0001$ ,  $\rho = 0.62, 0.59$ ) and with some edaphic characteristics (pF 4.2, Mn, Ni, Co, K, Ca, Si, clays, silts, N, C and  $p < 0.05$ ,  $\rho = 0.57, 0.51, 0.61, 0.50, 0.33, 0.37, 0.38, 0.5, 0.58$  and  $0.51$ , respectively).

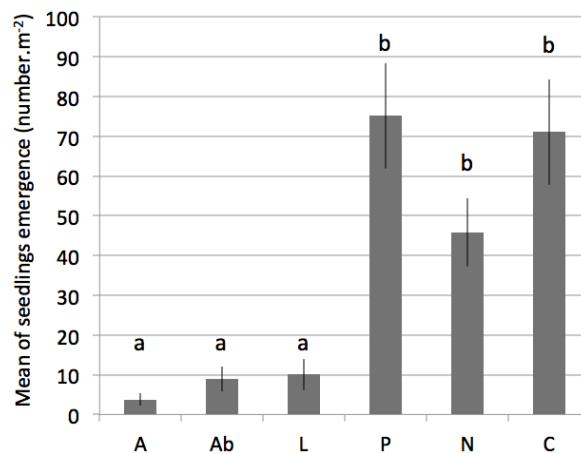
The relative proportions of growth forms in the seed banks of the six different topsoils are displayed in Figure 3C according to the number of seedlings per species. Herbs were the prevailing life form in the topsoil seed bank. They accounted for approximately 85% of habitats Ab, P, N and C, and approximately 65% of the A and L habitats. The second dominant life form was shrubs with 35% and 26% for the open habitats A and L, respectively, and approximately 13% in other sites. Trees were only present in the soil seed banks P (3.63%), N and C (less than 1%), corresponding to the closed vegetation. Liana was only present in the seed bank from habitats L, N and C and counted for less than 1%.

A significant difference in the species richness was detected in the mean seedling density between the seed banks associated with the open habitat (A, Ab and L) and the seed bank associated with the closed habitat (P, N and C;  $p < 0.01$ ; Fig. 4). On average, the seed bank from this second group produced eight times more germinant than the first group ( $64.0 \pm 9$  germ.m<sup>-2</sup> and  $7.6 \pm 2$  germ.m<sup>-2</sup>, respectively). The habitat dominated by *Araucaria montana* had the fewest emergences ( $3.8 \pm 2$  germ.m<sup>-2</sup>), and the seed bank associated with the pre-forest vegetation produced the most ( $75.1 \pm 13$  germ.m<sup>-2</sup>). Cyperaceae was the most represented family (6 species), followed by Rubiaceae (3 species; Table S4).



**Figure 3.** Seed bank characteristics for the different habitats. **(A)** Two-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of abundance of species per habitat. Linear fit,  $R^2 = 0.84$ . Ellipsoids represent the standard error confidence limit for ellipses per habitat (95%). The location of ellipsoids within each diagram indicates the degree of similarity between each one. **(B)** Mean of species richness ( $\pm$ SE). <sup>a</sup> indicates a significant difference. **(C)** Frequency distributions of growth forms among species based on the species abundance. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* and *Nothofagus balansae*) and C (Forest dominated by *Cocconerion minus* and *Dacrydium balansae*).

Cyperaceae accounted for 89.3% of the total germinations, whereas the remaining families accounted for less than 2% each. The most abundant species in the seed bank, regardless of standing vegetation or season, was *Machaerina deplanchei*, accounting for 70.4% of all emergences, followed by *Lepidosperma perteres* (9.0%), *Costularia comosa* (4.7%) and *Gahnia novocaledonensis* (3.0%). The remaining species accounted for less than 2% each. *Machaerina deplanchei* was the dominant species in each habitat, except for habitat A, where *Costularia comosa* was the dominant species.



**Figure 4.** Mean of seedling emergences ( $\pm$ SE). Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* and *Nothofagus balansae*) and C (Forest dominated by *Cocconerion minus* and *Dacrydium balansae*). <sup>a</sup> indicates a significant difference.

### Effect of habitat and season on the topsoil seed bank

The analysis of variance indicated that neither season nor the season-habitat interaction had significant effects on the seed bank seedling density and species richness (Table 2). Nonetheless, differences in the means calculated for these season variables were noticeable (Fig. 5A and 5B). The mean seedling densities or species richness in each habitat tended to be higher depending on the season. For those two variables, the highest values were observed for February for habitats A, L P and C, August for habitat Ab and August–

December for habitat N. Additionally, the mean seedling density and species richness were almost two to four times larger for the habitats associated with closed vegetation.

In contrast, the analysis of variance indicated that the habitat and season-habitat interaction had significant effects on the seed bank structure (Tab 2). A permanova test revealed significant differences between seasons for the sites Ab, P and N (Fig. S1). A Simper test demonstrated that the differences were mainly due to the composition and abundance of Cyperaceae (>70%). No differences were found for the sites A, L and C.

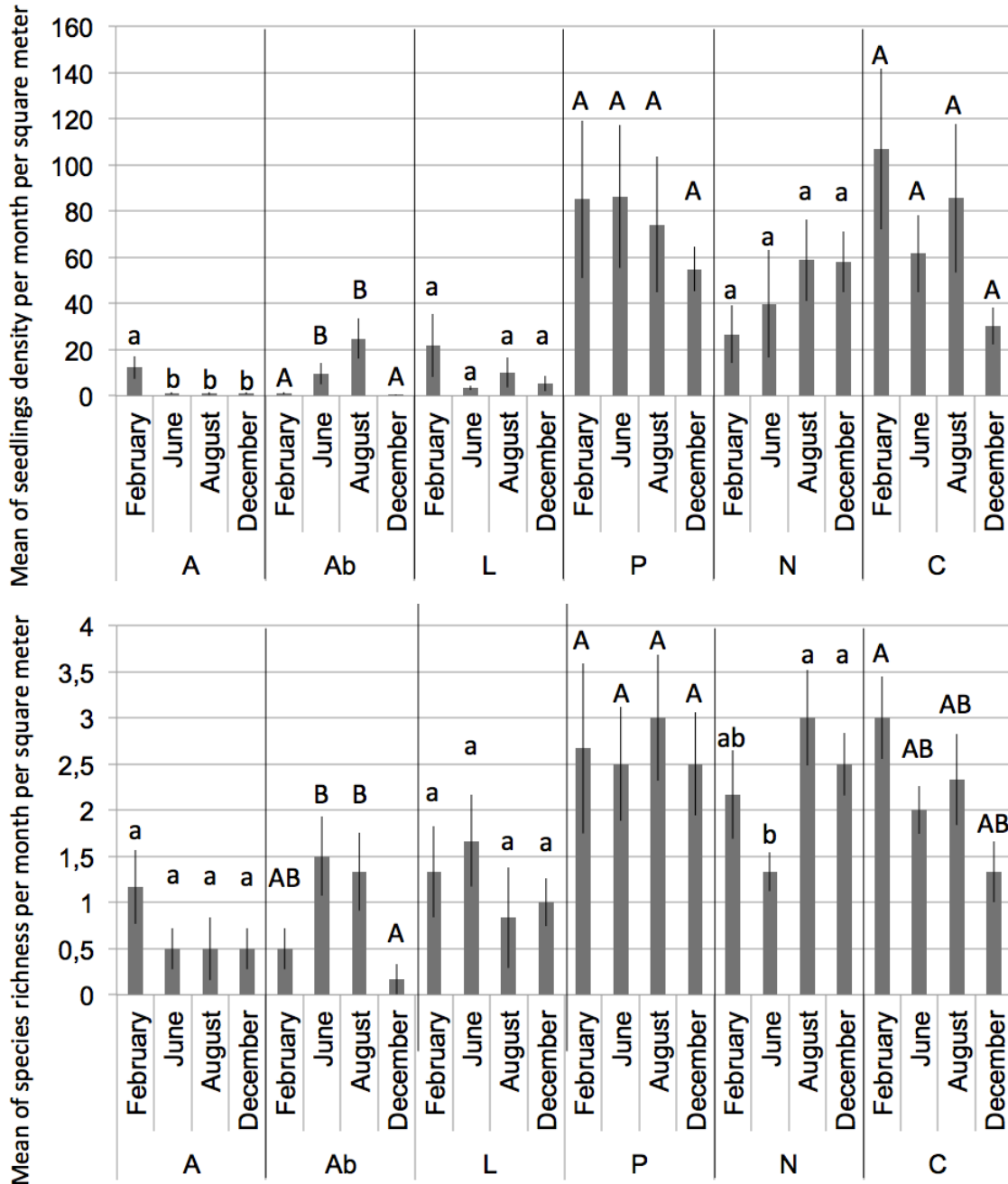
**Table 2.** Results of the PERMANOVAs performed to evaluate the effects of habitat and season on seedling density, species richness and structure in the seed banks of the study sites.

	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>Pseudo-F</b>	<b>P</b>
<b>DENSITY</b>				
<b>habitat</b>	5	203.75	22.59	***
<b>season</b>	3	8.84	0.98	0.40
<b>habitat * season</b>	15	13.8	1.53	0.10
<b>error</b>	120	9.02	-	-
<b>SPECIES</b>				
<b>habitat</b>	5	4.15	13.79	***
<b>season</b>	3	0.31	1.03	0.40
<b>habitat * season</b>	15	0.50	1.67	0.07
<b>error</b>	120	0.30	-	-
<b>STRUCTURE</b>				
<b>habitat</b>	5	19004	9.81	***
<b>season</b>	3	3383.7	1.75	0.38
<b>habitat * season</b>	15	2856	1.47	**
<b>error</b>	120	1936.9	-	-

#### Comparison of vegetation assessments

The species richness assessments in the greenhouse experiment were approximately 10–15 times lower than the corresponding aboveground vegetation for each habitat (Figs. 2B and 3B). The aboveground vegetation was dominated by shrubs, and the greenhouse soil seed bank was dominated by herbs for each habitat (Figs. 2C and 3C). Jaccard's index of similarity

was highest for the habitat A vegetal cover-greenhouse comparison (23.08) and lower for the habitat L vegetal cover-greenhouse comparison (21.43); it was the lowest for the habitat P vegetal cover-greenhouse comparison (15.09; Table S5).



**Figure 5.** Mean density ( $\pm$ SE) and mean species richness ( $\pm$ SE) of seedlings in the soil seed bank. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* and *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* and *Dacrydium balansae*). <sup>a</sup> indicates a significant difference. Significant differences are indicated for each habitat. The differences between habitats are detailed in Figures 3B and 4.

## DISCUSSION

### Seed bank size and composition

Both the total density of the seed bank in Koniambo topsoil and the number of species stored in it revealed similar results to the numbers reported by L'Huillier (2007) and Fogliani & L'Huillier (2011) for quite similar habitats in the South of the New Caledonia (19–168 seed.m<sup>-2</sup>, 24 species). Those values are known to vary greatly and to be dependent on community type, field conditions, sampling methods and duration of the experiment (Iverson & Wali, 1982). However, our results found lower values than many others recorded in other regions. Hall et al. (2010) reported 50–244 seed.m<sup>-2</sup> and 85 species in the Appalachian temperate forest seed bank in the USA. Koch et al. (1996) reported 212–424 seed.m<sup>-2</sup> and 32 species in the seed banks of the Mediterranean Jarrah forests in Australia. Chen et al. (2013) reported even higher values (2,154–3,284 seed.m<sup>-2</sup> and 41 species) in China's tropical rainforests. In the tropical dry forests of Mexico, Maza-Villalobos et al. (2011) reported values from 806 seed.m<sup>-2</sup> to 3.150 seed.m<sup>-2</sup> and 52 species.

The analysis of life forms confirmed the results obtained earlier in New Caledonia by Goxe (2010, *unpublished*), L'Huillier et al. (2010) and Fogliani & L'Huillier (2011). For all habitats, herbs and secondary shrubs dominated the seed bank. Only three species of trees have been found in the seed banks from closed habitats. In contrast, shrubs and secondary herbs dominated the vegetation of all habitats and many tree species were present in closed habitats. Thus, a slight similarity between the species composition of the seed bank and the vegetation cover has been found. This finding was confirmed by the Jaccard index for which the values below the minimum threshold of 25% tended to indicate that seed banks and plant cover formed species groups of different types (Hall et al. 2010). This result is consistent with the findings of most studies on seed banks, which demonstrated that the specific composition of the soil seed bank along a successional gradient is dominated by grasses with some rare

native forest species and which have reported only a slight similarity between the species composition of the seed bank and the vegetation cover (Erenler et al. 2010; Meave et al. 2012; Alvarez-Aquino et al. 2014).

The dominance of herbs in the seed bank can be explained by several factors, including the seeds' small size that allows them to better penetrate the soil and thus to escape predation (Khurana & Singh 2001), their orthodoxy conferring capacity to better tolerate desiccation that permits their conservation for a long period (Gomaa, 2012) and their reproductive strategies, with a short life cycle and production of large numbers of seeds (Chen et al. 2013). Conversely, the low representation of woody species in seed banks may be due to the rarity of seed dispersers such as birds, unlike for herbs that are mainly spread by wind (Rico-Gray & Garcia-Franco 1992), longer life cycles and the fewest number of seeds produced (Chen et al. 2013). The elimination of the seed bank by predation may also explain the dissimilarities between the seed bank and vegetation cover (Briones-Salas et al. 2006), including predation of large seeds and more produced by woody species (Bertiller 1998) and by small mammals or birds (Briones-Salas et al. 2006; Alvarez-Aquino et al. 2014). Other authors have demonstrated that the seed bank tends to fluctuate significantly in response to climatic events such as rainfall and disturbances in time (Page, 2009; Wright & Clarke 2009; Tessema et al. 2012). In addition, Bliss and Zedler (1997) and Marañón (1998), working in temperate conditions, reported that, only a part of the species present in the vegetation cover each year appears in the seed bank. Finally, a large portion of rare species in the vegetation cover may be absent in the seed bank due to their distance from the sample point, and this may accentuate the disparity between the assessed seed bank and vegetation cover (Amiaud & Touzard 2004).

### **Seed bank heterogeneity**

Our results indicated a spatial structure of the seed bank for species richness and the seed density. Along the successional gradient, the density and species richness of the seed bank increased significantly, and a marked contrast between open and closed habitats has been found. Similarly, the structure of the seed bank appeared significantly different between these two types of habitats. To understand this pattern, we attempted to characterize the relationship between the seed bank and the edaphic properties and vegetation cover of each habitat. The effect of aboveground vegetation was the most significant descriptor. These results corroborated a previous observation reported by Martinez-Duro et al. (2012) and Van Etten et al. (2014). Although weaker, the relationships with the edaphic characteristics were also significant. Our results are broadly consistent with previous studies indicating that the seed bank can be associated with changes of soil properties including the soil texture, the nutrients, the pH and the humidity. Goodson et al. (2001) reported that the persistence of the seed bank and the density and species richness improved with an aerated soil structure. In temperate deciduous forests, Leckie et al. (2000) found a positive correlation between the seed bank species richness with the soil nutrients and soil moisture. Miao and Zou (2009) reported an increase in the seed bank density with an increase in the soil nutrients in the Florida Everglades. In Europe, Bossuyt and Hermy (2001) reported that the soil acidification due to the coniferous forest litter may reduce the germination of the seed bank. The positive correlation observed between extractable heavy metal concentrations and seed bank size can be explained by the fact that these metals are released in the soil by microbial activity (Amir & Pineau 2003), which is positively correlated with soil fertility.

Furthermore, some of above edaphic factors are influenced by vegetation (Eviner & Chapin III, 2003). Our results also indicated a strong relationship between the vegetation cover and these edaphic factors. Many authors have reported that plants can influence soil



properties through litter and rhizodeposition, with changes in the rate and quality of substrate input due to variations in plant species composition and diversity. Binkley (1995) and Thomsen et al. (2003) reported that plant species can control physicochemical properties such as the soil pH, carbon to nitrogen ratio and texture. Such mechanisms may explain the greater influence of the vegetation cover than edaphic factors on the seed bank. At a landscape scale, we suggest that the seed banks in ultramafic ecosystems are mostly driven by plant communities. Our results support the existence of spatial covariation between plant communities and seed banks as reported in other studies for different environments (Lortie et al. 2005; Caballero et al. 2008; Goma 2012).

In contrast, no seasonal effect was found for the species richness and seed density or structure. However, an interaction between the season and habitat has been demonstrated for the structure of three habitats (i.e., Ab, P and N). The changes were mainly due to the structure of the herbs. This observation is opposite to others results, which have found differences between various seasons for some tropical ecosystems (Garwood, 1983; Dalling & Denslow 1998; Pérez & Santiago 2001) or Mediterranean ecosystems (Miao & Zou 2009). The absence of seasonal effects may be explained by the fact that the species found in the seed bank bear fruit several times a year, which is the case for many species found in the studied habitats (L'huillier et al., 2010; Suprin 2011a, 2011b). Other factors may also explain this lack of seasonal effect, such as the presence of dormant and orthodox seeds and the case of the Cyperaceae family and *Baumea* species (Lhuillier et al 2010). These seeds can then be maintained for long periods and germinate at the end of dormancy. Thus, the seed bank of this study could be predominated by *Baumea* that were scattered over several seasons and years. This feature could explain the dominance of these species in the seed bank because orthodox seeds germinate more easily and are non-dormant due to a rainfall event. Therefore, they would not be maintained in the seed bank from one season to another. Finally, the absence of

a seasonal effect could also be explained by the loss of non-dormant seeds that germinate quickly after their dispersion and then disappear from the seed bank (Esmailzadeh et al. 2011). In addition, if these non-dormant seeds are also recalcitrant, or not drought-tolerant, drought episodes that are slightly too long would cause their rapid death and disappearance from the seed bank. Research is currently underway in New Caledonia to complete our knowledge of the seed features.

### **Restoration potential**

The low species richness of the seed bank, including the absence of approximately 85% of the taxa of vegetation cover, is one of the main obstacles to the spontaneous regeneration of natural ecosystems from the topsoil seed bank. Thus, the topsoil seed banks of different habitats in our study appear to be an insufficient tool for the regeneration of vegetation present on ultramafic substrates. Therefore, any restoration plan that uses the topsoil seed bank as a seed source will necessarily require plantations or seed enrichment of other species to restore the original plant communities.

Nevertheless, the results of our study also highlight the advantages of the use of topsoil as a restoration tool. Although the species richness of the seed bank may appear low, it may increase the genetic variability of species introduced by traditional restoration methods, as suggested by Erenler et al. (2010) and Hall et al. (2010). Furthermore, traditional techniques are not known to be successful for 7 species in the seed bank (i.e., *Nepenthes vieillardii*, *Caladenia catenata*, *Smilax sp.*, *Dracophyllum verticillatum*, *Styphelia sp.*, *Guettarda ngoyensis* and *Ilex sebertii*). This finding suggests that the use of the topsoil seed bank can significantly increase the species richness of restored areas when coupled with traditional techniques. Additionally, the presence of some species of trees can provide early support in the restoration of forest communities (Chen et al. 2013). Moreover, herbs, which

are known to be pioneer species with the ability to move into open areas and difficult conditions, can have positive effects at the start of succession and may provide favorable conditions for the installation of successional species (Pearson et al. 2002; Lebrija-Trejos et al. 2011). Moreover, differences in the seed bank in relation to the settlement structures suggested that a separation of different topsoils from closed and open habitats might help restore these settings. However, Van Etten et al. (2014) demonstrated that the benefits of such practices also depend on the extent to which topo-hydrological conditions before mining can be recreated. The practice of segregation of topsoil from several habitats represents many logistical and financial challenges. Finally, although no significant seasonal effect has been detected, our results reveal trends that should help guide the restoration operators on the best periods for stripping topsoil, when a greater potential exists for its seed bank.

## **CONCLUSION**

This study used a greenhouse experiment to assess the structure and restoration potential of the topsoil seed bank across six habitats in an ultramafic ecosystem. First, the weak species richness of the different seed banks in this study highlighted the need to preserve large parts of the original vegetation to ensure a source of seeds and propagules for restoration. These results suggest that the seed banks of ultramafic topsoils in New Caledonia cannot independently restore the totality of the original plant communities and must be associated with other techniques. Second, we found that the vegetation cover, rather than edaphic characteristics, drives the structure of the seed bank at the ultramafic landscape scale. We suggest that the separation of the different types of topsoils with clearly distinct seed banks from open to closed habitats may help recreate spatial patterns of vegetation types following mining. Taking into account the results of this study may significantly improve the

methods currently implemented in New Caledonia for the restoration of degraded ultramafic sites.

### **Acknowledgements**

This study was conducted as part of an industrial agreement on training through research (CIFRE No. 2011/0861) involving Koniambo Nickel SAS and the University of New Caledonia. We thank Laurent Védi for his help to sampling, the chlorosphere team for their botanical inventory and the identification of germination. Special thanks to Liz Henriot and the tree nursery team for their help during the entire experiment.

### **Literature Cited**

- Alday JG, Marrs RH, Martínez-Ruiz C (2011) Vegetation succession on reclaimed coal wastes in Spain: the influence of soil and environmental factors. *Applied Vegetation Science* 14:84–94. doi: 10.1111/j.1654-109X.2010.01104.x
- Alvarez-Aquino C, Barradas-Sánchez L, Ponce-Gonzalez O, Williams-Linera G (2014) Soil seed bank, seed removal, and germination in a seasonally dry tropical forest in Veracruz, Mexico. *Botanical Sciences* 92:111–121
- Amiaud B, Touzard B (2004) The relationships between soil seed bank, aboveground vegetation and disturbances in old embanked marshlands of Western France. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199:25–35. doi: 10.1078/0367-2530-00129
- Amir H, Pineau R (2003) Release of Ni and Co by microbial activity in New Caledonian ultramafic soils. *Canadian Journal of Microbiology* 49:288–293. doi: 10.1139/w03-039
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32–46

- Bertiller MB (1998) Spatial patterns of the germinable soil seed bank in northern Patagonia. *Seed Science Research* 8:39–45. doi: 10.1017/S0960258500003895
- Binkley D (1995) The influence of tree species on forest soils: processes and patterns. Agronomy Society of New Zealand Special publication, Canterbury, New Zealand
- Bliss SA, Zedler PH (1997) The germination process in vernal pools, sensitivity to environmental conditions and effects on community structure. *Oecologia* 113:67–73. doi: 10.1007/s004420050354
- Borůvka L, Kozák J, Mühlhanslová M, Donátová H, Nikodem A, Němeček K, Drábek O (2012) Effect of covering with natural topsoil as a reclamation measure on brown-coal mining dumpsites. *Journal of Geochemical Exploration* 113:118–123. doi: 10.1016/j.gexplo.2011.11.004
- Bossuyt B, Hermy M (2001) Influence of land use history on seed banks in European temperate forest ecosystems: a review. *Ecography* 24:225–238. doi: 10.1034/j.1600-0587.2001.240213.x
- Bradshaw A (2000) The use of natural processes in reclamation - advantages and difficulties. *Landscape and Urban Planning* 51:89-100. doi: 10.1016/S0169-2046(00)00099-2
- Briones-Salas M, Sánchez-Cordero V, Sánchez-Rojas G (2006) Multi-species fruit and seed removal in a tropical deciduous forest in Mexico. *Canadian Journal of Botany* 84:433-442. doi: 10.1139/b06-020
- Caballero I, Olano JM, Escudero A, Loidi J (2008) Seed bank spatial structure in semi-arid environments: beyond the patch-bare area dichotomy. *Plant Ecology* 195:215–223. doi: 10.1007/s11258-007-9316-7
- Chen H, Cao M, Tang Y (2013) Soil seed banks in plantations and tropical seasonal rainforests of Xishuangbanna, Southwest China. *Journal of Tropical Forest Science* 25:375–386

- Clarke KR, Warwick RM (2001) *Change in Marine Communities: an Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. PRIMER-E, Plymouth, UK, 2nd edn.
- Dalling JW, Denslow JS (1998) Soil seed bank composition along a forest chronosequence in seasonally moist tropical forest, Panama. *Journal of Vegetation Science* 9:669-678. doi: 10.2307/3237285
- Erenler HE, Ashton PA, Gillman MP, Ollerton J (2010) Factors determining species richness of soil seed banks in lowland ancient woodlands. *Biodiversity and Conservation* 19:1631–1648. doi: 10.1007/s10531-010-9793-1
- Esmailzadeh O, Hosseini SM, Tabari M, Baskin CC, Asadi H (2011) Persistent soil seed banks and floristic diversity in *Fagus orientalis* forest communities in the Hyrcanian vegetation region of Iran. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206:365–372. doi: 10.1016/j.flora.2010.04.024
- Eviner VT, Chapin III FS (2003) Functional matrix: A conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:455–485. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132342
- FAO (2014) Classification des sols. <http://www.fao.org/soils-portal/etude-des-sols/classification-des-sols/fr/> (accessed: 16 October 2014)
- Fenner M, Thompson K (2005) *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Fogliani B, L’Huillier L (2011) Has the soil seed bank the capacity to restore high biodiversity areas? Some case studies from New caledonian ultramafic environment Communication, SER’s 4th World Conference on Ecological Restoration (Society for Ecological Restoration International) In: August 21-25, 2011, Merida, Mexico
- Garwood NC (1983) Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. *Ecological Monographs* 53:159-181. doi: 10.2307/1942493

- Ghose M (2012) Management of Topsoil: the Key Element in Reclamation of Mining Areas. Editions LAP Lambert. Academic Publishing, Saarbrücken, Germany
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2010) Le Sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. PPUR presses polytechniques, Lausanne, Switzerland
- Gomaa NH (2012) Soil seed bank in different habitats of the Eastern Desert of Egypt. Saudi Journal of Biological Sciences 19:211–220. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.01.002
- Goodson JM, Gurnell AM, Angold PG, Morrissey IP (2001) Riparian seed banks: structure, process and implications for riparian management. Progress in Physical Geography 25:301–325
- Hall SL, Barton CD, Baskin CC (2010) Topsoil Seed Bank of an Oak-Hickory Forest in Eastern Kentucky as a restoration tool on Surface Mines. Restoration Ecology 18:834–842. doi: 10.1111/j.1526-100X.2008.00509.x
- International Nickel Study Group (2014) Statistics. <http://www.insg.org/publist.aspx#> (accessed: 16 October 2014)
- Iverson LR, Wali MK (1982) Buried, viable seeds and their relation to revegetation after surface mining. Journal of Range Management 35:648–652. doi: 10.2307/3898656
- Jaffré T, L'Huillier L (2010) La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. Pages 45-103 In: Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: les *Milieux* sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Editions IAC, Noumea, New Caledonia
- Khurana E, Singh JS (2001) Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. Environmental Conservation 28:39-52. doi: 10.1017/S0376892901000042

- Koch JM (2007) Restoring a jarrah forest understorey vegetation after bauxite mining in Western Australia. *Restoration Ecology* 15:S26–S39. doi: 10.1111/j.1526-100X.2007.00290.x
- Koch JM, Ward SC, Grant CD, Ainsworth GL (1996) Effects of bauxite mine restoration operations on topsoil seed reserves in the jarrah forest of Western Australia. *Restoration Ecology* 4:368–376. doi: 10.1111/j.1526-100X.1996.tb00189.x
- L’Huillier L (2007) Assessment of soil seed banks for rehabilitation of nickel mines in New Caledonia. Page 51 In: Turner S, Merritt D, Clarke S, Commander L, Dixon K (eds) *Proceedings of the Seed Ecology. Conference, 9-13 September, Perth, Australia*. Kings Park and Botanic Garden, Perth, Australia
- L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (2010) *Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les Milieux sur substrats ultramafiques et Leur Restauration*. Editions IAC, Noumea, New Caledonia
- Latham M (1986) *Altération et pédogenèse sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie, Études et Thèses ORSTOM*. Noumé, New-Caledonia
- Lebrija-Trejos E, Pérez-García EA, Meave JA, Poorter L, Bongers F (2011) Environmental changes during secondary succession in a tropical dry forest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 27:477-489. doi: 10.1017/S0266467411000253
- Leckie S, Velland M, Bell G, Waterway MJ, Lechwicz MJ (2000) The seed bank in an old-growth, temperate deciduous forest. *Canadian Journal of Botany* 78:181–192
- Lortie CJ, Ellis E, Novoplansky A, Turkington R (2005) Implications of spatial pattern and local density on community-level interactions. *Oikos* 109:495–502. doi: 10.1111/j.0030-1299.2005.13779.x



- Mackenzie DD, Naeth MA (2010) The role of the forest soil propagule bank in assisted natural recovery after oil sands mining. *Restoration Ecology* 18:418–427. doi: 10.1111/j.1526-100X.2008.00500.x
- Marañón T (1998) Soil seed bank and community dynamics in an annual-dominated Mediterranean salt-marsh. *Journal of Vegetation Science* 9:371–378. doi: 10.2307/3237101
- Martinez-Duro E, Luzuriaga AL, Ferrandis P, Escudero A, Herranz JM (2012) Does aboveground vegetation composition resemble soil seed bank during succession in specialized vegetation on gypsum soil? *Ecological Research* 27:43–51. doi: 10.1007/s11284-011-0870-z
- Martínez-Ruiz C, Fernández-Santos B (2005) Natural revegetation on topsoiled mining-spoils according to the exposure. *Acta Oecologica* 28:231-238. doi: 10.1016/j.actao.2005.05.001
- Maza-Villalobos S, Lemus-Herrera C, Martínez-Ramos M (2011) Successional trends in soil seed banks of abandoned pastures of a Neotropical dry region. *Journal of Tropical Ecology* 27:35-49. doi: 10.1017/S0266467410000611
- Meave J, Flores-Rodríguez C, Pérez-García E, Romero-Romero M (2012) Edaphic and seasonal heterogeneity of seed banks in agricultural fields of a tropical dry forest region in southern Mexico. *Botanical Sciences* 90:313–329
- Meddour R (2011) La méthode phytosociologique sigmatiste. [http://www.tela-botanica.org/page:methode\\_phytosociologique\\_sigmatiste](http://www.tela-botanica.org/page:methode_phytosociologique_sigmatiste) (accessed: 10 April 2012)
- Mesgaran MB, Mashhadi HR, Zand E, Alizadeh HM (2007) Comparison of three methodologies for efficient seed extraction in studies of soil weed seedbanks. *Weed Research* 47:472–478. doi: 10.1111/j.1365-3180.2007.00592.x

- Miao S, Zou CB (2009) Seasonal variation in seed bank composition and its interaction with nutrient enrichment in the Everglades wetlands. *Aquatic Botany* 90:157–164. doi: 10.1016/j.aquabot.2008.08.006
- Page MJ (2009) Using heat and smoke treatments to simulate the effects of fire on soil seed banks in four Australian vegetation communities. *Proceedings of the Royal Society of Queensland* 115:1–9
- Pearson TRH, Burslem DFRP, Mullins CE, Dalling JW (2002) Germination ecology of Neotropical pioneers: interacting effects of environmental conditions and seed size. *Ecology* 83:2798–2807. doi: 10.1890/0012-9658(2002)083[2798:GEONPI]2.0.CO;2
- Pérez EM, Santiago yET (2001) Dinámica estacional del banco de semillas en una sabana en los Llanos Centro-Orientales de Venezuela. *Biotropica* 33:435–446. doi: 10.1111/j.1744-7429.2001.tb00197.x
- Perrier N (2005) Bio-géodiversité fonctionnelle des sols latéritiques miniers: application à la restauration écologique (massif du Koniambo, Nouvelle-Calédonie). PhD Thesis. University of New Caledonia, New Caledonia
- Perrier N, Ambrosi J-P, Colin F, Gilkes RJ (2006) Biogeochemistry of a regolith : the New caledonian Koniambo ultramafic massif. *Journal of Geochemical Exploration* 88:54–58. doi: 10.1016/j.gexplo.2005.08.015
- Rico-Gray V, García-Franco JG (1992) Vegetation and soil seed bank of successional stages in tropical lowland deciduous forest. *Journal of Vegetation Science* 3:617–624. doi: 10.2307/3235828
- Salazar A, Goldstein G, Franco AC, Miralles-Wilhelm F (2011) Timing of seed dispersal and dormancy, rather than persistent soil seed-banks, control seedling recruitment of woody plants in Neotropical savannas. *Seed Science Research* 21:103–116. doi: 10.1017/S0960258510000413

- Scoles-Sciulla SJ, DeFalco LA (2009) Seed reserves diluted during surface soil reclamation in eastern Mojave Desert. *Arid Land Research and Management* 23:1–13. doi: 10.1080/15324980802598698
- Sheoran V, Sheoran S, Poonia P (2010) Soil reclamation of Abandoned Mine Land by revegetation : a review. *International Journal of Soil, Sediment and Water* 3:1–21
- Suprin B (2011a) Florilège des plantes en Nouvelle-Calédonie, tome 1. Editions photosynthèse, Arles, France
- Suprin B (2011b) Florilège des plantes en Nouvelle-Calédonie, tome 2. Editions photosynthèse, Arles, France
- Ter Heerdt GNJ, Verweij GL, Bekker RM, Bakker JP (1996) An improved method for seed-Bank analysis: seedling emergence after removing the Soil by sieving. *Functional Ecology* 10:144-151. doi: 10.2307/2390273
- Tessema ZK, de Boer WF, Baars RMT, Prins HHT (2012) Influence of grazing on soil seed banks determines the restoration potential of aboveground vegetation in a semi-arid savanna of Ethiopia. *Biotropica* 44:211–219. doi: 10.1111/j.1744-7429.2011.00780.x
- Thomsen IK, Schjønning P, Olesen JE, Christensen BT (2003) C and N turnover in structurally intact soils of different texture. *Soil Biology and Biochemistry* 35:765–774. doi: 10.1016/S0038-0717(03)00093-2
- Van Etten EJB, Neasham B, Dalglish S (2014) Soil seed banks of fringing salt lake vegetation in arid Western Australia - density, composition and implications for postmine restoration using topsoil. *Ecological Management & Restoration* 15:239–242. doi: 10.1111/emr.12119
- Wade GL, Thompson RL (1990) Establishment of native plant species from forest topsoil seedbanks on a borrow area in Kentucky. Pages 451–460 In: Skousen J, Sencindiver J,

Samuel D (eds) Proceedings of the 1990 Mining and Reclamation Conference and Exhibition, Vol. 2. West Virginia University, Morgantown, USA

Whiting SN, Reeves RD, Richards D, Johnson MS, Cooke JA, Malaisse F, Paton A, Smith JAC, Angle JS, Chaney RL, Ginocchio R, Jaffre T, Johns R, McIntyre T, Purvis OW, Salt DE, Schat H, Zhao FJ, Baker AJM (2004) Research priorities for conservation of Metallophyte biodiversity and their potential for restoration and Site remediation. *Restoration Ecology* 12:106–116. doi: 10.1111/j.1061-2971.2004.00367.x

Wright BR, Clarke PJ (2009) Fire, aridity and seed banks. What does seed bank composition reveal about community processes in fire-prone desert? *Journal of Vegetation Science* 20:663–674. doi: 10.1111/j.1654-1103.2009.01051.x

**SUPPLEMENTARY DATA FOR THE ARTICLE :**

Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed bank of the Koniambo ultramafic vegetation in New Caledonia

**Table S1 Environmental characteristics of sampling habitats (SSs).** Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristanianopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Knightia deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristanianopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacridium balansae*). <sup>a</sup> significant difference with other.

Habitat	A	Ab	L	P	N	C
pF4.2	12.10 ±1.41a	6.02 ±0.35b	14.85 ±1.80a	16.07 ±1.96a	14.38 ±2.36a	24.67 ±2.19c
pH H2O	4.44 ±0.08a	5.57 ±0.06b	5.44 ±0.17b	5.36 ±0.15b	5.28 ±0.07b	5.55 ±0.12b
C (cg/g)	29.44 ±3.04a	9.30 ±0.25b	24.73 ±1.28a	40.72 ±4.41cd	47.96 ±7.62cd	54.03 ±4.57d
N (mg/g)	0.79 ±0.12a	0.37 ±0.01b	0.88 ±0.08a	1.30 ±0.11c	1.37 ±0.26c	2.26 ±0.18d
P assim mg/kg	0.00 ±0.00a	0.50 ±0.50b	0.00 ±0.00a	0.33 ±0.33b	0.17 ±0.17b	0.00 ±0.00a
P mg/kg	234.36 ±18.14a	191.48 ±32.75ab	120.48 ±20.31bd	126.91 ±6.66bd	148.36 ±13.94b	109.03 ±3.33d
Mn (DTPA) mg/kg	68.38 ±15.82a	471.62 ±134.80b	667.61 ±134.91b	629.21 ±131.22b	872.55 ±66.81b	806.13 ±75.33b
Ni (DTPA) mg/kg	6.92 ±1.08a	8.73 ±2.95a	76.69 ±28.55b	108.43 ±40.42b	57.66 ±13.32b	137.79 ±33.13b
Fe (DTPA) mg/kg	182.53 ±54.37abcd	70.89 ±11.65ab	77.05 ±5.75a	129.62 ±19.89bd	268.59 ±41.51c	120.28 ±7.88d
Cr (DTPA) mg/kg	0.70 ±0.12a	0.67 ±0.35a	0.54 ±0.18a	0.27 ±0.07a	0.44 ±0.13a	0.22 ±0.05a
Co (DTPA) mg/kg	2.10 ±0.48a	31.83 ±11.99b	121.86 ±34.36c	112.88 ±37.55bc	74.78 ±9.79b	116.41 ±16.34b
CEC m <sub>q</sub> %	9.88 ±0.83a	2.82 ±0.20b	7.50 ±0.51c	9.81 ±0.90ac	9.69 ±1.18ac	14.55 ±1.02d
K (CE) m <sub>q</sub> %	0.10 ±0.01a	0.02 ±0.00b	0.08 ±0.01a	0.11 ±0.02a	0.12 ±0.03a	0.26 ±0.04c
Ca méq%	0.91 ±0.18a	0.29 ±0.08b	0.83 ±0.14a	1.54 ±0.42a	1.33 ±0.38a	4.68 ±0.81c
Mg méq%	0.61 ±0.09a	0.26 ±0.03b	1.19 ±0.37a	2.41 ±0.76ac	1.29 ±0.25a	4.03 ±0.86c
Si g/kg	5.61 ±1.13a	6.14 ±1.19a	49.78 ±17.66b	53.44 ±7.01b	36.22 ±11.34b	68.98 ±17.21b
clays %	15.15 ±4.58abc	4.87 ±1.01a	11.83 ±1.77bc	12.15 ±2.69bc	8.58 ±1.12b	17.06 ±1.71c
silts %	16.51 ±3.68abc	6.47 ±1.59a	34.56 ±5.69bd	28.06 ±4.44bcd	16.4 ±2.45c	30.4 ±3.26d
sands %	68.34 ±8.17ac	88.66 ±2.51b	53.61 ±6.95a	59.79 ±6.92ac	75.02 ±3.33c	52.54 ±4.80a

**Table S2 Sequential test results of distLM between floristic structure and edaphic characteristics.**

Variable	R <sup>2</sup>	SS(trace)	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+N	0.25809	24862	11.827	0.001	0.25809	0.25809	34
+pH H2O	0.36517	10316	5.5668	0.001	0.10709	0.36517	33
+pF4.2	0.42538	5799.9	3.3528	0.002	6.0206E-2	0.42538	32
+Silts	0.4639	3710.9	2.2275	0.004	3.8521E-2	0.4639	31
+Mn (DTPA)	0.49769	3255	2.018	0.017	3.3789E-2	0.49769	30
+C	0.52141	2284.7	1.4371	0.095	2.3717E-2	0.52141	29
+K (CE)	0.54425	2200.6	1.4034	0.146	2.2843E-2	0.54425	28
+P	0.56511	2009.1	1.2948	0.195	2.0856E-2	0.56511	27
+CEC	0.58444	1862.1	1.2093	0.264	1.9329E-2	0.58444	26
+Sands	0.60473	1954.9	1.2835	0.201	2.0293E-2	0.60473	25
+Pass	0.6205	1518.9	0.99709	0.446	1.5767E-2	0.6205	24
+Fe (DTPA)	0.63585	1478.9	0.9696	0.487	1.5351E-2	0.63585	23
+Clays	0.65126	1484.4	0.97204	0.426	1.5409E-2	0.65126	22
+Si	0.66477	1302.3	0.84684	0.621	1.3518E-2	0.66477	21
+Co (DTPA)	0.67624	1104.7	0.70837	0.791	1.1467E-2	0.67624	20
+Ni (DTPA)	0.68978	1304.6	0.82945	0.632	1.3543E-2	0.68978	19
+Mg	0.70241	1216.6	0.76387	0.7	1.2629E-2	0.70241	18
+Ca	0.7136	1077.8	0.6641	0.759	1.1188E-2	0.7136	17
+Cr (DTPA)	0.72313	917.98	0.55069	0.864	9.5292E-3	0.72313	16

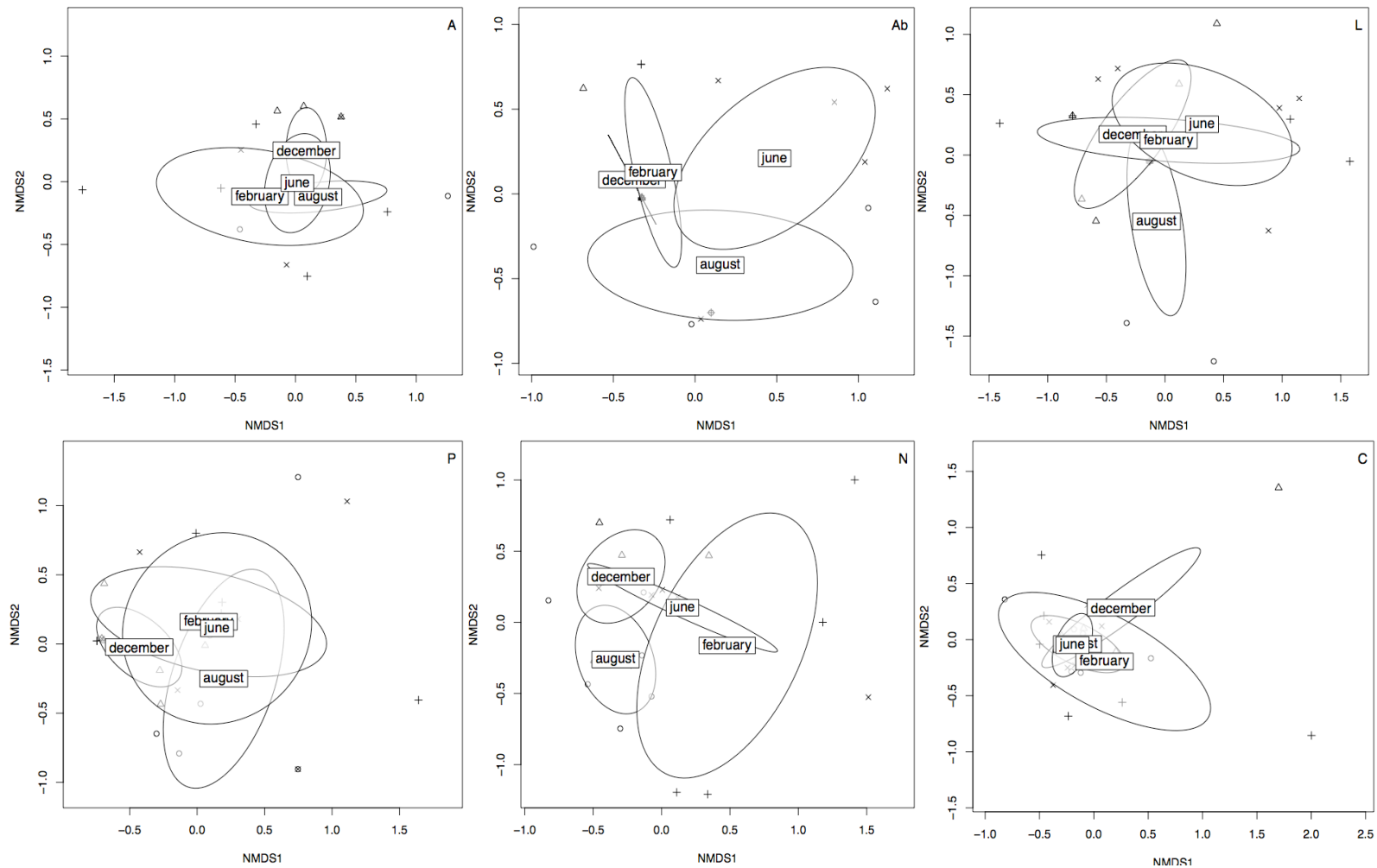
**Table S3 Spearman relationships between vegetal cover, edaphic characteristics, and seedbank.** Bold values are different from 0 to a alpha significance level of 0.05. Italics values are explained in the text.

Variables	pF4.2	pH H2O	P assim mg/kg	Mn (DTPA) mg/kg	Ni (DTPA) mg/kg	Fe (DTPA) mg/kg	Cr (DTPA) mg/kg	Co (DTPA) mg/kg	K (CE) m_q%	CEC m_q%	Ca g/kg	Mg mg/kg	P mg/kg	Si g/kg	clays %	siltss %	sands %	N (mg/g) 1/1000	C (mg/g) 1/100	Floristic abundance of habitat	Floristic habitat species richness	Seedbank abundance	Seedbank species richness	
pF4.2	<b>1</b>																							
pH H2O	0.12	<b>1</b>																						
P assim mg/kg	-0.24	0.07	<b>1</b>																					
Mn (DTPA) mg/kg	<b>0.52</b>	<b>0.59</b>	-0.07	<b>1</b>																				
Ni (DTPA) mg/kg	<b>0.71</b>	<b>0.52</b>	-0.03	<b>0.75</b>	<b>1</b>																			
Fe (DTPA) mg/kg	0.24	-0.26	0.04	0.22	0.29	<b>1</b>																		
Cr (DTPA) mg/kg	<b>-0.41</b>	<b>-0.44</b>	-0.05	<b>-0.39</b>	<b>-0.47</b>	0.1	<b>1</b>																	
Co (DTPA) mg/kg	<b>0.62</b>	<b>0.64</b>	-0.02	<b>0.84</b>	<b>0.88</b>	0.08	<b>-0.42</b>	<b>1</b>																
K (CE) m_q%	<b>0.84</b>	0	-0.17	<b>0.38</b>	<b>0.59</b>	<b>0.56</b>	-0.21	<b>0.42</b>	<b>1</b>															
CEC m_q%	<b>0.77</b>	-0.08	-0.12	0.25	<b>0.49</b>	<b>0.62</b>	-0.25	0.28	<b>0.94</b>	<b>1</b>														
Ca g/kg	<b>0.79</b>	0.17	-0.09	<b>0.44</b>	<b>0.59</b>	<b>0.4</b>	-0.2	<b>0.51</b>	<b>0.83</b>	<b>0.78</b>	<b>1</b>													
Mg mg/kg	<b>0.64</b>	0.33	0.01	<b>0.43</b>	<b>0.75</b>	<b>0.42</b>	<b>-0.48</b>	<b>0.61</b>	<b>0.69</b>	<b>0.65</b>	<b>0.61</b>	<b>1</b>												
P mg/kg	<b>-0.35</b>	<b>-0.52</b>	0.08	<b>-0.36</b>	<b>-0.64</b>	0.11	<b>0.46</b>	<b>-0.57</b>	-0.18	-0.14	-0.28	<b>-0.5</b>	<b>1</b>											
Si g/kg	<b>0.63</b>	<b>0.38</b>	-0.07	<b>0.56</b>	<b>0.81</b>	0.21	<b>-0.43</b>	<b>0.69</b>	0.5	<b>0.42</b>	<b>0.55</b>	<b>0.71</b>	<b>-0.69</b>	<b>1</b>										
clays %	<b>0.6</b>	-0.16	-0.18	0.07	<b>0.35</b>	-0.12	-0.17	0.26	<b>0.4</b>	<b>0.35</b>	<b>0.34</b>	0.28	-0.23	<b>0.34</b>	<b>1</b>									
siltss %	<b>0.67</b>	0.07	-0.14	<b>0.34</b>	<b>0.56</b>	-0.13	-0.16	<b>0.58</b>	<b>0.39</b>	0.3	<b>0.5</b>	<b>0.36</b>	<b>-0.38</b>	<b>0.58</b>	<b>0.79</b>	<b>1</b>								
sands %	<b>-0.68</b>	0.01	0.16	-0.24	<b>-0.49</b>	0.14	0.17	<b>-0.47</b>	<b>-0.4</b>	<b>-0.34</b>	<b>-0.48</b>	-0.32	<b>0.34</b>	<b>-0.5</b>	<b>-0.9</b>	<b>-0.96</b>	<b>1</b>							
N (mg/g) 1/1000	<b>0.91</b>	0.11	-0.1	<b>0.51</b>	<b>0.7</b>	<b>0.35</b>	<b>-0.49</b>	<b>0.54</b>	<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	<b>0.79</b>	<b>0.69</b>	<b>-0.4</b>	<b>0.68</b>	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>	<b>-0.62</b>	<b>1</b>						
C (mg/g) 1/100	<b>0.78</b>	-0.02	-0.1	<b>0.43</b>	<b>0.58</b>	<b>0.52</b>	<b>-0.37</b>	<b>0.36</b>	<b>0.81</b>	<b>0.81</b>	<b>0.71</b>	<b>0.64</b>	<b>-0.21</b>	<b>0.5</b>	<b>0.49</b>	<b>0.36</b>	<b>-0.41</b>	<b>0.91</b>	<b>1</b>					
Floristic abundance of habitat	<b>0.62</b>	0.1	-0.06	<b>0.44</b>	<b>0.61</b>	0.28	<b>-0.35</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5</b>	<b>0.48</b>	<b>0.48</b>	<b>0.52</b>	<b>-0.38</b>	<b>0.64</b>	<b>0.43</b>	<b>0.41</b>	<b>-0.41</b>	<b>0.77</b>	<b>0.77</b>	<b>1</b>				
Floristic habitat species richness	<b>0.57</b>	0.16	-0.07	<b>0.51</b>	<b>0.6</b>	0.27	-0.26	<b>0.46</b>	<b>0.46</b>	<b>0.41</b>	<b>0.48</b>	<b>0.48</b>	-0.3	<b>0.62</b>	<b>0.39</b>	<b>0.43</b>	<b>-0.39</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>	<b>0.96</b>	<b>1</b>			
Seedbank density	<b>0.56</b>	0.18	0.01	<b>0.47</b>	<b>0.61</b>	0.33	-0.29	<b>0.56</b>	<b>0.49</b>	<b>0.46</b>	<b>0.49</b>	<b>0.57</b>	<b>-0.44</b>	<b>0.63</b>	<b>0.39</b>	<b>0.45</b>	<b>-0.41</b>	<b>0.7</b>	<b>0.67</b>	<b>0.79</b>	<b>0.79</b>	<b>1</b>		
Seedbank species richness	<b>0.57</b>	0.09	-0.21	<b>0.51</b>	<b>0.49</b>	0.2	-0.11	<b>0.5</b>	<b>0.33</b>	0.29	<b>0.37</b>	0.26	-0.3	<b>0.47</b>	<b>0.38</b>	<b>0.5</b>	<b>-0.48</b>	<b>0.58</b>	<b>0.51</b>	<b>0.62</b>	<b>0.59</b>	<b>0.72</b>	<b>1</b>	

**Table S4. Absolute abundances of plants species recorded in the seed bank of each sites and each season at Koniambo massif, Voh, New Caledonia.** Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristanianopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Knightia deplanchei* and *Costularia sp.*), P (Pre-forest dominated by *Tristanianopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).

Life form	Family	species	A august	A december	A february	A june	Ab august	Ab december	Ab february	Ab june	L august	L december	L february	L june	P august	P december	P february	P june	N august	N december	N february	N june	C august	C december	C february	
forb	Cyperaceae	<i>Costularia comosa</i>	0	0	4	2	7	0	0	0	4	0	0	2	13	7	5	9	0	0	2	0	0	0	5	
		<i>Costularia nervosa</i>	0	2	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	2	0	0	0	0	0	0	2
		<i>Gahnia novocaledonensis</i>	2	0	0	0	9	0	2	4	0	2	2	0	0	2	0	0	13	2	7	0	2	2	4	
		<i>Lepidosperma perteres</i>	2	0	0	0	0	0	0	7	0	5	0	2	9	2	13	24	2	5	0	2	7	0	7	
		<i>Machaerina deplanchei</i>	0	0	0	0	9	0	0	5	0	0	16	5	49	58	51	49	47	57	16	7	66	29	86	
		<i>Schoenus neocaledonicus</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	
	Joinvilleaceae	<i>Joinvillea plicata</i>	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0	2	0	0	0	0	2	0	
	Nepenthaceae	<i>Nepenthes vieillardii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
liana	Lamiaceae	<i>Oxera neriifolia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Smilacaceae	<i>Smilax sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	
shrub	Araliaceae	<i>Polyscias dioica</i>	0	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	2	4	0	2	0	2	2	0	0	
	Ericaceae	<i>Dracophyllum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	4	0	0	5	2	2	0	9	0	0	
		<i>Styphelia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	
	Goodeniaceae	<i>Scaevola montana</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	7	0	0	0	5	0	5	0	0	2	0	0	0	0	0	
		<i>Scaevola sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	Myodocarpaceae	<i>Myodocarpus nervatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	0	0	2	
	Orchidaceae	<i>Caladenia catenata</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2	0	0	2	2	0	2	5	0	0	0	4	
	Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus chrysanthus</i>	2	0	4	0	0	0	0	0	0	2	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>Guettarda ngoyensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
		Rubiaceae	<i>Normandia neocaledonica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
		<i>Psychotria cardiochlamys</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	
tree	Salicaceae	<i>Homalium deplanchei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	
	Aquifolaceae	<i>Ilex sebertii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Araucariaceae	<i>Araucaria montana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	Dilleniaceae	<i>Hibbertia pancheri</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4	0	2	
	Myrtaceae	<i>Metrosideros operculata</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
			SP1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		SP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		SP4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	





**Figure S1** Two-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of seasonal seed bank composition in topsoil seed ban at Koniambo massif per site, in New Caledonia. (Stress value=0.2). Ordination was based on the abundance of species composition. Ellipsoids represent the standard error confidence limit for ellipses (95%) per site. The location of ellipsoids within each diagram indicates the degree of similarity between each one. Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristaniopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristaniopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).

**Table S5 Jaccard's index (ISJ).** Habitat type: A (Maquis dominated by *Araucaria Montana*), Ab (bushy shrub maquis dominated by *Tristanianopsis guillainii*), L (Ligno-herbaceous maquis dominated by *Hibbertia altigena*, *Knightia deplanchei* and *Costularia* sp.), P (Pre-forest dominated by *Tristanianopsis callobuxus*), N (Forest dominated by *Nothofagus codonandra* & *Nothofagus balansae*), C (Forest dominated by *Cocconerion minus* & *Dacrydium balansae*).

	ISj
A February	11,54
A June	5,77
A August	5,77
A December	5,77
Ab February	3,51
Ab June	8,77
Ab August	7,02
Ab December	1,75
L February	10
L June	10
L August	5,71
L December	7,14
P February	7,55
P June	8,49
P August	8,49
P December	6,6
N February	8,49
N June	3,77
N Nout	7,55
N December	7,55
C February	11,46
C June	5,21
C August	8,33
C December	4,17
A for the year	23,08
Ab for the year	15,79
L for the year	21,43
P for the year	15,09
N for the year	16,98
C for the year	17,71



## CONCLUSION DU CHAPITRE 1

Ce premier temps d'étude avait pour objectif de contribuer aux connaissances néo-calédoniennes, et plus largement des substrats ultramafiques des modèles de distribution des communautés microbiennes, bactériennes et fongiques, et du potentiel germinatif des topsoils.

L'approche métagénomique des populations microbiennes, nous a tout d'abord permis de montrer que les écosystèmes ultramafiques tendraient à figurer parmi les écosystèmes terrestres naturels les plus riches et les plus complexes analysés à ce jour. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle les propriétés des sols ultramafiques ne limitent pas la diversité microbienne (Oline, 2006 ; Branco, 2010). Deuxièmement, nous avons montré qu'il existe une interaction complexe entre d'une part, la composition spécifique de la couverture végétale et les propriétés du sol, et d'autre part la structure des communautés microbiennes. A l'échelle du paysage d'un massif ultramafique, nos résultats tendent à montrer que les diversités bactériennes et fongiques, sont plus structurées par la couverture végétale que par les propriétés édaphiques.

Notre étude de la banque de graines, nous a tout d'abord permis de mettre en évidence la faible richesse spécifique de la banque de graines de manière générale, en comparaison avec la diversité des communautés végétales étudiées. Nos résultats montrent également que sept espèces qui se sont exprimées dans la banque de graines des topsoils, font parties des espèces dont la production ou la récolte ne sont, à ce jour, pas maîtrisées en Nouvelle-Calédonie (ie, *Nepenthes Vieillardii*, *Caladenia catenata*, *Smilax sp.*, *Dracophyllum verticillatum*, *stypheia sp.*, *Guettarda ngoyensis* et *Ilex sebertii*). Ce résultat suggère que l'utilisation du topsoil en restauration écologique peut permettre d'augmenter la diversité végétale sur les sites restaurés, en combinaison avec d'autres techniques. Par ailleurs, nous avons montré que la banque de graines des topsoils tend, dans cette étude, à être dominée par des espèces herbacées, présentes en abondance. Ces espèces, considérées comme pionnière, ayant la capacité de s'installer dans des zones ouvertes, et des conditions difficiles, peuvent avoir des effets positifs pour les travaux de restauration écologique, en favorisant la mise en place de conditions favorables pour l'installation d'espèces de succession secondaire (Pearson et al., 2002; Lebrija-Trejos et al., 2011).

Notre évaluation des propriétés biologiques des topsoils des systèmes ultramafiques néo-calédoniens, pourrait trouver une application dans la conception de nouvelles stratégies de restauration écologique des terrains miniers dégradés du territoire, en particulier pour la gestion des topsoils. Comme souligné par Van Etten et al., (2014), une question centrale liée à l'utilisation du topsoil est de savoir si une gestion séparée de celui-ci peut contribuer à la restauration de la diversité des communautés végétales avant exploitation minière. Nos

résultats montrent que le potentiel biologique des topsoils intervenant dans la restauration des systèmes dégradés se caractérise différemment selon le couvert végétal qui lui est associé. Nous suggérons donc qu'une gestion distincte des topsoils selon les caractéristiques de ce potentiel biologique, se basant sur le couvert végétal, peut aider à la restauration des différentes communautés végétales des substrats miniers ultramafiques néo-calédoniens.

Toutefois, les résultats liés à l'étude de la banque de graines montrent également que celle-ci ne peut, à elle seule, restaurer la totalité de la diversité végétale qui caractérise les substrats ultramafiques du territoire. Ainsi, nous suggérons également que l'utilisation des topsoils pour les travaux de restauration doit être associée à d'autres techniques de restauration, telle que la plantation ou l'ensemencement. De même, nous suggérons que la préservation de zones végétales non impactées, pourrait contribuer à former une source de semences et de propagules, aisément disponible et pouvant se disperser alentour. Enfin, comme suggéré par Van Etten et al., (2014), nous proposons que l'utilisation séparée des topsoils doit être complétée par une utilisation raisonnée de celui-ci en fonction de son origine, notamment topographique. La réintégration du topsoil dans un environnement topographique proche des conditions d'origines de celui-ci, devrait favoriser une meilleure réponse du potentiel biologique et par conséquent, une meilleure réussite des travaux de restauration.

## **CHAPITRE 2**

# **ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POTENTIALITÉS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS PENDANT STOCKAGE**



## I/ INTRODUCTION

Comme présenté en introduction générale et décrit dans la synthèse bibliographique, l'utilisation du topsoil, pour les travaux de restauration ne peut intervenir, dans certains cas, en raison de la logistique d'exploitation minière, qu'un certain temps après sa récupération (Ghose, 2012). Ainsi, le topsoil récupéré des sites qui vont être impactés est souvent placé en tas pour stockage, en attendant une utilisation ultérieure. Cette étape de stockage est reconnue pour avoir un effet dépressif sur la conservation des potentialités biologiques de restauration des topsoils, à la fois pour la banque de graines (Koch, 2007), les micro-organismes (Stahl et al. 2002), et la fertilité des topsoils (Ghose, 2012). Dans ces conditions, il peut apparaître difficile, lorsque le topsoil est réutilisé, d'atteindre les objectifs de restauration des écosystèmes fixés.

Compte tenu de l'importance des topsoils pour les travaux de restauration des terrains miniers, et de la difficulté d'éviter leur stockage, de nombreux travaux de recherches s'attachent aujourd'hui à la mise en place d'outils d'étude destinés à la compréhension des effets du stockage et des mécanismes responsables de la dégradation du potentiel biologique (Erickson et al. 2010; Rivera et al. 2012 ; Golos & Dixon, 2014). Il apparaît que des études en amont d'un stockage à grande échelle pourraient favoriser une meilleure gestion et conservation de ce potentiel (Ghose, 2012). Toutefois la variabilité des résultats rapportés par la littérature à travers le monde nécessite la mise en œuvre de mesures de recherches adaptées au contexte local.

En Nouvelle-Calédonie, peu de données existent actuellement sur les modalités optimales de conservation des topsoils (Ruiz, 2006 ; Amir et al. 2014 ; L'Huillier & Fogliani. 2014). Ce second temps de recherche vise ainsi à compléter nos connaissances en caractérisant l'évolution des potentialités biologiques (potentiel microbien, potentiel de fertilité chimique, potentiel germinatif de la banque de graines) du topsoil en fonction de leurs caractéristiques initiales (origine du topsoil), du temps et de la profondeur de stockage, ainsi que les moyens de les conserver et de les gérer.

Afin de tester l'influence de l'origine du topsoil sur l'évolution des potentialités biologiques pendant le stockage, deux topsoils caractérisés par des propriétés biologiques différentes, issus de deux formations végétales distinctes, ont été testés. Le mode de stockage des topsoils choisi dans cette étude est la verse. Ce mode de stockage fait référence auprès des exploitants miniers calédoniens depuis maintenant trente ans pour la gestion des stériles miniers et tendrait à être appliqué au topsoil. Afin de prendre en compte les effets du temps et de la profondeur de stockage sur l'évolution des potentialités biologiques, nous avons adopté une stratégie d'échantillonnage stratifié en profondeur et dans le temps. L'effet du stockage sur le potentiel biologique des topsoils a été étudié via

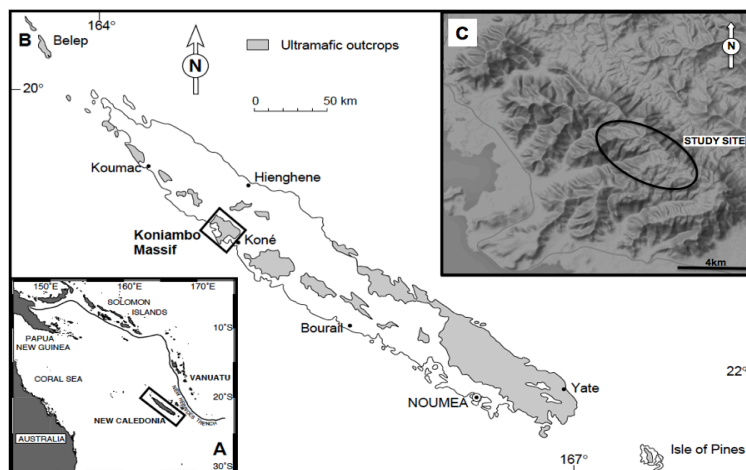


des paramètres quantitatifs et qualitatifs. L'effet quantitatif du stockage sur le potentiel microbien repose sur l'analyse de Potentiel EndoMycorhizogène (PEM), et le dénombrement de la microflore bactérienne hétérotrophe. Ces mesures ont été complétées par l'étude des flux de minéralisation du carbone. La minéralisation du carbone est un indicateur fiable et donne une estimation globale du fonctionnement et du niveau de productivité de l'écosystème sol (Aon et al. 2001). L'approche qualitative du potentiel microbien repose quant à elle, sur la caractérisation de la structure des communautés bactériennes et fongiques des topsoils par pyroséquençage 454 après 12 mois de stockage. Cet indicateur permettra de vérifier si les changements microbiens quantitatifs s'accompagnent d'un changement dans la composition des communautés microbiennes du topsoil. Le potentiel germinatif a été suivi au cours d'expériences de germination en serres par lesquelles la banque de semences est évaluée via l'identification et le dénombrement des plants émergés des topsoils. Enfin, un suivi des caractéristiques physico-chimiques a permis à la fois d'évaluer l'évolution du potentiel de fertilité et des conditions physico-chimiques au sein des verses. Outre le suivi des teneurs en matière organique et éléments nutritifs, les conditions de pH, et les teneurs en différents métaux extractibles ont également été mesurés ainsi que les critères de densité, et porosité.

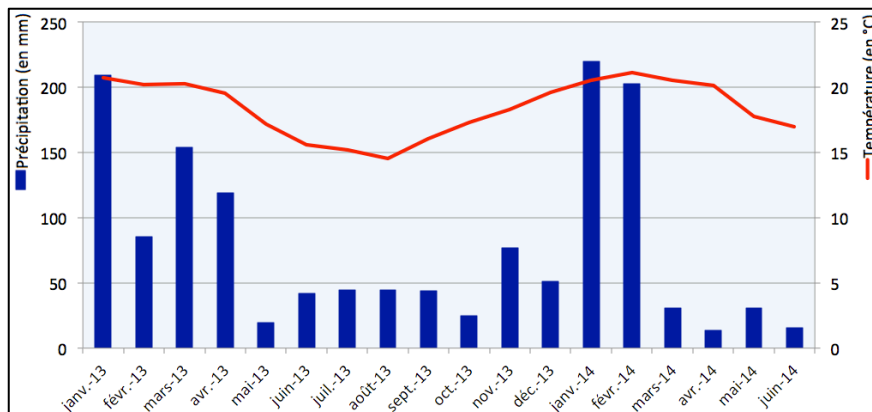
## II/ MATERIEL ET METHODE

### II.1/ SITE D'ÉTUDE

La zone d'étude est située dans la province nord de la Nouvelle-Calédonie, sur le massif du Koniambo (20°56'08 "S; 164°43'55" E; altitude 460-930m) (Fig.1). Ce site a servi à plusieurs reprises pour étudier des modèles de substrats ultramafiques de la Nouvelle-Calédonie (Perrier, 2005 ; Perrier 2006). Les conditions météorologiques du site enregistrées pendant la période d'essai se situent dans les moyennes annuelles observées sur les dix dernières années (source service hydrologie KNS). La moyenne des précipitations annuelles a été de 76,1mm avec, de manière globale, une plus forte pluviométrie de janvier à avril et une plus faible pluviométrie de mai à octobre. Les températures mensuelles ont montré des fluctuations entre 14,5 °C et 21,1 °C, avec une période un peu plus fraîche entre mai et octobre. Les écarts moyens journaliers étaient de l'ordre de 5°C (Fig.2).



**Figure 1.** (A) Localisation de la Nouvelle-Calédonie, dans l'océan Pacifique Sud-Ouest (B) Localisation du massif du Koniambo en Nouvelle-Calédonie (C) carte en relief du massif par nuance de gris. (Bonvallot et al. 2013 ; source interne KNS)



**Figure 2.** Moyenne des précipitations et moyennes des températures mensuelles de la zone d'étude pendant la période d'essai (source service hydrologie KNS).

## II.2/ ORIGINE DES TOPSOILS ÉTUDIÉS

Afin de tester l'origine du topsoil sur l'évolution des potentialités biologiques pendant le stockage, deux topsoils issus de deux formations végétales caractérisés pour leur valeur de restauration différente ont été testés. Le premier topsoil (L) est associé à une formation de maquis ligno-herbacée dominée par *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei* et *Costularia* spp. Le second topsoil est associé à une formation para-forestière (P) dominée par *Tristaniopsis callobuxus*. Le topsoil de maquis ligno-herbacé moins développé que le topsoil de maquis paraforestier, est moins riche en matière organique et en réserve de graines, donc d'une qualité différente. De plus, ces deux formations correspondent aux deux formations végétales qui seront les plus impactées par le plan minier à 25 ans et donc susceptibles de produire les plus grands volumes de topsoil à gérer sur site. La comparaison de ces deux topsoils permettra de confirmer ou d'infirmer l'influence de l'origine de celui-ci sur l'évolution de ses potentialités biologiques pendant son stockage, et ainsi d'envisager la mise en place de stratégies de gestion à l'échelle industrielle.

Il est à noter que les topsoils associés à ces formations, et étudiés dans ce chapitre, sont issus du dispositif expérimental mis en place au chapitre 1. Les résultats obtenus dans le chapitre précédent servent ici de points initiaux (in situ ou t0). Ces points initiaux ont consisté en une analyse de la variabilité spatiale des mêmes différents indicateurs physicochimiques et du potentiel biologique des topsoils qui seront mis en place dans cette étude. Ces analyses permettront de juger de l'évolution de ces composantes pendant stockage.

### II.2.1/ CARACTERISTIQUES DU MAQUIS LIGNO-HERBACE A *HIBBERTIA ALTIGENA*, *EUCARPHA DEPLANCHEI* ET *COSTULARIA SP* (SOURCE INTERNE KNS).

La formation de maquis ligno-herbacé occupe les pentes péridotiques entre 450 et 900m d'altitude. L'hétérogénéité du milieu due aux variations d'enrochement, d'altitude et de pente entraîne une diversification des groupes écologiques. Cependant la végétation présente une physionomie remarquablement homogène, en raison de la sclérophylle des espèces ligneuses et du développement important de la strate herbacée Cypéacéenne : *Costularia nervosa*, *Costularia arundinacea*, *Lepidosperma perteres*. La strate arbustive basse (1,20m en moyenne) est discontinue et a un taux de recouvrement inférieur à celui de la strate herbacée. Sa flore assez riche est constituée d'espèces à affinités écologiques variées : à côté d'espèces rupicoles héliophiles (*Normandia neo-caledonica*, *Hibbertia altigena*, *Eucarpha deplanchei*), on trouve des espèces plutôt mésophiles (*Montrouziaria gabriellae*, *Myodocarpus floribundus*), des espèces pionnières des zones terreuses (*Schoenus neo-caledonicus*) et un lot important d'espèces à répartition plus large (*Hibbertia*

*pancheri*, *Codia montana*, *Ixora francii*). Ce maquis arbustif devient plus densément arbustif au voisinage des thalwegs ou l'apparition du *Gymnostoma deplancheanum* et l'enrichissement en espèces mésophiles traduisent une évolution vers un groupement forestier.

Ce groupement se développe sur des sols ferrallitiques plus ou moins érodés, peu profonds, remaniés par érosion et colluvionnement et fréquemment interrompus par des affleurements de blocs rocheux pouvant occuper 75% de la surface. Le substrat édaphique a tous les caractères des sols ferritiques par ses caractères chimiques (pH moins acide, voisin de 6) capacité d'échange plus importante, voisine de 10me/100g, teneurs en nickel et en magnésium plus élevées, et par la présence d'un horizon supérieur à texture limono-sableuse, plus ou moins humifère, au contact des blocs rocheux.

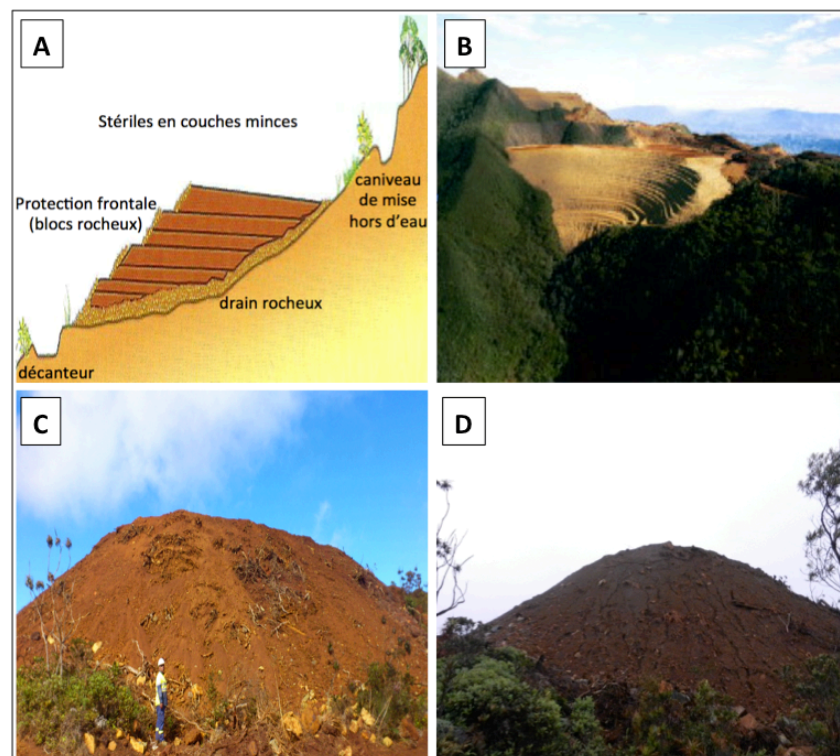
#### II.2.2/ CARACTERISTIQUES DU MAQUIS PARAFORSTIER A *TRISTANIOPSIS CALLOBUXUS* (SOURCE INTERNE KNS).

Le maquis paraforestier, couramment considéré comme une formation de transition entre maquis arbustif et forêt dense humide, est caractérisé par une strate d'arbres dominée par *Tristaniopsis callobuxus* pouvant atteindre 15 m de haut. La strate arbustive varie, quant à elle, entre 2 et 8 m de haut. Ce type de formation végétale présente une strate cypéracéenne, et possède une litière relativement épaisse variant de 5 à 10 cm. Ce sont des maquis plus hauts et plus denses que les maquis ligno-herbacés, dont ils ont souvent des faciès plus évolués, étant placés dans une situation plus favorable, telle qu'en zone de piedmont bénéficiant de meilleures conditions d'alimentation hydrique, d'apports humifères et d'éléments minéraux fins transportés par les eaux de ruissellement. Ils sont extrêmement diversifiés et sont souvent dominés par des peuplements à *Tristaniopsis callobuxus* (Casuarinaceae), par des espèces du genre *Alstonia* (Apocynaceae), *Polyscias* (Araliaceae), *Codia*, *Geissois* et *Pancheria* (Cunoniaceae), *Myodocarpus* (Myodocarpaceae), *Storthocalyx* (Sapindaceae), *Hibbertia lucens* (Dilleniaceae), *Metrosideros nitida* (Myrtaceae).

L'ensemble de ces formations végétales est associé à des sols ferrallitiques ferritiques à texture limono-sableuse, sur plateaux et pentes. Ces sols sont composés principalement d'oxy-hydroxydes de fer (environ 70% de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et d'éléments métalliques (Cr, Al, Ni, Co) hérités du manteau d'altération. Ils renferment peu d'alumine et, dans la plupart des cas, très peu de silice. Leur pH est plus ou moins acide (de 3.5 à 6.5). Ils ont une très faible capacité d'échange cationique (souvent inférieure à 10me/100g) en raison de l'absence quasi-totale de minéraux argileux. En conséquence leur teneur en bases échangeables est très faible, à l'exception cependant de la magnésie dont ils sont généralement bien pourvus.

### II.3/ MISE EN STOCKS DES TOSPOILS : LA VERSE

Le mode de stockage des topsoils choisi dans cette étude est la verse. Cette technique, développée en Nouvelle-Calédonie depuis les années 1970, pour le stockage des stériles miniers, permet de réduire considérablement les impacts environnementaux autour de la zone d'exploitation minière<sup>3</sup> (Fig.3A, 3B). Ce mode de stockage fait référence auprès des exploitants miniers calédoniens depuis maintenant trente ans pour la gestion des stériles miniers et tend à s'appliquer aux topsoils, à la différence près, que protection et drains rocheux (traditionnellement employés dans le cas du stockage des stériles miniers) ne seront dans ce cas, pas mis en place afin d'éviter de diminuer la valeur du topsoil par augmentation de son contenu rocheux.



**Figure 3.** (A) Représentation schématique d'une coupe transversale de verse de stockage de stériles miniers (L'Huillier et al. 2010) (B) Illustration d'une versée à stériles miniers en Nouvelle-Calédonie (Mine de Kopéto, SLN. Tirée de L'Huillier et al. 2010). Versée expérimentale à topsoil de notre étude (C) de maquis ligno-herbacé et (D) de maquis paraforestier (photo L.Bordez).

Deux versées expérimentales de topsoil issus des formations végétales présentées précédemment ont ainsi été mises en place dans cette étude, et sont issues du décapage

<sup>3</sup> Les stériles retirés de la zone d'exploitation minière sont stockés et répartis en niveaux compactés dans des ouvrages spécialement conçus, appelés verses, stabilisées par une protection rocheuse et une couverture de végétation. Des systèmes de drainage permettent de canaliser les écoulements d'eau de pluie et assurent ainsi la stabilité de la verse. Faites dans les règles de l'art, les verses garantissent une stabilité à très long terme, même lors de pluies cycloniques exceptionnelles, et sont moins sensibles à l'érosion que les versants naturels en latérites.

des trente premiers centimètres de topsoil. Les opérations de décapage et de montage des verses ont été réalisées à l'aide d'engins miniers (pelle hydraulique et articulé de 25T) conformément au schéma minier prévu par Koniambo Nickel SAS, par les équipes de l'exploitant. La végétation sus-jacente a été conservée et intégrée au topsoil lors du décapage. Le montage de la verse de topsoil provenant de la formation végétale de maquis ligno-herbacée a été réalisé entre novembre et décembre 2012 ; elle est située aux coordonnées S20°59.311, E164°49.037' (Fig.3C). Le montage de la verse de topsoil provenant de la formation végétale de maquis paraforestier a été réalisé entre juin 2012 et décembre 2012 ; cette verse est localisée aux coordonnées S20°58.331', E164°47.618' (Fig.3D). Dans leur maximum, les verses atteignent 10m de hauteur. Un balisage a été mis en place afin de pérenniser les verses et d'éviter les perturbations dues à la co-activité sur site durant la période d'étude.

#### II.4/ ECHANTILLONNAGE

Afin de prendre en compte les effets du temps et de la profondeur de stockage sur l'évolution des potentialités biologiques pendant le stockage, nous avons adopté une stratégie d'échantillonnage stratifiée en profondeur et dans le temps. Cela correspond à cinq temps d'échantillonnage (t3, t6, t9, t12 et t18 mois), en surface et aux profondeurs 2m et 10m. Lors de chaque temps d'échantillonnage, les verses ont été ouvertes sur toute leur hauteur par une pelle hydraulique (Fig.4A, 4B) en enlevant les 80-100 premiers centimètres pour accéder au topsoil interne. Puis, pour chaque temps d'échantillonnage, et pour chaque profondeur, trois échantillons de 300cm<sup>3</sup> non déstructurés ainsi que trois échantillons de 3000cm<sup>3</sup> de topsoil déstructurés ont été prélevés respectivement, à l'aide d'un plantoir à bulbe et d'une pelle terrassière. Les échantillons non déstructurés ont servi spécifiquement aux mesures des phénomènes de compactions, alors que les échantillons de 3000cm<sup>3</sup> servaient aux autres analyses. Ces derniers étaient alors directement transférés à la pépinière de KNS. Les éléments grossiers (>2cm) ont fait l'objet d'une suppression manuelle. Pelle terrassière et bétonnière ont été désinfectées à l'éthanol 95° entre deux homogénéisations (MDDEPQ, 2009a, 2009b).



**Figure 4.** (A) Ouverture des verses expérimentales de l'étude et (B) Points d'échantillonnages (photo L.Bordez).

## II.5/ SUIVI DU POTENTIEL GERMINATIF

Le potentiel germinatif a été suivi au cours d'expériences de germinations en serre à température non contrôlée, située au pied du massif du Koniambo, par lesquelles la banque de semences a été évaluée via l'identification et le dénombrement des plants ayant émergés des topsoils (Fig.5) (Swanton et al. 2000). Pour cela, à chaque temps d'échantillonnage, une fraction de chaque échantillon de topsoil a été placée dans une terrine (L38 x L24 x H8 cm) contenant un lit de vermiculite de 2cm pour un meilleur drainage, en couche d'environ 2 cm (soit 1240 cm<sup>3</sup>). Six terrines témoins, contenant un sol échantillonné-autoclavé ont été réparties au hasard dans la serre afin d'identifier la présence possible de semences dans l'air. Pour éviter de surestimer la densité de banque de semences, tous les individus qui sont apparus dans ces terrines témoins ont été soustraits des terrines d'essais.

Les terrines ont été arrosées cinq minutes, quatre fois par jour afin de maintenir les échantillons de sol humides (Flow 80L.h-1; séries Rain Bird WP4, Azusa, CA, USA). Les émergences ont été comptées une fois par mois. Les plants émergents ont été laissés en place jusqu'à ce que l'identification soit possible au moins au niveau du genre, puis retirés des terrines une fois l'identification effectuée. L'expérience de germination a duré 10 mois pour chaque temps d'échantillonnage, de mars 2013 à mars 2015. Pendant cette période, la température dans les serres a varié de 15 °C à 25 °C, compatible avec les moyennes locales de température sur le massif.

A la fin de chaque temps de suivi, une terrine de chaque topsoil a été choisie au hasard afin de déterminer s'il restait des graines viables. Cette évaluation a été réalisée selon la méthode de flottation décrite par Mesgaran (2007). Pour cela, 450g de sol d'une terrine, choisie au hasard, sont prélevés, puis tamisés à 60µm et lavés sous eau courante. Le résidu est placé dans un tube en plastique de 400mL, additionné d'une solution de flottation (solution de saccharose à 2g.mL<sup>-1</sup>), secoué manuellement 1 à 2mn pour avoir une solution homogène puis centrifugé à 10 000g pendant 10min. Le surnageant est alors récupéré, filtré, et observé sous loupe binoculaire à grossissement variable afin d'identifier et compter les graines restantes.



**Figure 5.** Mise en terrine sous serre KNS avec arrosage automatique et à température non contrôlée (L.Bordez).

Les volumes de topsoil restants (1760cm<sup>3</sup>), ont été transférés dans les 24 heures suivantes vers Nouméa pour les analyses de laboratoire, où ils ont été conservés au réfrigérateur à 4°C. Le temps de stockage n'excédait jamais trois semaines, période durant laquelle avait lieu l'ensemble des analyses de laboratoire. Cette méthode de conservation apparaissait comme la plus optimale pour la préservation du potentiel biologique de nos échantillons (MDDEPQ, 2009a, 2009b).

## II.6/ ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

Les propriétés physico-chimiques suivantes, des échantillons de topsoils, ont été déterminées au Laboratoire des Moyens Analytiques de Nouméa (LAMA, IRD, Nouméa) selon les méthodes déjà rapportées par Perrier (2005): pF4.2, pH H<sub>2</sub>O, Carbone organique (Corg), azote total (N<sub>tot</sub>), phosphore disponible (P Olsen), phosphore total (P), Capacité d'Échange Cationique (CEC), bases échangeables : sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), magnésium (Mg), , et la granulométrie (argiles, limons et sables), Silice (Si), métaux extractibles au DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) : Manganèse (Mn), Nickel (Ni), Fer (Fe), Chrome (Cr), Cobalt (Co), Potassium (K), Calcium (Ca), Magnésium (Mg).

Le reste des analyses a été réalisé au Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement (LIVE, Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouméa).

## II.7/ MESURE DE LA DENSITE APPARENTE DU SOL OU MASSE VOLUMIQUE

La mesure de la masse volumique du sol ( $\rho$ ), est un indicateur du tassement du sol et de la porosité totale du sol. Elle donne une bonne idée de l'état structural, et apparaît comme un bon indicateur des phénomènes de compaction qui pourraient avoir lieu au sein des stocks de topsoil. Cette mesure permet d'avoir ainsi une estimation des conditions de vie des microorganismes du sol. Elle est réalisée sur l'échantillon de topsoil non déstructuré d'un volume de 300cm<sup>3</sup>, qui est pesé avant et après avoir subi une dessiccation à 105°C pendant 72h. Nous avons ainsi déduit :

- la masse volumique ( $\rho$ , g.cm<sup>-3</sup>), calculée selon l'équation :  $\rho = \text{masse totale sol sec} / \text{volume du sol prélevé}$
- la porosité totale (P) du sol exprimée en % :  $P = 100 \times (1 - \rho / \rho_S)$  (2) ou  $\rho_S$  est la densité de solide du sol, estimée à 4,1 (comm. F.Juillot)
- le taux de saturation de la porosité du sol (Water-Filled Pore Space : WFPS) :  $\text{WFPS} = (\text{TE} \times 100 \times \rho) / (1 - (\rho / \rho_S))$  (Robertson et Groffman, 2007), avec (TE) la teneur en eau du sol (séchage 72 h à 105°C) exprimée en % de sol sec.



## II.8/ SUIVI DU POTENTIEL MICROBIEN

L'effet du stockage sur le potentiel microbien des topsoils a été étudié via des paramètres quantitatifs et qualitatifs. L'effet quantitatif du stockage sur le potentiel microbien repose sur l'analyse de Potentiel EndoMycorhizogène (PEM), et le dénombrement des bactéries sur milieu de culture. Bien qu'initialement prévu, le suivi des biomasses microbiennes s'est révélé inefficace. Les résultats générés n'ont pas été exploitables, probablement en raison de valeurs de biomasses trop faibles pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives. Nous avons donc choisi le suivi de la densité des bactéries hétérotrophes aérobies cultivables. Bien que ces techniques soient critiquables elles fournissent toutefois des informations fiables au regard des objectifs visés. Les techniques de dénombrement sur milieu de culture ne mesurent en effet qu'un très faible pourcentage de la microflore (Augier, 2010). Toutefois Stahl et al. (2002), ou Ghose (2012), ont montré que les tendances observées à travers ces outils sont similaires aux tendances ayant pu être observées comparativement en utilisant des mesures de biomasses. Par ailleurs, différents essais menés précédemment montrent que la densité des bactéries aérobies cultivables est un bon indicateur de l'évolution du sol pendant son stockage, car la densité de cette microflore est sensible aux variations des sources de carbone disponibles (Amir et al. 2014). Ces paramètres seront donc utilisés ici uniquement en tant qu'indicateurs relativement sensibles de la dégradation de la microflore durant le stockage des topsoils. Ces mesures ont été complétées par l'étude des flux de minéralisation du carbone. La minéralisation du carbone est un indicateur fiable et donne une estimation globale du fonctionnement et du niveau de productivité de l'écosystème sol (Aon et al. 2001). L'approche qualitative du potentiel microbien repose quant à elle, sur la caractérisation de la structure des communautés bactériennes et fongiques des topsoils par pyroséquençage 454, après 12 mois de stockage. Cet indicateur permettra de vérifier si les changements microbiens quantitatifs s'accompagnent d'un changement dans la composition des communautés microbiennes du topsoil.

### II.8.1/ SUIVI QUANTITATIF

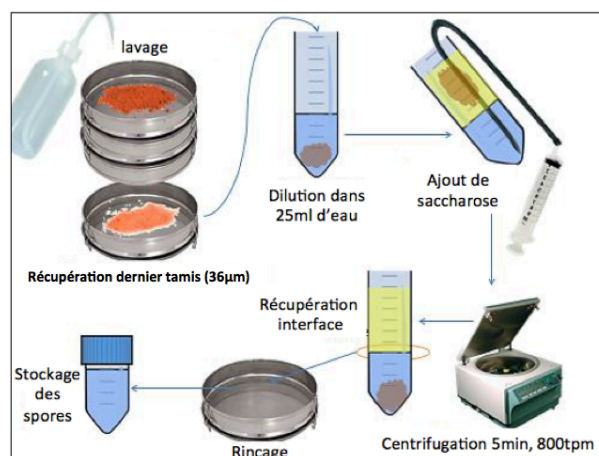
#### II.8.1.1/ DENOMBREMENT DE LA FLORE BACTERIENNE AEROBIE

Le dénombrement de la microflore aérobie se fait par comptage direct de colonies isolées après ensemencement, sur un milieu nutritif solide, de suspensions de sol. Le nombre de germes (de bactéries) présents dans le sol de départ, est déterminé par le nombre de colonies développées sur le milieu par la dilution correspondante, celle-ci étant choisie de façon à compter environ une centaine de colonies. Les échantillons, étant stockés à 4°C, ils sont remis à température ambiante 48h avant le début de la manipulation, afin d'en réactiver la microflore. Le travail de dilution et d'ensemencement a ensuite été effectué sous

hotte à flux laminaire en conditions stériles. Une série de dilutions en cascade (jusqu'à  $10^{-5}$ ), a été réalisée pour chaque échantillon à partir d'une masse de 5g de topsoil (équivalent sol sec). Des boîtes de Pétri contenant une gélose nutritive favorable aux bactéries hétérotrophes (Milieu LPGA, annexe 1) additionné de 50 mg/L d'actidione (pour éviter le développement de champignons) ont été ensemencées en triplicats avec 100 $\mu$ l de suspension bactériennes au dilution  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ . Le comptage des Colonies Formant une Unité (UFC), a été réalisé après une incubation de 3 jours à 30°C à l'étuve, à l'aide d'un compteur de colonies BIOBLOCK 50300 (Fisher scientific, France).

#### II.8.1.2/ DENOMBREMENT DU POTENTIEL ENDOMYCORHIZOGENE (PEM)

La capacité d'un sol à favoriser ou maintenir la mycorhization des plantes par l'intermédiaire des champignons mycorhiziens à arbuscules est mesurable (Potentiel EndoMycorhizogène (PEM) en comptant la quantité de spores viables présentes dans les échantillons de topsoil. Ce paramètre traduit l'abondance et l'état de ces symbiotes dans le sol (Chantelot 2003). L'extraction des spores est effectuée selon la technique de tamisage humide de Gerdemann & Nicolson (1963) suivie d'une centrifugation sur un gradient de saccharose (ou sur « coussin ») selon la méthode décrite par Giovanetti et al. (1991) et Sidhoum (2011). Le PEM a été évalué pour chaque topsoil, chaque temps et chaque profondeur de stockage sur quatre sous échantillons de 50g de sol (équivalent sol sec) (Fig 6). Ces sous échantillons ont été soumis à un tamisage humide sur une série de deux tamis empilés, 255 $\mu$ m et 36 $\mu$ m. La fraction retenue par le dernier tamis contenant les spores, a été récupérée et répartie équitablement dans 4 tubes en plastiques de 50mL pour un maximum de 25mL par tube. 25mL de saccharose à 60% ont ensuite été injectés au fond des tubes à l'aide d'une seringue, puis les échantillons centrifugés 5 minutes à 800tpm. À la fin de la centrifugation, les spores, concentrées à l'interface eau-saccharose, ont été prélevées, rincées, et comptées dans 5 réplicats de 100 $\mu$ L sous loupe binoculaire (X45).



**Figure 6.** Schéma de l'extraction de spores (source : Leclerc, 2012).

### II.8.1.3/ EVALUATION DE L'ACTIVITE MINERALISATRICE DU CARBONE

L'indice de minéralisation du carbone représente la proportion de carbone minéralisable. En ce sens, cet indice représente l'activité globale de minéralisation de la matière organique par la microflore du sol. Cette méthode consiste à mesurer la minéralisation du carbone en conditions contrôlées, (proches de l'optimum biologique) après 28 jours d'incubation à 28°C. 40g de topsoil (équivalent sol sec), ajusté à une humidité de 80% de la capacité maximale de rétention en eau (CMR) ont été placés en incubation dans un récipient hermétique de 0,5 L contenant une fiole à scintillation contenant elle-même 10 mL de soude (NaOH 0,25 N) afin de doser le CO<sub>2</sub> piégé. La fiole a été récupérée à 14 jours et remplacée par une autre, récupérée à 28 jours afin d'éviter la saturation. La minéralisation du carbone a été mesurée par dosage du CO<sub>2</sub> piégé dans la soude à t14 et t28 jours par deux solutions de HCl: 0,1 et 0,5M (Joergensen, 1996). Les mesures sont réalisées à t14 et t28.

### II.8.2/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNE

L'évolution de la structure des communautés microbiennes a été mesurée pour chacun des topsoils stockés après un an par rapport au t<sub>0</sub>, par une approche métagénomique, par amplification d'une région d'ADN cible chez les bactéries et les champignons, puis soumises à séquençages afin de déterminer la structure de ces communautés.

#### II.8.2.1/ EXTRACTION ET AMPLIFICATION D'ADN

Pour chaque échantillon de topsoil prélevé à t<sub>0</sub> et t12 mois, huit extractions (réplicats) d'ADN ont été réalisées sur des sous-échantillons de 0,25 g, en utilisant le kit d'extraction Mobio PowerSoil (Mobio laboratories, Inc. Carlsbad, Ca, USA). Pour optimiser la lyse des cellules biologiques des échantillons, la méthode alternative proposée par Mobio a été mise en œuvre. Les sous-échantillons ont été soumis à trois cycles de vortex 3 secondes, puis d'incubation à 70°C pendant 5 minutes. Le reste des étapes de la procédure d'extraction a ensuite été réalisée selon les directives standard du kit. L'ADN extrait est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

La diversité des communautés bactériennes a été évaluée en ciblant la région V1-V3 (~545bp) du gène 16S à l'aide des amorces 27F et 553R. Cette région a été l'une des premières proposées comme marqueur phylogénétique des bactéries (Woese, 1987), et est couramment aujourd'hui utilisée dans ce type d'étude (Quast et al. 2013). Les communautés fongiques ont été analysées en ciblant la région d'ADN du gène de l'ARNr ITS2, qui est une région préconisée comme marqueur phylogénétique des champignons (Bates et al. 2013). Les amorces amorce ITS3 et ITS4 ont été utilisées pour amplifier cette région. White et al.

(1990) ont montré que ce jeu d'amorces était capable d'amplifier 95% des champignons, et 99% des Glomeromycota. Enfin, pour pouvoir associer après séquençage, chaque séquence d'ADN à l'échantillon qui lui correspond, des amorces taggées, c'est à dire additionnées de « séquences d'identification » ont été utilisées. L'ensemble des amorces utilisées dans cette étude est détaillé en annexe 2a pour les bactéries, et annexe 2b pour les champignons.

Les PCR ont été réalisées dans un tampon final de 25 $\mu$ L contenant 0,625 $\mu$ L à 0,25 $\mu$ M de chaque amorce, 2,5ng d'ADN matrice, tampon 1X, 0,08U GoTaq® ADN Flexi polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Les conditions d'amplification étaient les suivantes : une dénaturation initiale de 3min à 94°C, 30 cycles de dénaturation-hybridation-élongation de 30s à 94°C, 1min à 57°C, 1min30 à 72°C, et une élongation finale de 10min à 72°C. L'ADN amplifié a ensuite été purifié par filtration sur plaque Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). La pureté des produits a été visualisée sur gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon TAE. Les gels ont été colorés avec du bromure d'éthidium (0,5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) et visualisés sous lumière UV. La concentration d'ADN de chaque produit de PCR a été déterminée l'aide d'un Nanodrop (NanoDrop 2000, ThermoScientific, Wilmington, USA). Après quantification de l'ADN, 3 bibliothèques d'ADN ont été générées, regroupant chacune un mélange équimolaire de 10 amplicons correspondant à 10 échantillons de topsoil, tel que recommandé par 454 Life Sciences (Margulies et al. 2005). Les pools d'ADN ont ensuite été envoyés au laboratoire Beckman (Beckman Coulter Genomics, Massachusetts, USA) pour y être séquencés par pyroséquençage 454.

#### II.8.2.2/ TRAITEMENT DES DONNEES METAGENETIQUES

La qualité des données de séquençage a été analysée comme décrit par Nilsson et al. (2010) et a été traitée en utilisant le pipeline d'analyse QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al. 2010). Chaque séquence d'ADN est tronquée pour un score de qualité inférieure à 28, et réassociée à l'échantillon d'origine en fonction du TAG porté. Les séquences sont également tronquées après la première base ambiguë rencontrée, et les séquences inférieures à 50pb ne sont pas conservées. La présence de chimère a été contrôlée et retirée en utilisant l'algorithme Chimera Slayer présent dans le logiciel QIIME. Les séquences bactériennes et fongiques ont ensuite été regroupées en Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) en utilisant un seuil de similarité de 97% avec UCLUST (Kunin et al. 2010). La séquence la plus abondante de chaque OTU est choisie comme la séquence représentante de cet OTU. Les singletons ne sont pas conservés. L'assignation taxonomique a été réalisée en utilisant le Local Alignment Search Tool base (BLAST). La taxonomie bactérienne a été assignée contre la base de donnée SILVA SSU 111 avec un seuil de similarité de 97% (Quast et al. 2013). Pour les champignons, le logiciel

ITSx (version 1.0.10 ; Bengston-Palme et al. 2013) a été utilisé pour éliminer les séquences ITS2 non fongiques. Les séquences restantes ont ensuite été assignées par comparaison contre la base de données UNITE- INSD V6 (Abarenkov et al. 2010) en utilisant l'hypothèse de l'espèce (Kõljalg et al. 2013), dont la similarité de séquence varie de 97 à 98.5%. Les séquences non attribuées après cette étape ont été confrontées à la base de données MaarjAM en utilisant un seuil d'identité de 97% (Opik et al. 2010), pour identifier les Glomeromycota. Enfin, comme souligné par McMurdie et Holmes (2014), deux facteurs techniques doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats issus des outils de séquençage à haut débit. Le premier concerne les différences de profondeurs de séquençages qui peuvent exister entre échantillons. Le second concerne une représentation différentielle de chaque OTU qui peut varier, notamment en raison de variations de longueurs de séquence dans la région d'ADN ciblé par l'amplification. De tels facteurs peuvent alors fausser l'interprétation des résultats. Afin de tenir compte de ces facteurs techniques, nous avons réalisé une normalisation de nos données, à la fois pour les bactéries et les champignons, en utilisant le package edgeR au sein de l'environnement statistique R (" edgeR package", Robison et al. 2010). Ce package ajuste l'expression différentielle des profondeurs de séquençages et de séquençage de chaque OTU par le calcul de facteurs de mise à l'échelle entre chaque paire d'échantillons (fonction «calcNormFactors»). Ceci était particulièrement important dans notre cas pour le domaine fongique, où la variabilité de la longueur de ses séquences, telles que ciblées dans notre étude (290pb à 510pb), peut provoquer une forte expression de séquences courtes qui peuvent absorber une part substantielle de la taille totale de la bibliothèque, et ainsi biaiser les interprétations. De cette façon, nous avons généré une matrice d'OTU normalisée, à la fois pour les bactéries et les champignons. Ces nouvelles matrices ont été utilisées pour l'ensemble des analyses statistiques qui ont suivi.

## **II.9/ ANALYSES STATISTIQUES**

Nous avons utilisé plusieurs analyses statistiques multivariées pour comparer l'évolution de chaque variable du potentiel biologique des deux topsoils, pour chaque temps et profondeur de stockage (variables physico-chimiques, variables floristiques (banque de graines), variables microbiennes (quantitative et qualitative). L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide des logiciels PRIMER V7 (Primer - E Ltd, 239 Plymouth, Royaume-Uni) et R (R.3.1.1, R fondation) et utilisant le package VEGAN (Oksanen et al. 2015) avec des paramètres par défaut. Pour l'ensemble des tests statistiques, les données ont subi une transformation racine carrée (Hellinger), puis ont été utilisées pour générer des matrices de dissimilarité de Bray-Curtis dans le cas de variables biologiques multivariées, et

des matrices de dissimilarité Euclidienne dans tous les autres cas. La significativité statistique des tests retenus était  $p < 0,05$

Tout d'abord, pour chaque variable, nous avons utilisé des analyses de variance permutatoire (PERMANOVA) (Anderson, 2001) pour identifier les différences significatives globales, puis des analyses de variance permutatoire par paire (PERMANOVA PAIRWISE), pour comparer les échantillons 2 à 2. Les résultats ont été illustrés par des courbes dynamiques. Le modèle des PERMANOVAS était le suivant :

<b>Facteur</b>				<b>Model</b>
Nom	Abbrév	Type	Niveau	
Origine	Or	Fixé	2	Or
Profondeur	Pr	Fixé	3	Pr(Or)
Temps	Te	Fixé	6	Te(Pr(Or))
				Residus

Dans un second temps nous avons testé l'existence de corrélation entre nos variables par l'utilisation de tests de corrélation de Spearman (PRIMER V7). Le tableau des corrélations obtenu est donné en annexe 3.

Dans le cadre de l'analyse des données métagénétique, les tests de Spearman ont été remplacés par des analyses des modèles linéaires basés sur la distance (DISTLM), afin d'identifier les variables explicatives de l'évolution des communautés microbiennes. La DISTLM effectue un partitionnement de la variance en fonction d'un modèle de régression multiple, en utilisant des procédés de permutation. De plus, il est couplé avec des diagnostics préliminaires pour évaluer et prendre en compte la multi-colinéarité entre les variables prédictives qui pourrait biaiser les résultats (McArdle et Anderson, 2001). Les réponses des modèles produits ont été illustrés par des dbRDA (analyse de redondance sur basée sur la distance) (PRIMER V7). Les détails de chaque modèle DISTLM, bactérien et fongique, sont donnés en annexe 4a et 4b respectivement. Des analyses SIMPER (Clarke, 1993), ont également été réalisées afin d'identifier les taxons responsables des différences observées entre les différents échantillons de topsoils, 2 à 2.

### III/ RESULTATS

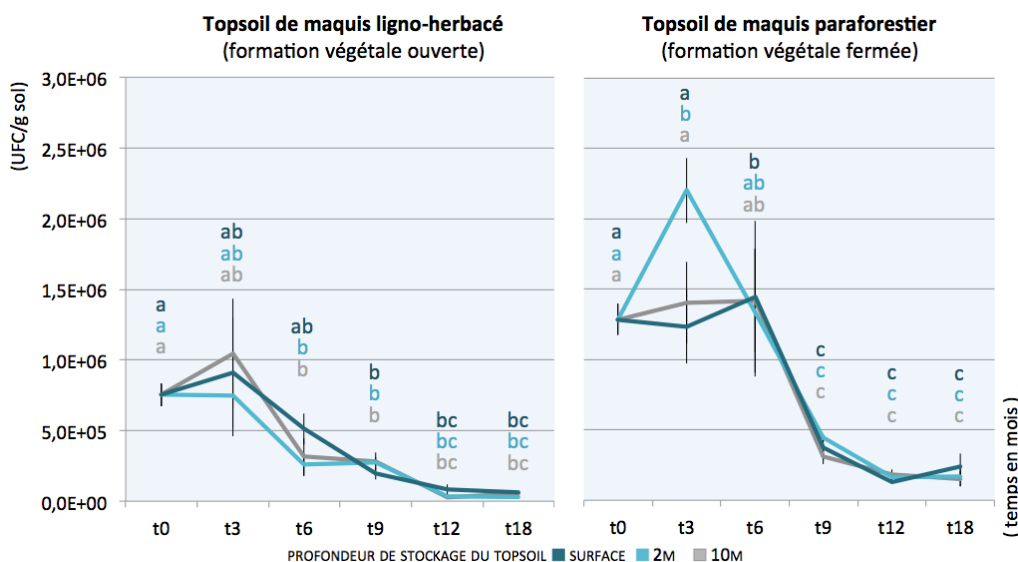
Afin de clarifier la présentation des résultats et leur interprétations par la suite, les différentes données sont analysées selon les trois questions posées : une première partie concerne l'effet temps de stockage, une seconde concerne la profondeur, une troisième l'effet origine du topsoil sur l'évolution des potentialités de restauration. Un quatrième paragraphe présente les corrélations supplémentaires. Le tableau complet des corrélations est donné en annexe 3. Ne concernant qu'un temps d'échantillonnage, l'analyse des données métagénomique est présentée de façon spécifique.

#### III.1/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR LE POTENTIEL MICROBIEN

##### III.1.1/ ASPECTS QUANTITATIFS

###### III.1.1.1/ EVOLUTION DES DENSITES DES BACTERIES AEROBIES

L'évolution des densités bactériennes aérobies pendant le stockage est présentée en figure 7.



**Figure 7.** Evolution de la densité des bactéries hétérotrophes aérobies cultivables dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

##### EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL

L'évolution des densités bactériennes aérobies au sein des stocks de topsoils est apparue significativement corrélée au temps de stockage ( $\rho = -0,790$ ,  $p < 0,0001$ ).

Globalement, les densités bactériennes diminuent au cours du temps pour les deux topsoils. Toutefois, sur la figure 7, on distingue deux phases d'évolution des densités bactériennes. Une première phase de maintien (voire d'augmentation) des densités, durant les premiers mois de stockage, qui précède une seconde phase, de diminution significative. La période de maintien dure 3 mois au sein du stock de topsoil de maquis ligno-herbacé et 6 mois au sein du stock de topsoil de maquis paraforestier. Au sein de ce dernier, une augmentation significative des densités bactériennes par rapport au t0 est notée pour la profondeur 2m, après 3 mois de stockage ( $p < 0,01$ ). Au-delà de ces périodes, on observe une diminution significative des densités bactériennes pour les deux topsoils, à toutes les profondeurs. Cela représente une baisse moyenne de 52% et 71% pour les topsoils de maquis ligno-herbacé et paraforestier respectivement. Une diminution continue est ensuite observée pour les deux topsoils, et les densités bactériennes se rapprochent des valeurs minimums observables sur l'ensemble du temps de stockage dès le 9<sup>ième</sup> mois. Finalement après 18 mois de stockage, le topsoil de maquis ligno-herbacé présente une baisse significative globale de 95% des valeurs des densités bactériennes par rapport au t0. Ces baisses sont de 85% pour le topsoil de maquis paraforestier.

#### EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL

Aucune corrélation entre la profondeur de stockage et l'évolution des densités bactériennes n'a pu être mise en évidence. En effet, à part une différence significative, observée au 3<sup>ème</sup> mois de stockage dans le topsoil paraforestier, des densités à la profondeur 2m par rapport aux autres profondeurs, les moyennes de densités observées ne diffèrent pas significativement selon les profondeurs, au sein de chaque topsoil. Ceci est visible sur la figure 7 où les courbes de profondeur se confondent après la période de maintien des premiers mois.

#### EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL

Malgré des profils globalement similaires (Fig. 7), il existe des différences d'évolution des densités bactériennes selon l'origine du topsoil ( $p < 0,001$ ). Comme décrit précédemment, une diminution plus rapide des densités bactériennes est observée dans le topsoil de maquis ligno-herbacé que dans le topsoil de maquis paraforestier, quelle que soit la profondeur considérée. Des baisses significatives apparaissent après 6 mois de stockage dans le topsoil ligno-herbacé, alors qu'elles n'apparaissent qu'après 9 mois dans le topsoil paraforestier. Enfin, comme cité précédemment, il existe une meilleure conservation des densités de colonies bactériennes après 18 mois de stockage dans le topsoil de maquis paraforestier avec un maintien de 15% des valeurs initiales, contre 5% dans le topsoil de maquis ligno-herbacé.

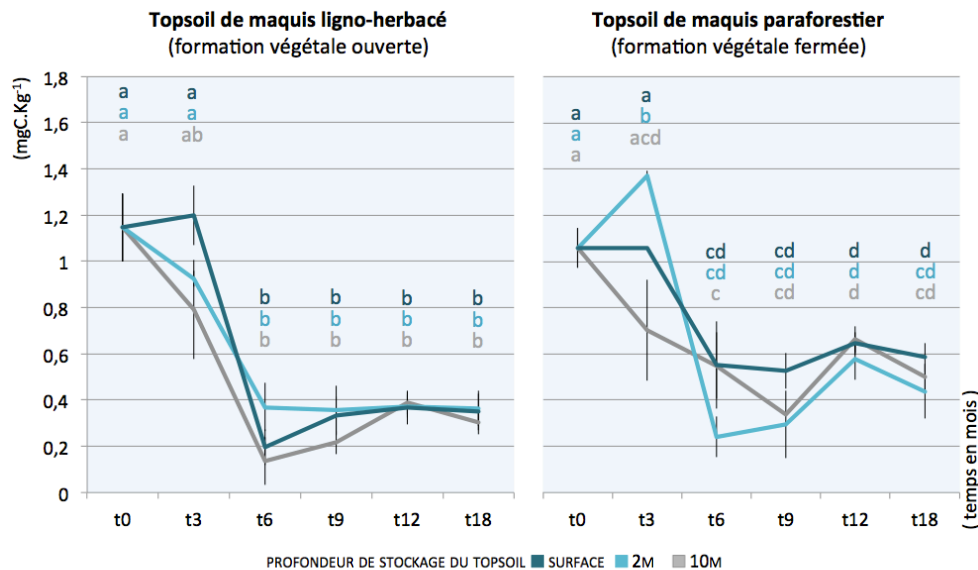


**AUTRES CORRELATIONS**

L'évolution des densités bactériennes aérobies quel que soit le topsoil, est aussi apparue corrélée à l'évolution des teneurs en Corg ( $\rho = 0,539$  ;  $p < 0,0001$ ), en Ntot ( $\rho = 0,433$  ;  $p < 0,0001$ ), en Fe ( $\rho = 0,478$  ;  $p < 0,0001$ ), de la masse volumique ( $\rho = 0,630$  ;  $p < 0,0001$ ), de la CEC ( $\rho = 0,449$  ;  $p < 0,0001$ ), et de l'abondance et de la richesse de la banque de graines ( $\rho = 0,458$  ;  $p < 0,0001$  et  $\rho = 0,510$  ;  $p < 0,0001$  respectivement).

III.1.1.2/ EVOLUTION DU POTENTIEL DE MINERALISATION DU CARBONE

L'évolution du potentiel de minéralisation du carbone (MinC) pendant stockage est présentée en figure 8.



**Figure 8.** Evolution du potentiel de minéralisation du carbone dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

**EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

L'évolution du potentiel de minéralisation du carbone est significativement corrélé au temps de stockage des topsoils ( $\rho = -0,554$ ,  $p < 0,0001$ ). A l'image des résultats de l'évolution des densités bactériennes, on distingue sur la figure 8, deux phases d'évolution du potentiel de minéralisation du carbone. Une première phase de maintien du potentiel de minéralisation du carbone est identifiable sur les 3 premiers mois de stockage pour chacun des topsoils. Comme pour les densités bactériennes, les échantillons de topsoils de maquis paraforestier stockés à la profondeur 2m, après 3mois, montrent une augmentation significative du potentiel de minéralisation par rapport au t0. Au-delà de la période de

maintien, une seconde phase de dégradation du potentiel de minéralisation du carbone est observée entre 3 et 6 mois de stockage, quels que soient les topsoils, et les profondeurs. Après 6 mois de stockage, les valeurs de potentiel de minéralisation du carbone semblent avoir atteint leurs minima au sein du topsoil ligno-herbacé, avec des diminutions moyennes de 80% dans le tas de topsoil de maquis ligno-herbacé. De même, et bien que fluctuantes, les valeurs de MinC tendent vers des minima dès 6 mois de stockage dans le topsoil paraforestier, avec une diminution moyenne de 57%.

#### EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL

De même que pour l'évolution des densités bactériennes, aucune corrélation entre la profondeur de stockage et l'évolution du potentiel de minéralisation du carbone n'a pu être mise en évidence. L'analyse permutative des variances des échantillons n'a révélé aucune différence entre les différentes profondeurs testées, exception faite des échantillons de topsoils de maquis paraforestier stockés à la profondeur 2m ( $1,37 \pm 0,02se$ ), après 3 mois, qui montrent une augmentation significative du potentiel de minéralisation par rapport au t0 ( $1,05 \pm 0,08se$ ) (Fig. 8).

#### EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL

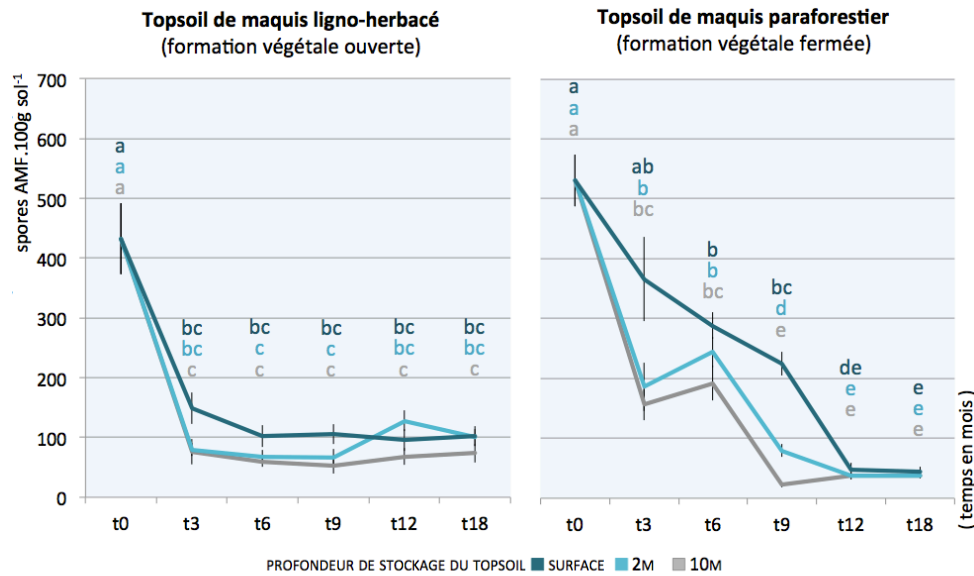
Enfin, l'analyse permutative des variances a révélé des évolutions du potentiel de minéralisation significativement différentes entre les deux topsoils ( $p < 0,01$ ). Ceci est visible sur la figure 8, où les deux topsoils présentent des courbes de profondeurs aux profils différents. Comme montré précédemment, cette différence étant principalement due à l'évolution du potentiel de minéralisation du carbone à 2m de profondeur qui diffère entre les deux topsoils. Il existe en effet une meilleure conservation du potentiel de minéralisation au sein du topsoil stocké de maquis paraforestier que dans le topsoil de maquis ligno-herbacé (diminutions moyennes de 80% dans le tas de topsoil de maquis ligno-herbacé, et de 57% dans le tas de topsoil de maquis paraforestier, après 6 mois).

#### AUTRES CORRELATIONS

L'évolution du potentiel de minéralisation du carbone pour les deux topsoils, est aussi apparue corrélée à l'évolution des densités bactériennes aérobies ( $\rho = 0,4,888$  ;  $p < 0,0001$ ), des teneurs en Corg ( $\rho = 0,600$  ;  $p = 0,0001$ ), en Ntot ( $\rho = 0,476$  ;  $p < 0,0001$ ), en Fe ( $\rho = 0,511$  ;  $p < 0,0001$ ), en Mn ( $\rho = 0,497$  ;  $p < 0,0001$ ), en Na ( $\rho = 0,620$  ;  $p < 0,0001$ ), de la CEC ( $\rho = 0,606$  ;  $p < 0,0001$ ).

III.1.1.3/ EVOLUTION DU POTENTIEL ENDOMYCORHIZOGENE

L'évolution du potentiel endomycorhizogène (PEM) pendant le stockage est présentée en figure 9.



**Figure 9.** Evolution des densités de spores AMF viables dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL

De la même façon, que pour les densités bactériennes, les résultats des densités de spores endomycorhiziennes viables montrent une diminution globale pendant le stockage (Fig. 9). Cette diminution est significativement corrélée au temps de stockage ( $\rho = -0,624$ ,  $p < 0,0001$ ), le nombre de spores AMF diminuant lorsque le temps de stockage augmente. Une dégradation significative du PEM est observée dès le 3<sup>ème</sup> mois pour le topsoil ligno-herbacé, pour les 3 profondeurs, qui atteignent à cette période leur valeur minimale correspondant à une baisse moyenne de 76% des densités de spores endomycorhiziennes viables. Cette dégradation est plus progressive au sein du topsoil paraforestier. 50% du PEM est perdu sur les 6 premiers mois, puis encore 20% les 3 mois suivants, et encore 20% après 3 mois supplémentaires. Finalement, après un an de stockage, 78% du PEM initial a été perdu dans le topsoil de maquis ligno-herbacé, et près de 92% dans le topsoil de maquis paraforestier.

**EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Bien que l'analyse permutacionnelle des variances, ne révèle que peu de différences significatives entre les diverses profondeurs de stockage testées (Fig.9), les densités de spores endomycorhiziennes sont, à l'inverse des deux variables précédentes, apparues significativement corrélées à la profondeur de stockage, diminuant lorsque celle-ci augmente ( $\rho = -0,527$ ,  $p < 0,0001$ ). On distingue ainsi, un écart moyen de 10% entre la surface et les profondeurs 2 et 10m, dans le topsoil de maquis ligno-herbacé, de 3 jusqu'à 9 mois. Des écarts moyens de 35% et 40% ont été mesurés entre la surface et les profondeurs 2 et 10m respectivement au sein du topsoil paraforestier, également de 3 jusqu'à 9 mois. Après un an de stockage, ces écarts semblent se réduire entre les différentes profondeurs dans chacun des topsoils.

**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

L'analyse permutacionnelle des variances révèle une évolution du PEM significativement différente entre les deux topsoils stockés ( $p < 0,001$ ) Ceci est visible sur la figure 9, où les profils d'évolution du PEM des deux topsoils diffèrent sensiblement. Le topsoil de maquis ligno-herbacé montre une dégradation rapide de son PEM quel que soit la profondeur considérée suivi d'une phase de stabilisation dès le 3<sup> me</sup> mois, alors que le topsoil paraforestier montre une dégradation beaucoup plus lente, ainsi que des valeurs de conservation variant selon la profondeur.  galement, comme décrit précédemment, après 18 mois de stockage, le topsoil ligno-herbacé montre de valeurs de conservation de PEM plus élevée que le topsoil paraforestier, avec 22% des valeurs initiales contre 8% respectivement.

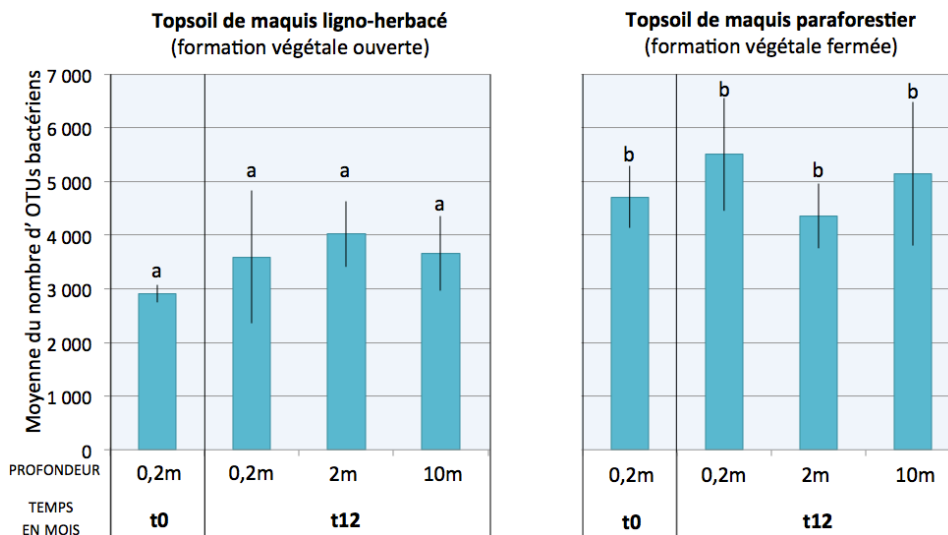
**AUTRES CORRELATIONS**

L'évolution du PEM quel que soit le topsoil, est aussi apparue corrélée à l'évolution des teneurs en Corg ( $\rho = 0,412$  ;  $p < 0,0001$ ), de la CEC ( $\rho = 0,429$  ;  $p < 0,0001$ ), de la masse volumique ( $\rho = 0,622$  ;  $p < 0,0001$ ), et de l'abondance et de la richesse de la banque de graines ( $\rho = 0,445$  ;  $p < 0,0001$  et  $\rho = 0,511$  ;  $p < 0,0001$  respectivement).

### III.1.2/ ASPECTS QUALITATIFS

#### III.1.2.1/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES APRES 12 MOIS DE STOCKAGE

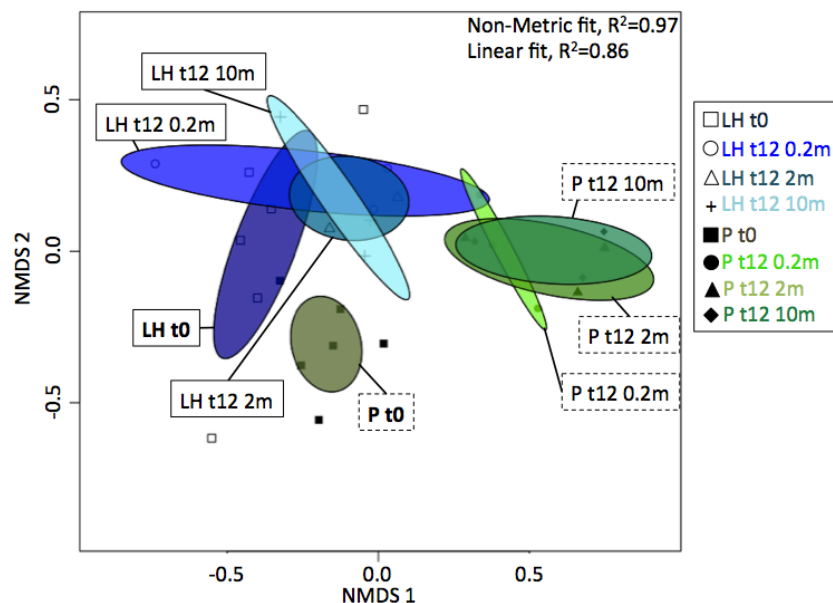
Le traitement des données de pyroséquençage 454 a permis d'identifier un total de 55 315 OTUs bactériens. Le nombre moyen d'OTUs est donné en figure 10. Au t0, pour le topsoil ligno-herbacé, le nombre moyen d'OTUs est de  $2917,50 \pm 163,37se$ . Ce nombre est significativement plus élevé pour le topsoil paraforestier au t0 ( $4730,67 \pm 588,76se$  ;  $p < 0,01$ ). Après 12 mois de stockage, et bien que montrant quelques variations, les moyennes d'OTUs observées ne présentent aucune différence significative par rapport au t0, quel que soit le topsoil, ou les profondeurs étudiées. De même, aucun effet temps, ou effet profondeur de stockage sur l'évolution du nombre d'OTU, n'a pu être mis en évidence.



**Figure 10.** Moyenne du nombre d'OTUs bactériens ( $\pm se$ ) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) et du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

Au total, 45 phylas bactériens ont pu être identifiés. L'abondance de ces phylas au sein de chaque topsoil est détaillée en annexe 5. En moyenne, pour les deux topsoils et l'ensemble des profondeurs de stockage, les principaux phylas dominants sont les Proteobacteria ( $43,0\% \pm 2,9se$ ), les Acidobacteria ( $29,1\% \pm 1,6se$ ), les Actinobacteria ( $13,0\% \pm 0,2se$ ), les Planctomycètes ( $8,41\% \pm 1,1se$ ), les Chloroflexi ( $5,84\% \pm 0,7se$ ), les Verrucomicrobia ( $5,1\% \pm 0,8se$ ), les Bacteroidetes ( $4,1\% \pm 1,4se$ ) et les Firmicutes ( $2,7\% \pm 0,4se$ ). Les phylas restants comptent pour moins de 2% chacun. Une analyse permutacionnelle a permis de mettre en évidence une évolution de la structure en OTUs des

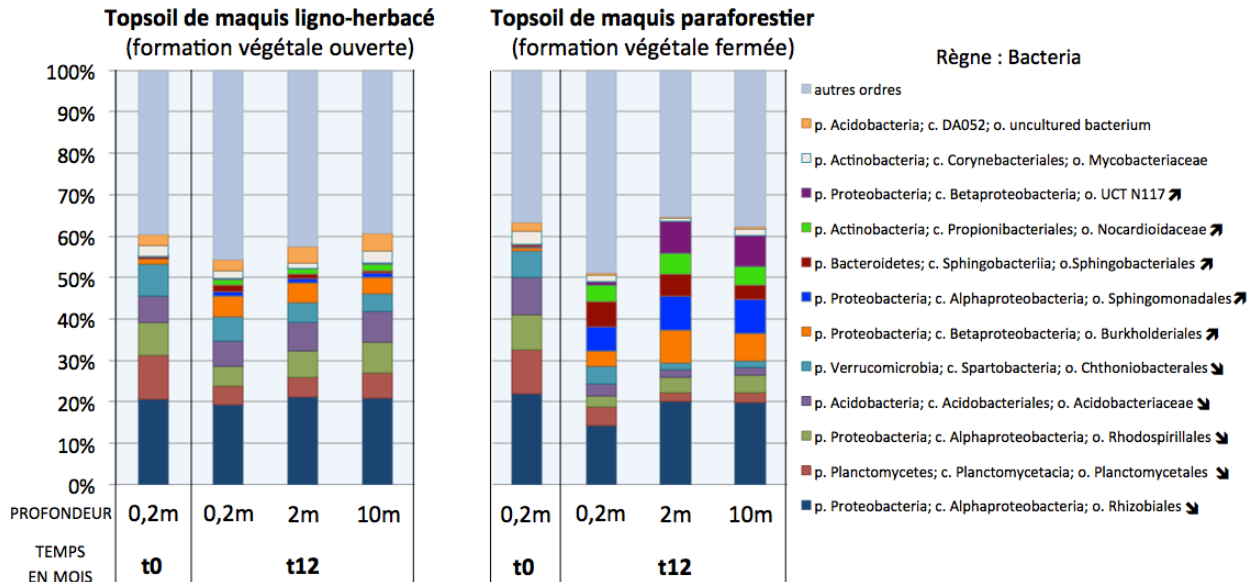
communautés bactériennes entre le t0 et après 12 mois de stockage des topsoils pour les deux topsoils testés ( $p < 0,001$ ). Ce résultat est illustré par l'analyse non métrique multidimensionnelle des matrices de distances présentée en figure 11. Sur cette figure on peut voir que les changements dans la structure en OTUs des communautés bactériennes interviennent de façon identique aux trois profondeurs testées. Un effet origine du topsoil caractérise cependant l'évolution des communautés bactériennes du topsoil ( $p < 0,001$ ). En effet, les deux topsoils présentant au t0 des structures bactériennes différentes, montrent des évolutions différentes pendant stockage, mettant en avant un effet origine des topsoils ( $p < 0,001$ ).



**Figure 11.** Analyse non métrique multidimensionnelle des structures des communautés bactériennes des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). L'ordination est basée sur les matrices de distances de similarité Bray-Curtis de l'abondance de chaque OTU au sein des échantillons. La distance entre les ellipses indique le degré de similarité entre communautés. LH (topsoil de maquis ligno-herbacé), P (topsoil de maquis paraforestier). Les ellipses représentent un intervalle de confiance à 95% autour du centre de gravité moyen des échantillons correspondant à une profondeur et à un temps de stockage. La distance entre les ellipses traduit un degré de similitude entre les échantillons. Lorsque ces ellipses se chevauchent, les échantillons ne sont probablement pas différents au seuil de significativité de 0,05%.

A l'inverse, si l'évolution de la structure en OTUs diffère selon l'origine du topsoil, les analyses SIMPER révèlent que ce sont les mêmes ordres qui varient au sein des deux topsoils stockés. Ces tests ont montré que 45% et 50% des différences observées entre le t0 et les structures des communautés bactériennes des t12, au sein des topsoils de maquis ligno-herbacé et de maquis paraforestier, sont communément dues à la variation de l'abondance d'une douzaine d'ordres. Ce résultat est illustré par la figure 12. Il s'agit principalement d'une diminution des Rhizobiales, des Planctomycetales, des Rhodospirales, des Acidobacteria, des Chthoniobacterales, et d'une augmentation des Burkholderiales, des

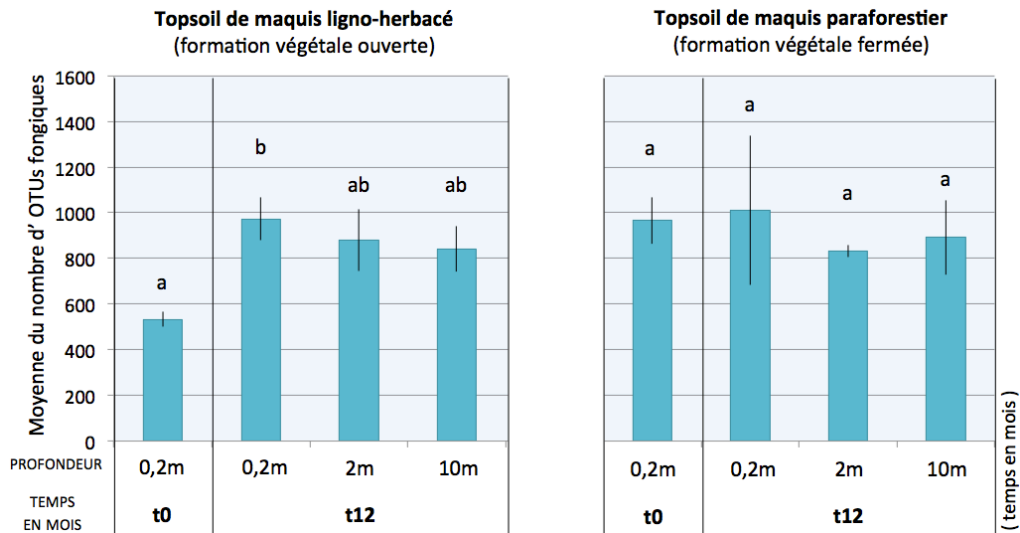
Spingomonadales, des Spingobacterales, et Nocardiodiaceae. De plus, l'analyse DISTLM en fonction des caractéristiques édaphiques, a permis de mettre en évidence un modèle qui explique de manière significative 16% de la variabilité des communautés bactériennes entre le t0 et le t12. Ce modèle inclus le pH H2O et les teneurs en Carbone organique total qui explique respectivement 10% et 6% de la variabilité observée).



**Figure 12.** Abondance relative des ordres bactériens dans les topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). Seuls 12 ordres sur 496 identifiés sont représentés sur ce graphique. Ces 12 ordres bactériens expliquent à 45% les différences de structures observées entre les échantillons chacun pour plus de 2%. Les ordres restants expliquant pour moins de 2% ont été regroupés sous l'appellation « autres ordres ». p. (phyla), c. (classe), o. (ordre).

### III.1.2.2/ EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES APRES 12 MOIS DE STOCKAGE

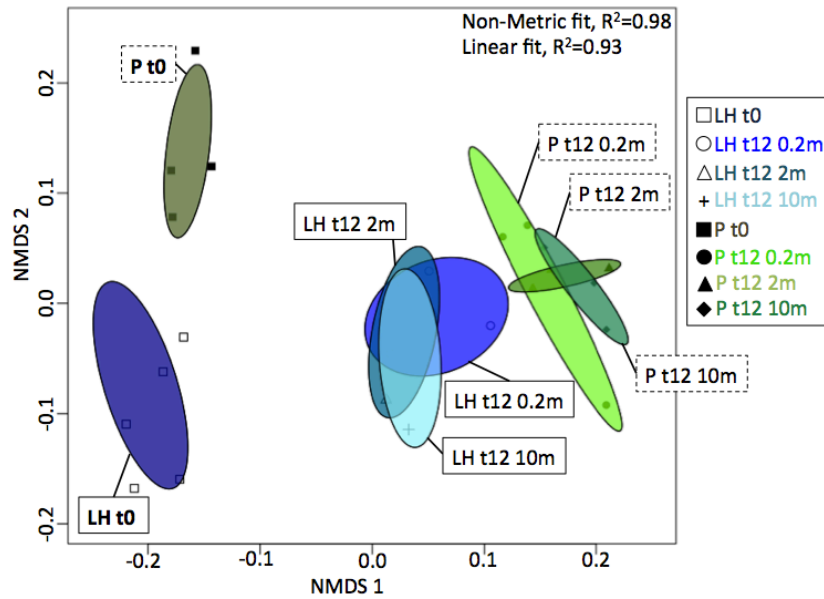
L'analyse des données métagénomiques des communautés fongiques a permis l'identification de 21 486 OTUs. Le nombre moyen d'OTUs fongiques est donné en figure 13. Au t0, le nombre moyen d'OTUs est de  $533.67 \pm 34.09$  pour le topsoil ligno-herbacé, et de  $965,25 \pm 101,02$  se pour le topsoil paraforestier. A l'exception d'une augmentation significative du nombre moyen d'OTUS dans le topsoil de maquis ligno-herbacé stocké en surface, par rapport au t0 ( $973,3 \pm 95,2$ se,  $p < 0,05$ ), aucune autre différence significative n'a été relevée. Au total, 6 phylas fongiques ont été identifiés. Les principaux phylas dominant sont les Ascomycota ( $42,6\% \pm 5,7$ se), et les Basidiomycota ( $25,6\% \pm 7,2$ se). Les OTUS classés comme non identifiés représentent  $28,4\% (\pm 5,37$ se). Les phylas restant sont les Zygomycota ( $3,3\% \pm 0,5$ se), les Chytridiomycota ( $>1\%$ ), Les Glomeromycota ( $>1\%$ ) et les Blastocladiomycota ( $>1\%$ ). L'abondance détaillée des phylas selon l'origine du topsoil est présentée en annexe 6.



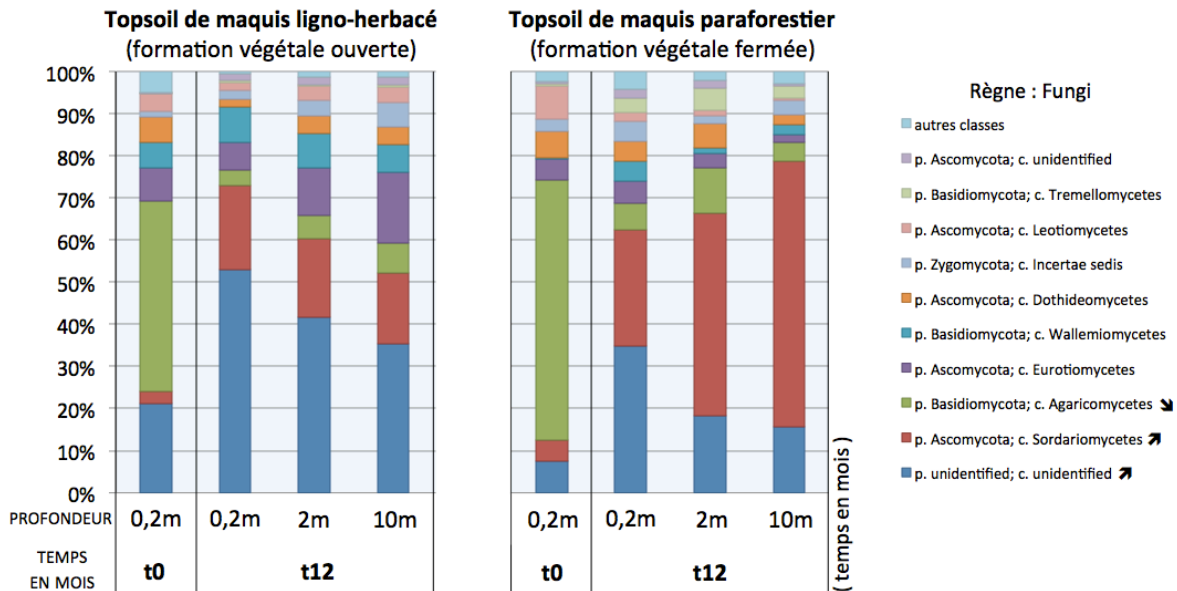
**Figure 13.** Moyenne du nombre d'OTUs fongiques ( $\pm$ se) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux échantillons présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

L'analyse de variances par permutation de la structure en OTUs montre qu'un changement de la structure des communautés fongiques intervient entre le t0 et après 12 mois de stockage pour les deux topsoils ( $p < 0,001$ ). Ce résultat est illustré par l'analyse non métrique multidimensionnelle des matrices de distances présentée en figure 14. Comme observé pour les communautés bactériennes, les changements de structure observés pour la communauté fongique ne diffèrent pas significativement entre les trois profondeurs de stockage. Néanmoins, là encore, Un effet origine du topsoil caractérise des évolutions distinctes des communautés fongiques ( $p < 0,001$ ). Les deux topsoils présentant au t0 des structures fongiques différentes, montrent des évolutions différentes pendant le stockage ( $p < 0,001$ ). Les analyses SIMPER révèlent que 68,3% et 69,8% des différences observées entre le t0 et les structures des communautés fongiques après 12 mois de stockage au sein des topsoils de maquis ligno-herbacé et de maquis paraforestier sont, au niveau taxonomique des ordres, dues aux variations de 3 groupes. La figure 14 montre qu'il s'agit des mêmes classes qui varient au sein des deux topsoils stockés. Il s'agit d'une diminution des Agaricomycetes, et d'une augmentation des Sordariomycetes ainsi que des séquences fongiques non identifiées. L'analyse DISTLM en fonction des caractéristiques édaphiques, a permis de mettre en évidence un modèle qui explique de manière significative 29,36% de la variabilité des communautés fongiques entre le t0 et le t12. Ce modèle inclus le pH H<sub>2</sub>O, le potentiel de minéralisation du carbone, les teneurs en manganèse extractibles, et les teneurs en potassium échangeables (respectivement 13,42%, 7,28%, 4,38% et 4,28%).





**Figure 14.** Analyse non métrique multidimensionnelle des structures des communautés fongiques des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). L'ordination est basée sur les matrices de distances de similarité Bray-Curtis de l'abondance de chaque OTU au sein des échantillons. La distance entre les ellipses indique le degré de similarité entre communautés. LH (topsoil de maquis ligno-herbacé), P (topsoil de maquis paraforestier). Les ellipses représentent un intervalle de confiance à 95% autour du centre de gravité moyen des échantillons correspondant à une profondeur et à un temps de stockage. La distance entre les ellipses traduit un degré de similitude entre les échantillons. Lorsque ces ellipses se chevauchent, les échantillons ne sont probablement pas différents au seuil de significativité de 0,05%.

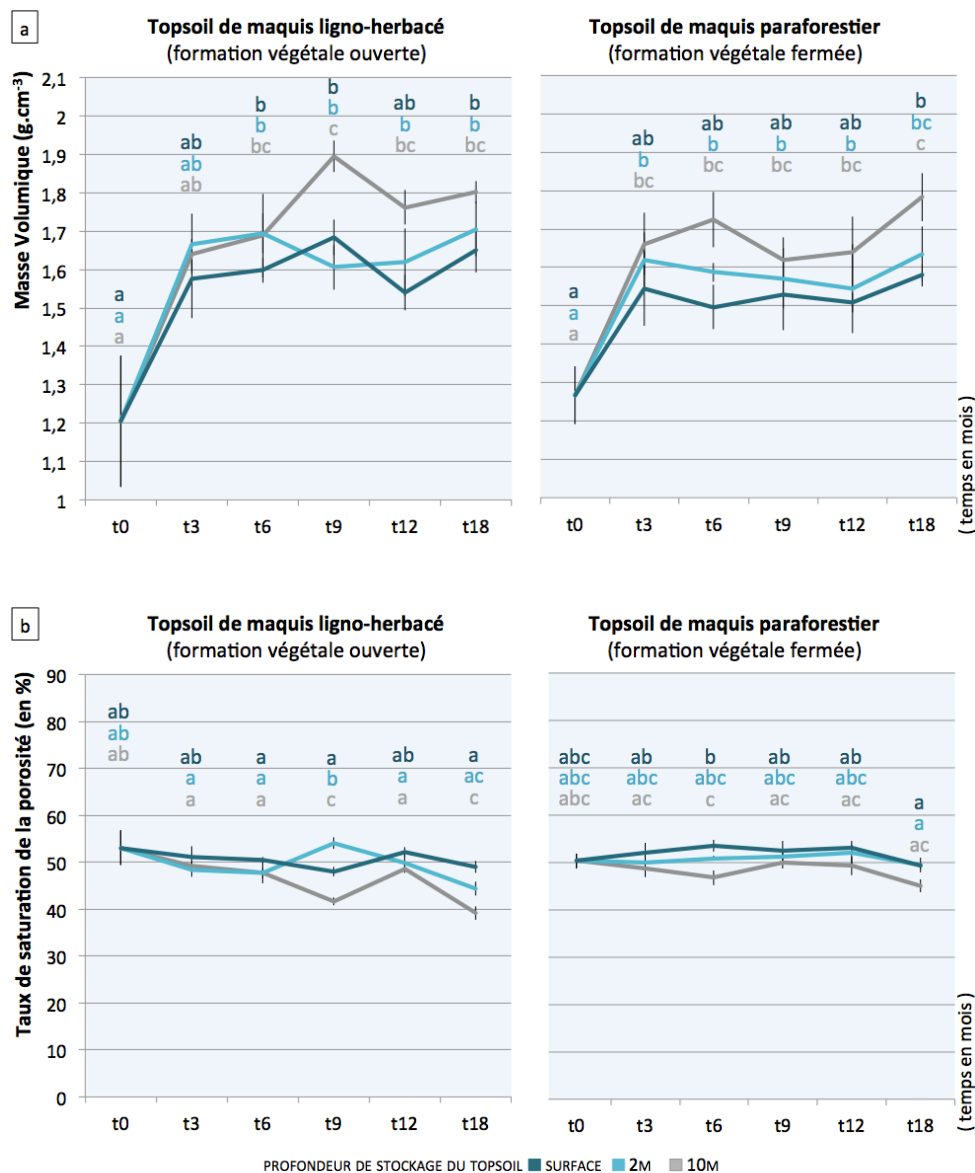


**Figure 15.** Abondance relative des classes fongiques des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). Pour plus de lisibilité, seules 10 classes sur les 41 identifiées sont représentées. Les trois premières expliquant significativement près de 70% des différences observées entre les topsoils stockés et les t0. p. (phyla), c. (classe).

### III.2/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR LEURS CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

#### III.2.1/ EVOLUTION DE LA MASSE VOLUMIQUE ET DES TAUX DE SATURATION DE LA POROSITE EN EAU

Les évolutions des masses volumiques et des taux de saturation de la porosité en eau sont respectivement présentées dans les figures 16a et 16b.



**Figure 16.** (a). Evolution des masses volumiques ( $\pm$ se) et, (b). évolution des taux de saturation de la porosité (en %) dans les topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

**EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Il existe globalement sur la période d'étude une augmentation progressive des masses volumiques des topsoils stockés (Fig 16a), néanmoins aucune corrélation entre l'augmentation du temps de stockage et l'augmentation des masses volumiques n'a pu être mise en évidence. La figure 16a, montre en effet, que si des phénomènes de compaction se mettent principalement en place dans les trois premiers mois, les valeurs des masses volumiques varient peu par la suite. Durant ces trois premiers mois, l'augmentation des masses volumiques au sein des stocks de topsoil ligno-herbacé est de près de 40% aux profondeurs 2m et 10m, et de 31% en surface. Sur la même période, les augmentations des masses volumiques au sein du topsoil paraforestier sont de près de 30% aux profondeurs 2m et 10m et de 22% en surface des versés. Au-delà, les masses volumiques des deux topsoils, continuent à augmenter mais de façon plus lente. Après 18 mois, l'augmentation des masses volumiques s'est accentuée de 13% à 10m et de 5% en surface et à 2m dans la verse de topsoil de maquis ligno-herbacé, et de 9% à la profondeur 10m et de 2% en surface et à 2m dans la verse de maquis paraforestier. Concernant, les taux de saturation, les valeurs évoluent peu, restant très proches des valeurs enregistrées au t<sub>0</sub>, quels que soit le topsoil et la profondeur,(Fig. 16b). Aucune corrélation avec le temps de stockage n'a été identifiée.

**EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

L'évolution de la masse volumique est apparue significativement corrélée à la profondeur de stockage de topsoils ( $\rho = 0,549$ ,  $p = 0 < 000,1$ ). Sur la figure 16a, on observe une augmentation des masses volumiques moins importante en surface qu'en profondeur. Cela traduit la mise en place d'un gradient de compaction vertical et la stratification de la structure des versés à topsoils pendant stockage. Il existe toutefois très peu de différences significatives des valeurs des masses volumiques entre les profondeurs. Seuls deux cas ont pu être relevés entre les échantillons de surface et stockés à 10m de profondeur, à t<sub>9</sub> mois pour le topsoils de maquis ligno-herbacé, et à t<sub>18</sub> mois pour le topsoil de maquis paraforestier.

De la même façon, nos résultats ont révélé un gradient vertical de saturation de la porosité en eau du sol, pour chacun des deux topsoils étudiés (Fig.16b). Par rapport à la masse volumique, ce gradient est cependant inversé. Le taux de saturation de la porosité en eau apparaît toujours plus important en surface et diminue significativement lorsque la profondeur de stockage du topsoil augmente ( $\rho = -0,338$ ,  $p = 0 < 000,1$ ). Toutefois, les écarts des taux de saturation de la porosité en eau entre les différentes profondeurs sont peu importants et rarement significatifs (Fig 16b), à l'exception du topsoil de maquis ligno-herbacé stocké à 10m, qui montre une différence significative par rapport au t<sub>0</sub> après 18

mois de stockage ( $p < 0,01$ ). Les valeurs enregistrées pour les autres échantillons ne diffèrent pas significativement du t0.

#### EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL

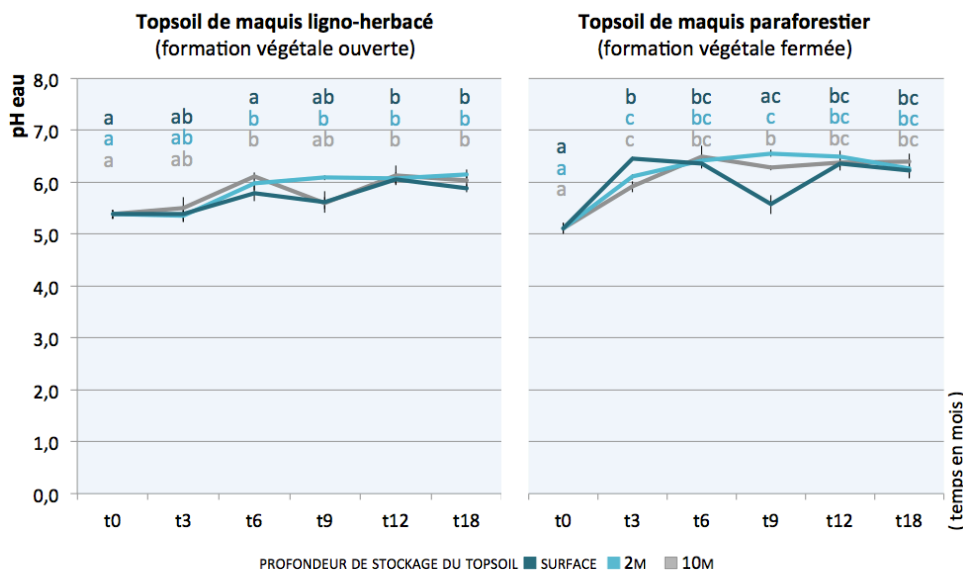
Enfin, la comparaison des deux verses a permis de mettre en évidence des phénomènes de compactions différents selon l'origine du topsoil ( $p < 0,001$ ). Comme cité précédemment, il existe des phénomènes de compaction plus importants au sein de la verse de topsoil de maquis ligno-herbacé pour toutes les profondeurs observées mais également selon le temps. Ainsi, dès 3 mois de stockage, des phénomènes de compaction sont apparus, variant de 33 à 45% de la surface vers la profondeur au sein du tas de topsoil de maquis ligno-herbacé et de 21 à 33% de la même façon pour le tas de topsoil de maquis paraforestier. A l'inverse, aucun effet origine n'a pu être mis en évidence, et ne semble influencer significativement les taux de saturation de la porosité en eau.

#### AUTRES CORRELATIONS

Il existe une forte corrélation entre l'augmentation des masses volumiques et de la diminution des taux de saturation de la porosité en eau ( $\rho = -0,764$  ;  $p < 0,0001$ ).

### III.2.2/ EVOLUTION DES VALEURS DE pH

L'évolution du pH pendant le stockage est présentée figure 17.



**Figure 17.** Evolution des pH eau ( $\pm$ se) des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

**EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Une augmentation des valeurs de pH, significativement corrélée au temps de stockage ( $\rho = 0,520$ ,  $p < 0,01$ ) a été enregistrée. Les valeurs initiales de pH sont respectivement, 5,4 et 5,1 pour les topsoils ligno-herbacé et paraforestier. Après 18 mois de stockage, ces valeurs sont significativement supérieures d'une unité en moyenne, par rapport aux valeurs observées au t0, quelle que soit la profondeur de stockage étudiée, pour les deux topsoils ( $p < 0,01$ ) (Fig. 17). Elles passent de 5,4 à 6,2 pour le topsoils de maquis ligno-herbacé, et de 5 à 6,4 pour le topsoil de maquis paraforestier.

**EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

L'augmentation des valeurs de pH est également corrélée à l'augmentation des profondeurs de stockage ( $\rho = 0,300$ ,  $p < 0,0001$ ). Bien que les valeurs de pH apparaissent globalement plus importantes des zones profondes de stockage vers la surface, peu de différences significatives ont été enregistrées entre les profondeurs. Deux différences existent entre les valeurs de pH de surface et les profondeurs 2m et 10m, à 3 mois et 9 mois de stockage pour le topsoil paraforestier (Fig. 17).

**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

Il existe une différence d'évolution des valeurs de pH entre les deux topsoils testés ( $p < 0,01$ ). Sur la figure 17, on peut observer une augmentation plus rapide des valeurs de pH au sein du stock de topsoil de maquis paraforestier, où des augmentations apparaissent significatives à toutes les profondeurs par rapport au t0 après 3 mois de stockage. Au sein de la verse de maquis ligno-herbacé, ces augmentations sont plus progressives et n'apparaissent significatives aux profondeurs 2m et 10m qu'après 6 mois de stockage, et en surface qu'après 12 mois. De plus, les variations de pH par rapport au t0 sont plus importantes pour le topsoil de maquis paraforestier que pour le topsoil de maquis ligno-herbacé. Après 18 mois, quelle que soit la profondeur observée, l'augmentation moyenne respective des valeurs de pH est de 1,2 ( $\pm 0,05se$ ) contre 0,6 ( $\pm 0,08se$ ) pour le topsoil ligno-herbacé.

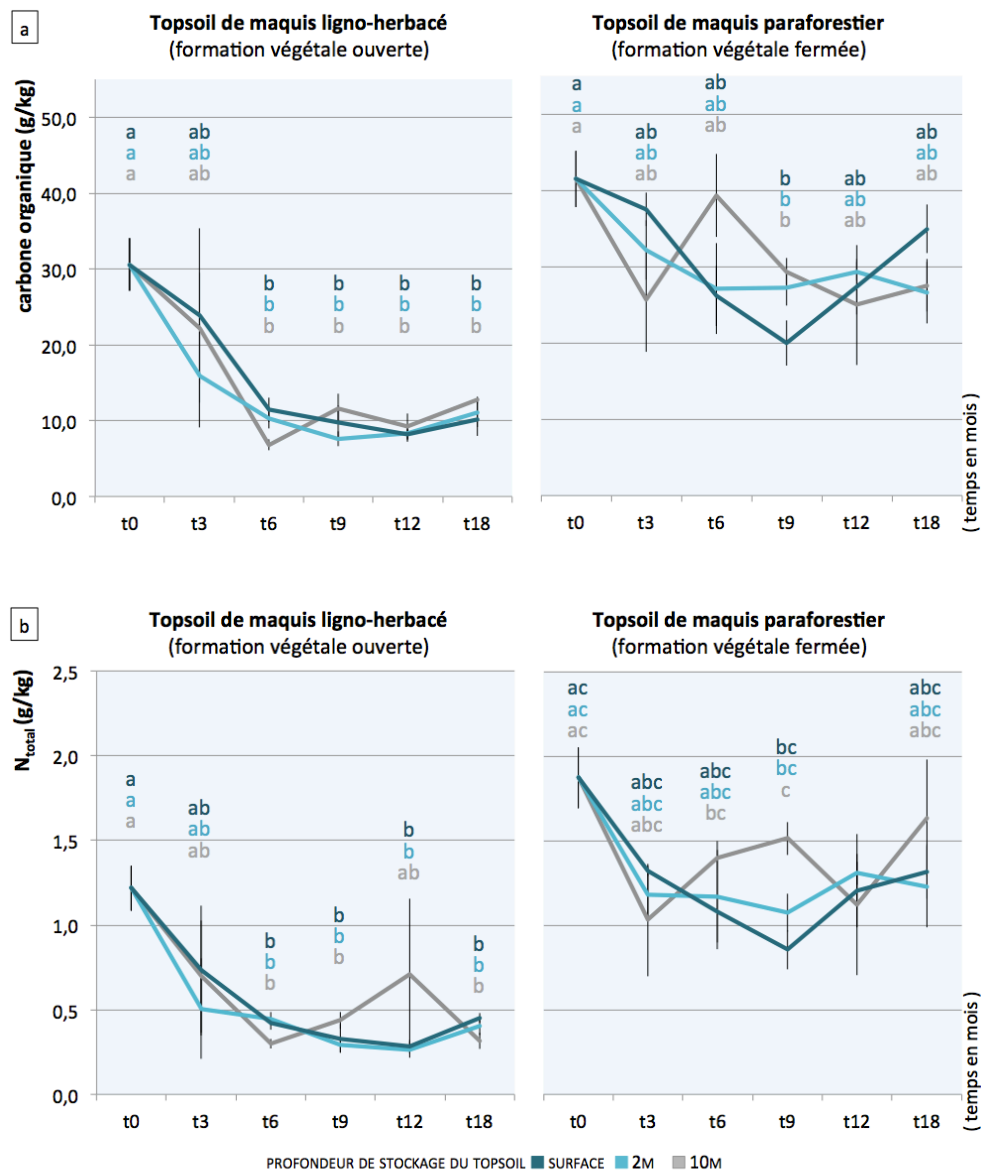
**AUTRES CORRELATIONS**

Les variations de pH sont apparues corrélées aux teneurs en Ni ( $\rho = 0,526$  ;  $p < 0,0001$ ), Co ( $\rho = 0,557$  ;  $p < 0,0001$ ), Ca ( $\rho = 0,582$  ;  $p < 0,0001$ ), Mg ( $\rho = 0,716$  ;  $p < 0,0001$ ), K ( $\rho = 0,536$  ;  $p < 0,0001$ ).

### III.2.3/ EVOLUTION DES STOCKS DE CARBONE ORGANIQUE ET D'AZOTE TOTAL ET DU RAPPORT C/N

#### III.2.3.1/ EVOLUTION DES STOCKS DE C ET DE N

Les évolutions des stocks de carbone organique (Corg) et d'azote total (Ntot) pendant stockage sont présentées respectivement, figures 18a et 18b.



**Figure 18.** Evolution (a) du Carbone organique ( $\pm se$ ), (b) de l'Azote total ( $\pm se$ ) des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier) et du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

**EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Sur l'ensemble de la période testée, les quantités de carbone organique et d'azote total montrent une baisse significative en fonction du temps (Fig. 18a, 18b). Ces diminutions sont significativement corrélées au temps de stockage ( $\rho = -0,417$ ,  $p < 0,0001$  et  $\rho = -0,324$ ;  $p < 0,01$  respectivement.). Après 18 mois, on observe des baisses significatives moyennes de 72% du Corg, et de 65% du Ntot au sein du tas de topsoil de maquis ligno-herbacé, quelle que soit la profondeur de stockage. Des baisses moyennes du Corg de 30% en surface et de 40% aux profondeurs 2 et 10m sont relevées dans le tas de topsoil de maquis paraforestier après 18 mois, mais n'apparaissent pas significativement différentes des valeurs initiales. De même, il existe à cette période, des baisses moyennes de Ntot de 12% à la profondeur 10m, et de 25% en surface et à 2m de profondeur au sein du topsoil paraforestier.

**EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Aucun effet profondeur n'a été identifié, les baisses des teneurs en C et N étant similaires pour les trois profondeurs testées au sein des deux topsoils. Sur les figures 18a et 18b, on constate en effet, malgré la présence de fluctuations des valeurs de pH sur la période d'essai, que celles-ci ne sont jamais significatives entre les profondeurs.

**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

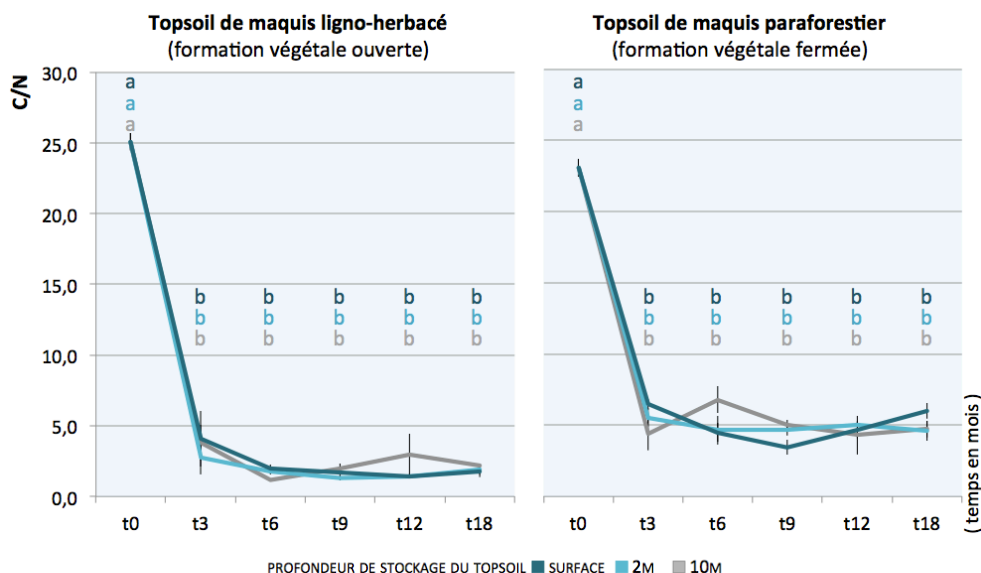
L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence une différence d'évolution des teneurs en C et N, selon l'origine du topsoil ( $p < 0,0001$  dans les deux cas). Comme cité ci-dessus, il existe une meilleure conservation des taux de carbone et d'azote au sein du topsoil stocké de maquis paraforestier. Sur les figures 18a et 18b, on constate en effet que les pertes de Corg et de Ntot sont pratiquement doubles au sein du topsoil stocké de maquis ligno-herbacé.

**AUTRES CORRELATIONS**

Comme décrit précédemment, les évolutions de Corg et le Ntot sont corrélées aux densités bactériennes aérobies (Corg,  $\rho = 0,539$ ;  $p < 0,0001$ . Ntot,  $\rho = 0,433$ ;  $p < 0,0001$ ), au PEM (Corg,  $\rho = 0,412$ ), au MinC (Corg,  $\rho = 0,600$ ,  $p = 0,0001$ . Ntot,  $\rho = 0,476$ ;  $p < 0,0001$ ). En outre, les évolutions des taux de Corg et de Ntot sont fortement corrélées ( $\rho = 0,949$ ;  $p < 0,0001$ ).

## III.2.3.2/ EVOLUTION DU RAPPORT C/N

L'évolution du rapport C/N pendant stockage est présentée figure 19.



**Figure 19.** Evolution du rapport C/N des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

#### EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL

De façon identique pour les deux topsoils, on observe figure 19, une baisse significative du rapport C/N durant les trois premiers mois de stockage. Bien qu'on puisse observer une baisse nette du rapport C/N dans chacune des deux versées, aucune corrélation globale de ce rapport n'a pu être mise en évidence avec le temps de stockage. Les baisses observées se produisent entre le t0 et 3 mois de stockage, date à laquelle le rapport C/N atteint des valeurs minimales pour chacune des deux versées. Ces diminutions sont significatives, et de l'ordre de 85% dans le topsoil de maquis ligno-herbacé, et de 76% dans le topsoil de maquis paraforestier ( $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ , respectivement).

#### EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL

Aucun effet « profondeur de stockage » n'a pu être mis en évidence sur l'évolution du rapport C/N (Fig 19). On constate en effet une évolution similaire du rapport C/N, aux trois profondeurs testées, pour chacun des deux topsoils.



**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

A l'inverse, il existe une différence d'évolution du rapport C/N selon l'origine du topsoil ( $p < 0,01$ ). Cette différence est due, comme cité plus haut, à la diminution du rapport C/N par rapport au t<sub>0</sub>, moins importante dans la verse de topsoil de maquis paraforestier, que dans la verse de topsoil de maquis ligno-herbacé.

**AUTRES CORRELATIONS**

Le rapport C/N est apparu significativement corrélé aux teneurs en Cr ( $\rho = 0,503$ ,  $p < 0,0001$ ) et Ntot ( $\rho = 0,511$ ,  $p < 0,0001$ ).

**III.2.4/ EVOLUTION DE LA CEC ET DES BASES ECHANGEABLES**

L'évolution de la CEC et des teneurs en bases échangeables  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  pour chaque profondeur et temps de stockage, pour les deux topsoils sont présentés dans les tableaux : 1 pour le topsoil ligno-herbacé et 2, pour le topsoil paraforestier.

**EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL**

Globalement, les résultats ont montré une diminution de la CEC au cours du stockage, qui se manifeste essentiellement dans les 6 premiers mois ( $\rho = -0,355$ ,  $p < 0,001$ ) (Tab1A, 1B). Après 18 mois de stockage, il y a une baisse significative moyenne de la CEC de 44% dans le topsoil de maquis ligno-herbacé, et de 30% dans le topsoil de maquis paraforestier ( $p < 0,001$  dans les deux cas). Des baisses significatives des moyennes de  $Na^+$  sont observées dans les deux topsoils. Ces baisses sont apparues négativement corrélées au temps de stockage ( $\rho = -0,342$ ,  $p < 0,001$ ), et sont de l'ordre de 70% en moyenne dans le topsoil de maquis ligno-herbacé, et de 50% dans le topsoil de maquis paraforestier après 18 mois ( $p < 0,01$  dans les deux cas). Des augmentations des valeurs de  $Mg^{2+}$  sont enregistrées pour les deux topsoils, et sont corrélées au temps de stockage ( $\rho = 0,328$ ,  $p < 0,001$ ). Après 18 mois de stockage, ces augmentations sont d'ordres moyens de 48% pour le topsoil ligno-herbacé. A l'inverse, d'ordres moyens de 53% dans le topsoil paraforestier, ces augmentations y apparaissent significatives par rapport au t<sub>0</sub>.

Les évolutions de  $K^+$ , de  $Ca^{2+}$  et du rapport Ca/Mg apparaissent opposées dans les deux topsoils. Les valeurs de ces trois composants présentent après 18 mois, une baisse dans le topsoil de maquis ligno-herbacé (d'ordres moyens de 27% ; 50% et 68% respectivement), sans que celles-ci soient significatives. Au sein du topsoil paraforestier, des augmentations moyennes significatives de 157% ( $K^+$ ) et non significatives moyennes de 137% ( $Ca^{2+}$ ) sont observées après 18 mois. Les évolutions de ces éléments ne sont pas apparues corrélées au temps de stockage. Concernant le rapport Ca/Mg celui-ci présente

une baisse globale mais non significative de 68% dans le topsoils ligno-herbacé, et une augmentation, non significative également, de 53% dans le topsoil paraforestier.

#### EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL

Aucunes différences significatives d'évolution de l'ensemble des éléments entre les différentes profondeurs n'ont été mises en évidence. En effet, bien que des fluctuations puissent être observées entre les différentes profondeurs, les tendances d'évolution globale varient dans des proportions quasiment similaires pour chaque temps d'étude considéré.

#### EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL

Selon les résultats décrits précédemment, une différence d'évolution de l'ensemble de ces éléments a été mise en évidence entre les deux topsoils. Ces différences sont à la fois dues aux variations des éléments  $K^+$ ,  $Ca^+$  et du rapport  $Ca/Mg$  qui évoluent dans des sens contraires, mais également des proportions et des vitesses d'évolutions variant différemment au sein des deux topsoils. Il existe une baisse plus rapide de la CEC dans le topsoil stocké de maquis ligno-herbacé, que dans le topsoil stocké de maquis paraforestier. Au sein du topsoil ligno-herbacé, celle-ci est significative après 6 mois de stockage alors qu'elle ne l'est qu'après 9 mois dans le topsoil paraforestier. Une différence d'évolution de  $Na^+$  est également notée entre les topsoils ( $p < 0,001$ ), avec une baisse plus rapide mais moins forte dans le topsoil stocké de maquis paraforestier, alors que cette baisse est plus forte dans le topsoil stocké de maquis paraforestier. De même, il existe également une différence d'évolution de  $Mg^{2+}$  entre les deux topsoils ( $p < 0,001$ ) qui présente une baisse plus rapide et plus forte dans le topsoil stocké de maquis ligno-herbacé, que dans le topsoil stocké de maquis paraforestier.

#### AUTRES CORRELATIONS

Les évolutions des teneurs en bases échangeables sont toutes apparues corrélées à l'évolution de la CEC ( $Ca^{2+}$ ,  $\rho = 0,753$  ;  $Mg^{2+}$ ,  $\rho = 0,464$  ;  $Na^+$ ,  $\rho = 0,787$  ;  $K^+$ ,  $\rho = 0,778$  ;  $p \leq 0,0001$ ), aux teneurs en Corg ( $Ca^{2+}$ ,  $\rho = 0,766$  ;  $Mg^{2+}$ ,  $\rho = 0,351$  ;  $Na^+$ ,  $\rho = 0,793$  ;  $K^+$ ,  $\rho = 0,793$  ;  $p \leq 0,0001$  pour tous les éléments), et aux teneurs en azote ( $Ca^{2+}$ ,  $\rho = 0,762$  ;  $Mg^{2+}$ ,  $\rho = 0,357$  ;  $Na^+$ ,  $\rho = 0,753$  ;  $K^+$ ,  $\rho = 0,809$  ;  $p \leq 0,0001$ ).

**Tableau 1.** Evolution de la CEC, des bases échangeables, et du rapport Ca/Mg des topsoils, du maquis ligno-herbacé en fonction du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

		topsoil stocké de maquis ligno-herbacé					
		t0	t3	t6	t9	t12	t18
CEC meq%	0,2m	9,64 (±0,75)a	5,73 (±1,93)ab	3,86 (±0,93)b	3,65 (±0,94)b	3,9 (±0,57)b	4,14 (±0,35)b
	2m	9,64 (±0,75)a	4,04 (±1,31)b	4,2 (±0,32)b	4,82 (±0,08)b	4,39 (±0,25)b	4,54 (±0,45)b
	10m	9,64 (±0,75)a	6,46 (±1,78)ab	3,51 (±0,12)b	3,64 (±0,16)b	6,44 (±2,32)ab	3,97 (±0,64)b
Na+ meq%	0,2m	0,19 (±0,03)a	0,14 (±0,08)ab	0,07 (±0,02)b	0,06 (±0,02)b	0,07 (±0,02)b	0,05 (±0,03)b
	2m	0,19 (±0,03)a	0,13 (±0,04)ab	0,05 (±0,02)b	0,06 (±0)b	0,1 (±0,01)b	0,06 (±0,03)b
	10m	0,19 (±0,03)a	0,18 (±0,04)ab	0,04 (±0,01)b	0,04 (±0,01)b	0,11 (±0,05)ab	0,13 (±0,03)ab
K+ meq%	0,2m	0,11 (±0,02)a	0,09 (±0,04)ab	0,04 (±0,02)ab	0,03 (±0,01)b	0,05 (±0,01)ab	0,06 (±0,01)ab
	2m	0,11 (±0,02)a	0,06 (±0,03)ab	0,06 (±0,02)ab	0,04 (±0,01)b	0,06 (±0)ab	0,08 (±0,05)ab
	10m	0,11 (±0,02)a	0,14 (±0,04)ab	0,04 (±0,01)b	0,05 (±0)b	0,18 (±0,12)ab	0,1 (±0,02)ab
Ca2+ meq%	0,2m	0,98 (±0,18)a	0,8 (±0,28)ab	0,5 (±0,21)ab	0,29 (±0,15)b	0,59 (±0,15)ab	0,58 (±0,09)ab
	2m	0,98 (±0,18)a	0,45 (±0,3)ab	0,41 (±0,14)ab	0,3 (±0,05)b	0,62 (±0,04)ab	0,48 (±0,17)ab
	10m	0,98 (±0,18)a	0,52 (±0,06)ab	0,25 (±0,05)b	0,3 (±0,02)b	2,39 (±1,8)ab	0,39 (±0,14)ab
Mg2+ meq%	0,2m	1,79 (±0,34)a	1,3 (±0,19)a	1,33 (±0,71)a	1,44 (±0,52)a	2,77 (±0,4)a	2,08 (±0,41)a
	2m	1,79 (±0,34)a	0,85 (±0,38)a	1,88 (±0,48)a	2,98 (±0,37)a	2,97 (±0,73)a	3 (±0,52)a
	10m	1,79 (±0,34)a	2,11 (±0,65)a	1,66 (±0,03)a	1,45 (±0,23)a	2,53 (±0,55)a	3 (±0,6)a
Ca/Mg	0,2m	0,63 (±0,16)a	0,71 (±0,35)ab	0,4 (±0,11)ab	0,19 (±0,04)ab	0,21 (±0,03)ab	0,32 (±0,12)ab
	2m	0,63 (±0,16)a	0,64 (±0,42)ab	0,32 (±0,19)ab	0,1 (±0,01)b	0,23 (±0,04)ab	0,16 (±0,06)ab
	10m	0,63 (±0,16)a	0,3 (±0,15)ab	0,15 (±0,05)b	0,23 (±0,06)ab	0,75 (±0,45)ab	0,14 (±0,03)b

**Tableau 2.** Evolution de la CEC, des bases échangeables, et du rapport Ca/Mg des topsoils, du maquis paraforestier en fonction du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

		topsoil stocké de maquis paraforestier					
		t0	t3	t6	t9	t12	t18
CEC meq%	0,2m	12,72 (±1,47)a	10,46 (±0,36)a	7,51 (±0,49)b	6,17 (±0,66)b	8,55 (±0,55)ab	7,19 (±0,81)b
	2m	12,72 (±1,47)a	9,36 (±0,81)ab	7,5 (±0,79)b	5,98 (±0,64)b	8,32 (±0,63)ab	6,74 (±0,86)b
	10m	12,72 (±1,47)a	7,12 (±1,77)ab	9,51 (±1,11)ab	7,92 (±0,29)b	7,65 (±2,04)ab	8,76 (±0,89)ab
Na+ meq%	0,2m	0,27 (±0,06)a	0,12 (±0,09)ab	0,11 (±0,02)ab	0,07 (±0,01)b	0,13 (±0,04)ab	0,13 (±0,02)ab
	2m	0,27 (±0,06)a	0,18 (±0,02)ab	0,09 (±0,03)b	0,15 (±0,03)ab	0,23 (±0,07)ab	0,08 (±0,02)b
	10m	0,27 (±0,06)a	0,14 (±0,06)ab	0,17 (±0,04)ab	0,16 (±0,02)ab	0,18 (±0,06)ab	0,11 (±0,01)b
K+ meq%	0,2m	0,15 (±0,03)a	0,26 (±0,14)ab	0,31 (±0,07)ab	0,39 (±0,01)b	0,32 (±0,07)ab	0,4 (±0,1)b
	2m	0,15 (±0,03)a	0,28 (±0,04)ab	0,27 (±0,07)ab	0,38 (±0,07)ab	0,4 (±0,09)b	0,36 (±0,13)ab
	10m	0,15 (±0,03)a	0,28 (±0,14)ab	0,39 (±0,04)b	0,32 (±0,07)ab	0,3 (±0,12)ab	0,4 (±0,04)b
Ca2+ meq%	0,2m	1,86 (±0,22)a	4,51 (±2,33)b	3,77 (±1,11)ab	0,87 (±0,24)ab	3,66 (±0,65)b	3,92 (±1,17)ab
	2m	1,86 (±0,22)a	4,32 (±0,47)b	2,95 (±0,86)ab	3,81 (±0,43)b	4,8 (±0,79)b	3,73 (±1,02)ab
	10m	1,86 (±0,22)a	3,39 (±1,41)ab	5,14 (±2,01)b	2,66 (±0,67)ab	3,97 (±1,68)ab	5,61 (±1,02)b
Mg2+ meq%	0,2m	2,06 (±0,33)a	3,17 (±1,61)ab	2,72 (±0,63)ab	2,35 (±0,63)a	3,47 (±0,68)ab	2,61 (±0,73)ab
	2m	2,06 (±0,33)a	3,08 (±0,66)ab	2,71 (±0,75)ab	3,12 (±0,35)b	3,59 (±0,46)b	3,02 (±0,35)b
	10m	2,06 (±0,33)a	2,19 (±0,73)ab	3,89 (±0,4)b	3,36 (±0,19)b	3,22 (±0,2)b	3,79 (±0,4)b
Ca/Mg	0,2m	0,91 (±0,15)a	1,39 (±0,08)b	1,33 (±0,16)a	0,45 (±0,16)a	1,06 (±0,05)a	1,53 (±0,19)a
	2m	0,91 (±0,15)a	1,46 (±0,16)a	1,09 (±0,04)a	1,22 (±0,01)a	1,32 (±0,07)a	1,2 (±0,2)a
	10m	0,91 (±0,15)a	1,55 (±0,24)a	1,37 (±0,52)a	0,81 (±0,24)a	1,29 (±0,56)a	1,46 (±0,14)a

### III.2.5/ EVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS METALLIQUES

L'évolution des teneurs en éléments métalliques extractibles au DTPA pour chaque profondeur et temps de stockage, pour les deux topsoils est présentée dans les tableaux 3 et 4 pour les topsoils de maquis ligno-herbacé et paraforestier, respectivement.

#### EFFET DU TEMPS DE STOCKAGE DU TOPSOIL

Parmi les éléments métalliques, seuls le fer et le manganèse ont montré une évolution significative de leurs valeurs, corrélées au temps de stockage ( $\rho = -240$ ,  $p < 0,0001$ ; et  $\rho = -524$ ,  $p < 0,0001$ ). Les teneurs en ces éléments ont montré des baisses significatives de 60%, et 80%, après 18 mois de stockage au sein du topsoil de maquis ligno-herbacé. Au sein du topsoil paraforestier, après 18 mois de stockage, les teneurs en fer ont montré une baisse significative moyenne d'environ 50%, tandis que les teneurs en manganèse, bien que montrant une augmentation moyenne de 20%, ne sont pas apparues significatives.

L'évolution des teneurs en nickel n'a montré aucune différence significative au cours du temps. Cependant, les valeurs montrent une diminution de près de 62% au sein du topsoil ligno-herbacé et de près de 37% au sein du topsoil paraforestier.

Les teneurs en chrome ont montré une augmentation significative moyenne de près de 483% au sein du topsoil ligno-herbacé, mais n'ont pas montré d'évolution significative au sein du topsoil paraforestier.

Les teneurs en cobalt ont montré une baisse moyenne non significative de 50% environ, au sein du topsoil ligno-herbacé, et une augmentation significative moyenne de près de 272% au sein du topsoil paraforestier.

#### EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE DU TOPSOIL

Aucune corrélation entre les profondeurs de stockage et entre les différentes teneurs en éléments métalliques n'a été enregistrée.

#### EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL

Les évolutions des teneurs nickel, manganèse, chrome et cobalt sont apparues significativement différentes entre les deux topsoils ( $p < 0,001$  pour les quatre éléments). Nickel et cobalt ont tout les deux diminué au sein du topsoil ligno-herbacé, tandis qu'ils ont augmenté au sein du topsoil paraforestier. Le manganèse a diminué au sein du topsoil herbacé, tandis qu'il a augmenté au sein du topsoil paraforestier. A l'inverse, le chrome a augmenté au sein du topsoil herbacé, et diminué au sein du topsoil paraforestier. Enfin, bien que le fer montre une diminution significative au sein des deux topsoils, celle-ci est de 60% au sein du topsoil herbacé, et de 50% au sein du topsoil paraforestier.

**AUTRES CORRELATIONS**

Les évolutions des teneurs en bases échangeables sont toutes apparues corrélées à l'évolution de la CEC (Mn, rho= 0,794 ; Ni, rho= 0,752 ; Fe, rho= 0,535 ; Cr, rho= 0,809 ; Co, rho= 0,428 ;  $p \leq 0,0001$ ), aux teneurs en Corg (Mn, rho= 0,765 ; Ni, rho= 0,643 ; Fe, rho= 0,652 ; Cr, rho= 0,753 ; Co, rho= 0,276 ;  $p \leq 0,0001$  pour tous les éléments), et aux teneurs en azote (Mn, rho= 0,751 ; Ni, rho= 0,653 ; Fe, rho= 0,642 ; Cr, rho= 0,802 ; Co, rho= 0,256 ;  $p \leq 0,0001$  pour tous les éléments).

**Tableau 3.** Evolution des éléments métalliques extractibles au DTPA du topsoil maquis ligno-herbacé en fonction du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

		topsoil stocké de maquis ligno-herbacé					
		t0	t3	t6	t9	t12	t18
<b>Fer (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	116,69 (±15,60)a	146,48 (±9,63)a	84,4 (±12,79)ab	22,8 (±6,06)b	36,27 (±2,71)b	39,41 (±3,79)b
	<b>2m</b>	116,69 (±15,60)a	97,71 (±30,24)ab	67,98 (±22,47)ab	30,75 (±4,59)b	39,94 (±8,34)b	35,99 (±7,09)b
	<b>10m</b>	116,69 (±15,60)a	83,5 (±24,36)ab	55,49 (±14,75)ab	40,34 (±8,01)b	57,99 (±15,66)ab	28,91 (±5,37)b
<b>Nickel (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	51,46 (±17,10)a	6,92 (±1,56)b	11,34 (±6,26)ab	12,07 (±6,81)ab	21,2 (±8,61)ab	16,09 (±4,81)ab
	<b>2m</b>	51,46 (±17,10)a	5,47 (±2,35)b	8,91 (±1,49)b	21,55 (±5,21)ab	24,35 (±7,57)ab	27,24 (±12,29)ab
	<b>10m</b>	51,46 (±17,10)a	23,43 (±13,25)ab	7,74 (±2,67)b	9,19 (±1,00)b	32,79 (±17,58)ab	14,17 (±4,07)ab
<b>Manganèse (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	965,73 (±72,00) a	97,56 (±55,47)b	212,01 (±65,88)b	67,94 (±40,95)b	140,54 (±33,36)b	154,86 (±49,11)b
	<b>2m</b>	965,73 (±72,00)a	112,67 (±85,21)b	222,12 (±158,57)b	133,7 (±56,59)b	198,22 (±67,39)b	116,97 (±34,48)b
	<b>10m</b>	965,73 (±72,00)a	463,74 (±291,66)ab	52,67 (±23,96)b	205,74 (±68,23)b	375,07 (±199,04)b	52,41 (±13,87)c
<b>Chrome (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	0,48 (±0,10)a	4,82 (±1,78)b	3,09 (±0,33)b	2,75 (±0,36)b	3,02 (±0,39)b	3 (±0,3)b
	<b>2m</b>	0,48 (±0,10)a	3,13 (±0,41)b	2,78 (±0,66)b	2,91 (±0,42)b	2,95 (±0,24)b	3,68 (±0,74)b
	<b>10m</b>	0,48 (±0,10)a	3,07 (±1,46)b	2,46 (±0,96)b	4,4 (±0,72)b	1,85 (±0,81)ab	1,72 (±0,43)b
<b>Cobalt (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	116,42 (±23,80)a	13,8 (±7,01)b	61,22 (±18,54)ab	34,68 (±15,49)ab	76,69 (±5,57)a	71,38 (±7,83)a
	<b>2m</b>	116,42 (±23,80)a	10,61 (±3,62)b	68,88 (±27,96)ab	75,79 (±10,72)a	91,55 (±12,31)a	65,99 (±12,77)a
	<b>10m</b>	116,42 (±23,80)a	58,42 (±18,00)ab	45,98 (±11,68)ab	51,41 (±8,94)a	102,83 (±16,61)a	54,96 (±5,66)a

**Tableau 4.** Evolution des éléments métalliques extractibles au DTPA du topsoil maquis paraforestier en fonction du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

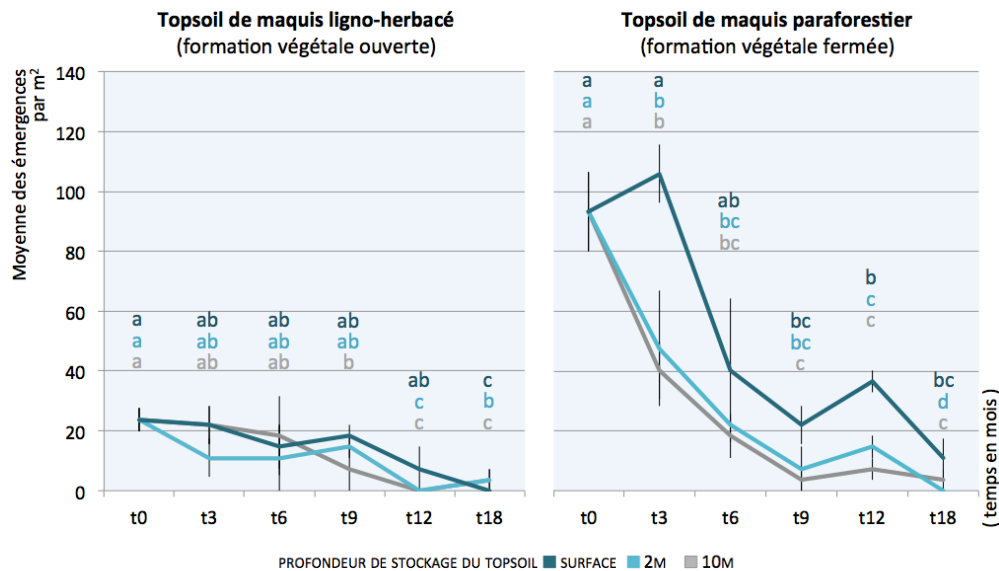
		topsoil stocké de maquis paraforestier					
		t0	t3	t6	t9	t12	t18
<b>Fer (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	142,31 (±26,88)a	70,26 (±1,64)b	80,68 (±13,08)bc	36,82 (±2,75)b	62,71 (±6,31)b	70,94 (±15,51)b
	<b>2m</b>	142,31 (±26,88)a	79,81 (±12,44)b	99,02 (±38,43)bc	74,27 (±7,56)b	77,8 (±16,93)b	52,44 (±12,23)b
	<b>10m</b>	142,31 (±26,88)a	49,03 (±9,11)b	93,44 (±0,26)ab	105,88 (±8,00)c	65,52 (±14,33)b	70,09 (±5,19)b
<b>Nickel (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	30,12 (±16,04)a	71,61 (±4,85)b	39,95 (±9,67)a	32,1 (±10,71)a	57,15 (±8,20)a	41,38 (±14,05)a
	<b>2m</b>	30,12 (±16,04)a	38,93 (±10,74)a	43,42 (±11,88)a	42,12 (±2,76)a	52,53 (±8,17)a	37,59 (±4,97)a
	<b>10m</b>	30,12 (±16,04)a	38,61 (±16,34)a	80,37 (±24,37)a	41,57 (±1,65)a	42,71 (±10,11)a	46,65 (±2,48)a
<b>Manganèse (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	419,44 (±124,43)a	684,4 (±23,23)a	427,21 (±145,56)ab	195,93 (±38,52)b	568,26 (±111,78)a	571,87 (±55,16)a
	<b>2m</b>	419,44 (±124,43)a	625,74 (±16,11)a	482,47 (±178,68)ab	442,91 (±44,67)ab	510,59 (±15,98)a	429,27 (±109,43)ab
	<b>10m</b>	419,44 (±124,43)a	412,7 (±176,75)ab	694,38 (±104,99)a	436,72 (±24,44)ab	540,25 (±204,60)ab	520,3 (±90,13)a
<b>Chrome (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	0,46 (±0,13)a	0,38 (±0,06)a	0,79 (±0,19)a	0,65 (±0,05)a	0,33 (±0,17)a	0,38 (±0,09)a
	<b>2m</b>	0,46 (±0,13)a	0,56 (±0,11)a	0,79 (±0,18)a	0,42 (±0,08)a	0,37 (±0,05)a	0,36 (±0,03)a
	<b>10m</b>	0,46 (±0,13)a	0,51 (±0,13)a	0,55 (±0,04)aa	0,41 (±0,03)a	0,51 (±0,28)a	0,47 (±0,11)a
<b>Cobalt (mg/kg)</b>	<b>0,2m</b>	37,56 (±23,73)a	133,97 (±7,81)b	101,42 (±7,62)c	68,65 (±25,54)a	114,34 (±12,75)bc	101,85 (±10,45)bc
	<b>2m</b>	37,56 (±23,73)a	106,99 (±15,03)bc	109,11 (±11,48)c	76,65 (±12,74)a	113,32 (±17,31)bc	108,99 (±4,13)bc
	<b>10m</b>	37,56 (±23,73)a	71,28 (±22,85)a	149,39 (±38,78)b	54,06 (±6,87)a	101,74 (±8,42)bc	108,5 (±2,52)bc



### III.3/ EFFET DU STOCKAGE DES TOPSOILS SUR L'EVOLUTION DE L'ABONDANCE, DE LA RICHESSE SPECIFIQUE ET DE LA COMPOSITION DE LA BANQUE DE GRAINES

#### III.3.1/ EVOLUTION DES DENSITES DE GERMINATION DES GRAINES

L'évolution des densités de germinations de la banque de graines pendant le stockage est présentée figure 20.



**Figure 20.** Evolution des densités de germinations de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

#### EFFET DU TEMPS

L'évolution des densités de germination de la banque de graines des topsoils est apparue significativement corrélée avec l'augmentation du temps de stockage des topsoils ( $\rho = -0,454$ ,  $p < 0,001$ ). Globalement, on observe une diminution progressive et significative de la densité des germinations en fonction du temps, pour chaque profondeur, au sein des deux topsoils par rapport au t0 ( $p < 0,001$ ). Après 12 mois de stockage, plus aucune germination n'est relevée à la profondeur 10m au sein du topsoil de maquis ligno-herbacé, et une baisse de 69% des taux de germinations par rapport au t0 est enregistrée en surface. Au sein du topsoil de maquis paraforestier ces baisses sont de 92%, 84% et 61% respectivement aux profondeurs 10m, 2m et en surface.

**EFFET PROFONDEUR**

L'évolution des densités de germination de la banque de graines est significativement corrélée à la profondeur de stockage ( $\rho = -0,338$ ,  $p = 0,001$ ). Sur la figure 20, on observe une meilleure conservation des densités de germination pendant stockage en surface des tas de topsoils et qui diminuent en profondeur. Ceci est particulièrement bien visible au sein de la verse de topsoil à maquis paraforestier où les courbes de profondeur se différencient sensiblement, les densités de germinations diminuant plus rapidement en profondeur qu'en surface. Toutefois, les différences de densités de germinations entre profondeur n'apparaissent qu'après 12 mois de stockage au sein du topsoil ligno-herbacé. Au sein du topsoil paraforestier une différence est visible en surface après 3 mois de stockage, où les densités de germinations se maintiennent proche des valeurs du  $t_0$ , par rapport aux profondeurs 2 et 10m, puis s'estompent jusqu'à 12 mois, où une différence apparaît de nouveau entre les densités de germinations observées en surface et celles observées aux autres profondeurs.

**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

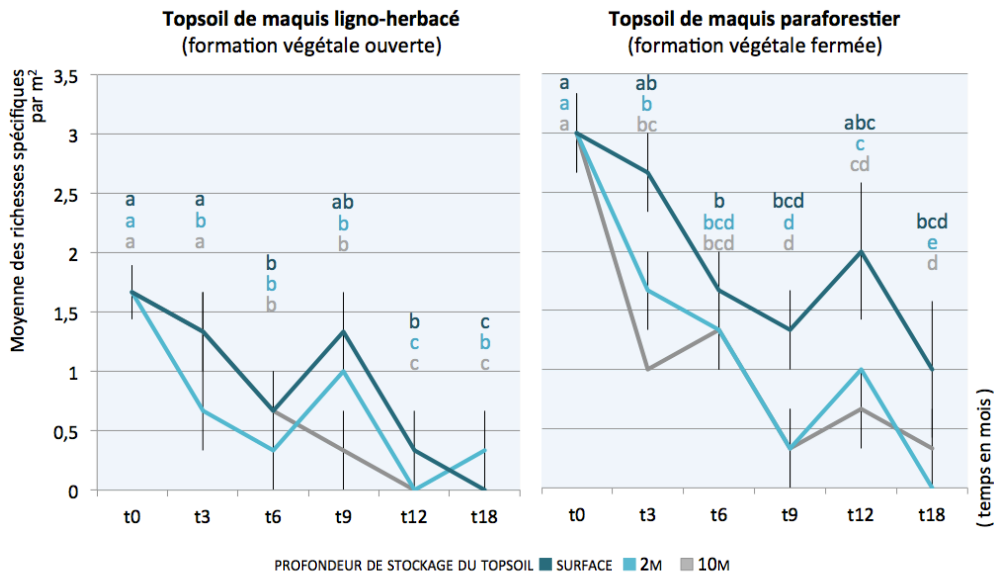
L'analyse de variances par permutation a mis en évidence une évolution différente des densités de germination de la banque de graines selon le topsoil étudié ( $p = 0,01$ ) (Fig.20). Le topsoil de maquis ligno-herbacé montre une dégradation lente et progressive de son potentiel germinatif. La dégradation du potentiel germinatif du topsoil paraforestier stocké est plus rapide. Au sein du topsoil ligno-herbacé, aucune baisse significative des densités de germinations n'est enregistrée avant 9 mois de stockage, alors que des baisses significatives par rapport au  $t_0$  sont observées dès 3 mois dans le topsoil paraforestier. De même, sur la première année d'étude, les diminutions moyennes des densités de germinations observées pour chaque temps de suivi montre une dégradation près de deux fois plus lente au sein du topsoil ligno-herbacé. Finalement après 18 mois, ces écarts s'estompent, et les pertes enregistrées sont de l'ordre de 90% au sein du topsoil ligno-herbacé et de près de 95% pour le topsoil paraforestier.

**AUTRES CORRELATIONS**

L'évolution des densités de germinations est aussi apparue significativement corrélée à l'évolution de la richesse spécifique de la banque de graines ( $\rho = 0,827$ ,  $p < 0,0001$ ), à l'évolution du PEM ( $\rho = 0,445$ ,  $p < 0,0001$ ), des densités bactériennes ( $\rho = 0,458$ ,  $p < 0,0001$ ) et au MinC ( $\rho = 0,370$ ,  $p < 0,0001$ ), et des masses volumiques ( $\rho = -0,258$ ,  $p < 0,0001$ ).

### III.3.2/ EVOLUTION DE LA RICHESSE SPECIFIQUE

L'évolution de la richesse spécifique des banques de graines des topsoils pendant stockage est présentée figure 21.



**Figure 21.** Evolution des richesses spécifiques de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. Deux valeurs présentant une lettre commune ne diffèrent pas statistiquement au seuil de 0,05.

#### EFFET DU TEMPS

L'évolution de la richesse spécifique de la banque de graines des deux topsoils fluctue sur l'ensemble de la période d'étude. Malgré la présence de « pics » signalant une augmentation ponctuelle du nombre d'espèces identifiées ces fluctuations n'apparaissent jamais significatives par rapport au temps de prélèvement qui précède ces pics, et globalement est observée une diminution progressive de la richesse spécifique de la banque de graines pendant le stockage des topsoils. Comme pour les densités de germinations, l'évolution de la richesse spécifique est significativement corrélée à l'augmentation du temps de stockage du topsoil ( $\rho = -0,480, p < 0,0001$ ). Après 12 mois de stockage, 100% de la richesse spécifique est perdue aux profondeurs 2 et 10m et 80% en surface (cela ne représente plus qu'une espèce) pour le topsoil stocké de maquis ligno-herbacé. Au sein du topsoil stocké de maquis paraforestier 77% et 66% ont été perdus aux profondeurs 2 et 10m et 33% en surface (seules 2 espèces sont encore présentes). Finalement, après 18 mois, les valeurs de richesse spécifique des deux topsoils tendent vers 0.

**EFFET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE**

La diminution de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils stockés est également significativement corrélée à la profondeur de stockage, diminuant lorsque la profondeur de stockage augmente ( $\rho = -0,362$ ,  $p = 0,001$ ). Comme pour la densité de germination, on observe sur la figure 21, une meilleure conservation de la richesse spécifique de la banque de graines en surface. A nouveau, cette observation est d'avantage visible au sein du topsoil de maquis paraforestier où les courbes de profondeur se distinguent nettement. Toutefois, comme pour les densités de germination, les différences observées entre les profondeurs pour un même temps d'étude n'apparaissent pratiquement jamais significatives entre elles.

**EFFET DE L'ORIGINE DU TOPSOIL**

La diminution de la richesse spécifique identifiée dans cette étude, diffère significativement selon le topsoil étudié ( $p = 0,001$ ). Au sein de la verse de topsoil de maquis ligno-herbacé, le nombre d'espèce diminue plus lentement que pour le topsoil paraforestier. Toutefois, après 18 mois de stockage, on observe une meilleure conservation de la richesse spécifique de la banque de graines au sein du topsoil paraforestier.

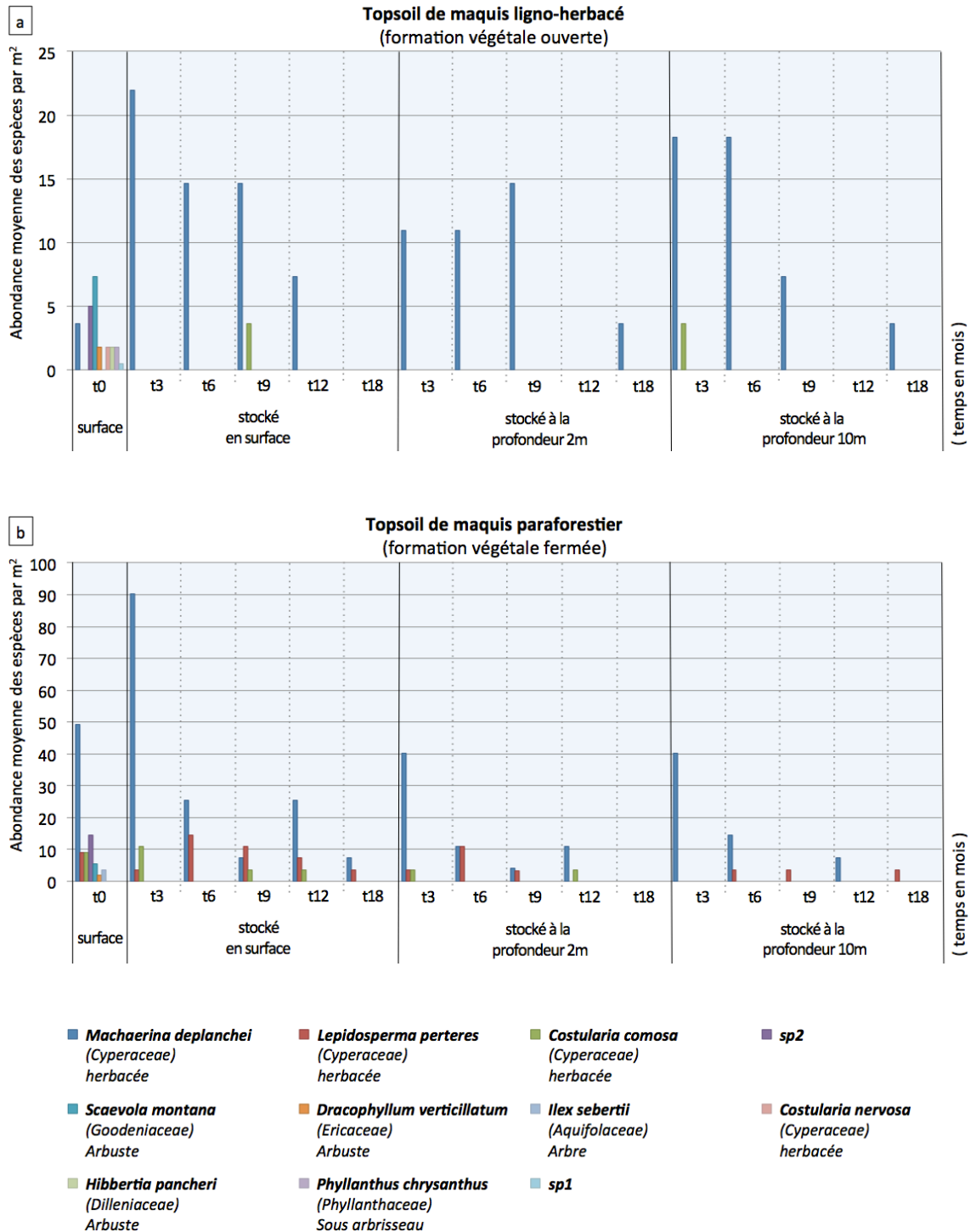
**AUTRES CORRELATIONS**

L'évolution de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils pendant stockage est aussi apparue significativement corrélée à l'évolution du PEM ( $\rho = 0,511$ ,  $p < 0,0001$ ), des densités bactériennes ( $\rho = 0,510$ ,  $p < 0,0001$ ) et au MinC ( $\rho = 0,447$ ,  $p < 0,0001$ ), et des masses volumiques ( $\rho = -0,295$ ,  $p < 0,0001$ ), et au Corg ( $\rho = 0,445$ ,  $p < 0,0001$ ).

**III.3.3/ EVOLUTION DE LA COMPOSITION DE LA BANQUE DE GRAINES**

L'évolution de la composition de la banque de graines est présentée figure 22. Au total, 7 espèces ont été identifiées dans la banque de graines du topsoil de maquis ligno-herbacé et du topsoil de maquis paraforestier en début de stockage. Au t0, les banques de graines sont dominées par *Scaevola montana* (arbuste) pour le topsoil de maquis ligno-herbacé et par *Machaerina deplanchei* (herbacée) pour le topsoil de maquis paraforestier. Le stockage du topsoil révèle, pour les deux topsoils, un impact significatif sur la composition de la banque de graines par rapport au topsoil à t0 ( $p < 0,001$ ). Pour les deux topsoils testés, seules des espèces de la famille des Cypéracées persistent pendant le stockage, largement représentées par l'espèce *Machaerina deplanchei*, à l'exception de quelques individus de *Costularia comosa* enregistrés après 9 mois de stockage, cette espèce est la seule qui persiste dans la banque de graines du topsoil de maquis ligno-herbacé. A cette espèce se

rajoutent *Lepidosperma perteres* et *Costularia comosa*, pendant le stockage du topsoil de maquis paraforestier. Il est à noter que si *Lepidosperma perteres* persiste au sein de ce topsoil, en surface jusqu'à 18 mois, cette espèce disparaît après 6 mois à la profondeur de 2m et après 9 mois à la profondeur de 10m. Dès 3 mois, toutes les espèces ligneuses (sous arbrisseau, arbuste, arbre) ont disparu de la banque de graines des deux topsoils.



**Figure 22.** Composition de la banque de graines des topsoils, en fonction de leur origine (maquis ligno-herbacé ou maquis paraforestier), du temps et de la profondeur de stockage. **a** topsoil de maquis ligno-herbacé, et **b** topsoil de maquis paraforestier.

## IV/ DISCUSSION

### IV.1/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL MICROBIEN

Durant les premiers mois de stockage, les mesures de densités bactériennes et d'activité de minéralisation du carbone ont montré une première phase de maintien, voire dans certains cas, de stimulation du nombre et de l'activité bactérienne initiale. Au-delà, se produit une phase de dégradation. Cette période de maintien des valeurs de ces paramètres concerne les 3 premiers mois de stockage pour le topsoil de maquis ligno-herbacé, et les 6 premiers mois pour le topsoil de maquis paraforestier. Après 18 mois, les dégradations des densités bactériennes sont de 93% et 85%, et celles du potentiel de minéralisation du carbone sont de 80% et 58% pour les stocks de topsoils de maquis ligno-herbacé et de maquis paraforestier respectivement.

Le maintien dans le temps des densités bactériennes et des activités de minéralisation du carbone semble être déterminé par la présence de matière organique avec laquelle ces paramètres sont corrélés. En effet, la dégradation des deux indicateurs microbiens dans le temps correspond à une baisse simultanée des taux de carbones organiques au sein des stocks de topsoils de l'ordre de 61% pour le topsoil de maquis ligno-herbacé et de 56% pour le topsoil de maquis paraforestier. Nos observations rejoignent celle de nombreux auteurs qui ont décrit ces deux mêmes phases d'évolution des densités et activités bactériennes pendant le stockage des topsoils, en les corrélant également à l'évolution des stocks de matière organique (Johnson et al. 1991 ; Stahl et al. 2002 ; Ghose, 2012). Cela peut s'expliquer par l'absence de renouvellement de la matière organique dans les stocks de topsoils, due notamment à l'absence de litière (aérienne et souterraine), et de rhizodéposition, qui constituent le principal substrat nutritif de la microflore hétérotrophe en milieu naturel (Gobat et al. 2010). Durant les premiers mois de stockage, les micro-organismes utilisent la matière organique présente dans le topsoil lors du décapage et de leur mise en stock, pour satisfaire les besoins énergétiques nécessaires à leurs maintiens (Meyer et al. 1996 ; Parry et al. 2000). En absence de renouvellement, la matière organique apparaît alors comme un facteur limitant ; sa diminution affecte fortement la survie des bactéries et plus globalement l'activité microbienne au sein des stocks de topsoils (Nielsen & Winding, 2002).

Outre le caractère trophique limitant des stocks de topsoils pour la microflore, plusieurs auteurs ont également fait l'hypothèse que la diminution du potentiel microbien pourrait être aggravée par le renforcement des conditions d'anoxie due principalement aux phénomènes de compaction qui se mettent en place au sein des stocks de topsoils, mais aussi du fait de l'accumulation de CO<sub>2</sub> et de la baisse de concentration en O<sub>2</sub> consécutives à

l'activité respiratoire des micro-organismes aérobies qui tentent de survivre (Sierra & Renault, 1996 ; Gobat et al. 2012). Ces conditions d'anoxie limiteraient alors la capacité de maintien des densités et activités bactériennes et diminueraient progressivement leur capacité à oxyder la matière organique, tout en favorisant le développement des populations anaérobies et la mise en place de forme de résistance (Johnson et al. 1991 ; Aon et al. 2001; McGill, 2007). Nos résultats tendent à confirmer ces deux dernières observations. En effet, après un an de stockage, l'analyse méta-génétique a montré qu'aucune perte de richesse spécifique en OTUs bactériens n'est enregistrée, quelle que soit la profondeur de stockage observée, indiquant que les populations bactériennes ont pu effectivement survivre, même à faible densité, au sein de microsites favorables. Ainsi, si la microflore est affectée sur le plan quantitatif, elle subit peu de changements purement qualitatifs. Nos résultats montrent cependant une évolution de la structure des communautés microbiennes au sein des stocks de topsoils qui diffèrent des communautés observées en milieu naturel, notamment par un changement dans le rapport des ordres dominants. Il est toutefois apparu difficile de rassembler des informations pertinentes sur le métabolisme des nouveaux taxons dominants qui nous auraient permis de confirmer la dominance d'organismes anaérobies. En effet, à l'échelle des taxons étudiés (classes, ou même ordres), le type respiratoire est une caractéristique variable au sein de chaque taxon (Bergey's Manual, 2012). Néanmoins, nos résultats montrent que d'importants phénomènes de compaction se sont mis en place au sein des stocks de topsoils. Des augmentations moyennes des masses volumiques de 39% et 26% ont été mesurées respectivement, pour les topsoils de maquis ligno-herbacé et paraforestier. Ces phénomènes de compaction tendent à indiquer une réduction du volume des pores des topsoils, et consécutivement la mise en place de conditions anoxiques qui peuvent entraver les échanges gazeux (Foster, 1988). Nous faisons alors l'hypothèse, comme le montre Johnson et al. (1991) sur milieux de culture, que les changements qualitatifs microbiens observés dans la structure des communautés bactériennes en fonction du temps de stockage pourraient être dus à une augmentation des bactéries anaérobies. Toutefois, nos résultats tendent à montrer que l'évolution de la structure des communautés bactériennes au sein des stocks de topsoils, est corrélée à une évolution des valeurs de pH et de Carbone organique. Ceci est cohérent avec les observations citées plus haut, qui décrivent la présence de matière organique comme facteur limitant au maintien des densités de bactéries cultivables. Il est alors possible que les changements dans les taxons bactériens peuvent aussi être dus aux phénomènes de compétition, suite à la réduction des substrats carbonés métabolisables. De même, la covariation significative entre le pH et la diversité bactérienne peut refléter une évolution dans la disponibilité des substrats organiques simples dans les sols pour lesquels les bactéries sont plus compétitifs (Boer et al. 2005).

La mesure du Potentiel EndoMycorhizogène a également montré une chute au cours du temps. Les deux stocks de topsoils présentent cependant des profils d'évolution différents de ce paramètre, rendant difficile l'interprétation des résultats. Après 3 mois de stockage, le PEM du topsoil de maquis ligno-herbacé a atteint un seuil de valeurs minimales, avec une perte enregistrée de 76%. A l'inverse la dégradation du PEM au sein du topsoil de maquis paraforestier est plus progressive et se prolonge sur 12 mois avant d'atteindre un seuil de valeurs minimales, présentant une dégradation de 92%. Il est possible que les volumes décapés pour le topsoil provenant du maquis ligno-herbacé soient plus importants que prévus et aient alors pu causer une dilution du nombre de spores, expliquant ces résultats. Néanmoins, nos observations rejoignent celles menées par le projet BIOTOP dans le sud de la Nouvelle-Calédonie (Amir et al. 2014) qui rapportent des résultats équivalents sur des topsoils de maquis ligno-herbacé et paraforestier stockés en andain ou étalé, sur des sites miniers du sud du territoire. Nos résultats sont également similaires à ceux rapportés par Abdul-Kareem &McRae (1984), Johnson et al. (1991), dans des études mettant en œuvre les mêmes outils sur différents sols de mines du Royaume-Uni.

Enfin, comme pour les bactéries, l'observation des structures des communautés fongiques, après un an de stockage, a montré qu'il n'y a aucune baisse de la richesse spécifique mais à nouveau une évolution dans le rapport des taxons dominants. Ce résultat tendrait à indiquer que les espèces fongiques peuvent, elles aussi survivre au stockage des topsoils, dans des formes de résistance. Comme pour les bactéries, l'évolution de la structure des communautés fongiques a elle aussi été corrélée à l'évolution des teneurs en pH, mais aussi de l'évolution du potentiel de minéralisation du carbone et des teneurs en base échangeables  $K^+$ . Ces résultats sont cohérents avec de précédentes observations qui ont rapporté que les biomasses fongiques peuvent varier avec le pH des sols, et ainsi expliquer des covariations significatives entre la structure des communautés des champignons et le pH du sol (Zinger et al. 2011). De même, les covariations des structures de communautés de champignons avec le potentiel de minéralisation du carbone et les teneurs en base échangeables  $K^+$ , pourrait être due à une réponse des champignons de types saprophytiques, qui ici aussi, pourrait résulter de phénomènes de compétition, suite à la réduction des substrats carbonés métabolisables des stocks de topsoil (Romani et al. 2006)

Concernant la profondeur, aucun effet n'a pu être mis en évidence sur l'évolution des densités bactériennes et d'activité de minéralisation du carbone. A l'inverse, le PEM semble montrer une meilleure conservation en surface qu'en profondeur. Ces résultats apparaissent cohérents avec ceux de Wakelin, et al. (2008), qui ont montré que les spores AMF, aérobies strictes, étaient plus sensibles aux conditions d'anoxie, que ne le sont les bactéries. En effet, comme le rapporte Amir et al. (2014), la diminution des populations bactériennes aérobies



en profondeur, peut, elle, être compensée par le développement de populations anaérobies, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet observé ici. A nouveau, nos résultats apparaissent similaires à ceux rapportés par Amir et al. (2014), Johnson et al. (1991), Abdul-Kareem & McRae (1984).

L'analyse méta-génétique des communautés microbiennes après un an de stockage n'a montré aucun effet profondeur en termes de structures d'OTUs, même si nous constatons de légères différences dans la structure des groupes. Les populations bactériennes, comme les populations fongiques, évoluent de façons similaires aux trois profondeurs étudiées. Ces résultats vont à l'encontre de plusieurs observations qui rapportent une influence de la profondeur sur la structure des communautés microbiennes (Fierrer et al. 2003 ; Hansel et al. 2008 ; Vian et al. 2009). Ces auteurs et d'autres, attribuent ces changements aux modifications des caractéristiques physico-chimiques qui se produisent aux différentes profondeurs soit à une diminution des conditions aérobies, soit à une baisse de la disponibilité en eau et en éléments nutritifs (Cookson et al. 2008; Hansel et al. 2008). Pourtant, et bien que nos résultats montrent une augmentation des phénomènes de compaction de la surface vers les zones profondes, et donc des conditions d'anoxie au sein de nos deux stocks de topsoils, cela n'a entraîné aucune différence sur l'évolution des communautés microbiennes. A l'inverse, comme nous l'avons décrit précédemment, la matière organique, fortement corrélée à l'activité bactérienne, n'a pas présenté d'évolutions distinctes selon les profondeurs de stockage testées. Il peut alors apparaître que l'absence d'effet profondeur sur l'évolution de la structure des communautés microbiennes pourrait être expliquée par une disparition similaire des ressources nutritives aux trois profondeurs testées. Cela pourrait également être dû, comme nous l'avons décrit plus haut à des phénomènes anaérobies, qui au-delà d'un certain seuil de compaction, pourrait sans doute impacter les communautés microbiennes de façon uniforme quelle que soit la profondeur.

#### **IV.2/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL DE FERTILITE PHYSICO-CHIMIQUE**

Les modifications physiques, chimiques et biologiques qui peuvent se produire au sein des topsoils durant le stockage sont connues pour entraîner une dégradation de la fertilité physico-chimique globale. Les variations d'activités biologiques qui se produisent au sein des stocks de topsoils, tout comme les événements climatiques auxquels sont soumis les tas de topsoils stockés en plein air, peuvent induire des variations physico-chimiques (Gessol, 2008 ; Gobat et al. 2010 ; Amir et al. 2014). De nombreux auteurs ont rapporté que des modifications des propriétés physico-chimiques pouvaient entraîner une diminution de la fertilité minérale des stocks de topsoil, due à la disparition de la matière organique ou au lessivage des éléments minéraux (Weng et al. 2004, Zeng et al. 2011). D'autres auteurs ont

rapporté que la mobilité des éléments métalliques pouvait s'accroître au cours du stockage et provoquer des phénomènes de phytotoxicité (Acosta et al. 2011 ; Rocha et al. 2011 ; Zhao et al. 2013 ;). De tels changements, s'ils se produisent, peuvent alors rendre difficile l'installation d'un couvert végétal et compliquer les travaux de restauration.

A l'échelle de notre étude, nos résultats ont montré une diminution importante des taux de matière organique au cours du temps, et de façon homogène pour les différentes profondeurs observées. Ces diminutions des taux de matières organiques sont significativement corrélées à des baisses des taux d'azote et de la capacité d'échange cationique. Comme décrit précédemment, la diminution de la matière organique peut être expliquée par sa dégradation par les micro-organismes qui tentent de survivre au sein des stocks de topsoil. Celle-ci est minéralisée via des processus divers. Ainsi, les composés azotés sont minéralisés par ammonification, avec production d'azote minéral, de CO<sub>2</sub> et d'eau (Gobat et al. 2010). Celle-ci est suivie par la nitrification (oxydation de l'ammoniac, et de l'ammonium en nitrites puis nitrates). Une partie de l'azote peut se volatiliser sous la forme NH<sub>3</sub> ou par dénitrification sous la forme N<sub>2</sub>, aboutissant comme observé, à une perte d'azote et de CEC. En raison de la corrélation forte avec l'activité bactérienne observée, l'absence d'effet profondeur sur la dégradation du potentiel de fertilité minérale des topsoils peut être expliquée par une compensation de la réduction de l'activité microbienne aérobie, par une activité anaérobie en profondeur (Amir et al. 2014). Enfin, il est possible comme le rapportent différents auteurs (Stahl et al. 2002 ; Sourkova et al. 2005 ; Walker, 2005), que l'appauvrissement en matière organique et éléments nutritifs des stocks de topsoils observé ici, puisse compliquer l'installation d'un couvert végétal, lorsque le topsoil sera réutilisé pour les travaux de restauration

A l'inverse, bien que le suivi des éléments métalliques des stocks de topsoils ait montré certaines évolutions significatives au cours du temps (augmentation du chrome et cobalt notamment), les valeurs extrêmes atteintes observées par ces éléments, ne dépassent pas les extrêmes rapportés par Amir & Pineau (2003) qui comparaient alors différents sols ultramafiques du territoire. Nos résultats confirment ainsi ceux du projet BIOTOP (Amir et al. 2014), qui ont montré également que bien que des variations des teneurs en éléments métalliques puissent se produire pendant le stockage des topsoils néo-calédoniens, ceux-ci ne sont pas suffisants pour engendrer des problèmes de phytotoxicité, du moins pour des périodes ne dépassant pas 18 mois dans notre cas, 36 mois dans le cas du projet BIOTOP.

#### **IV.3/ INFLUENCE DU TEMPS ET DE LA PROFONDEUR DE STOCKAGE SUR L'EVOLUTION DU POTENTIEL GERMINATIF DE LA BANQUE DE GRAINES**

Le suivi du potentiel germinatif des stocks de topsoil a révélé un effet dépressif du temps de stockage sur la conservation des densités de germinations et de la richesse spécifique de la banque de graines. Globalement, 40% et 70% des densités de germinations sont perdues les 6 premiers mois et finalement 90% et 84% après 18 mois pour les stocks de topsoils de maquis ligno-herbacé et paraforestier respectivement. Sur les 8 espèces ayant germé dans les topsoils in situ, seules ont persisté trois espèces de Cypéracées. Il s'agit de *Machaerina deplanchei*, *Lepidosperma perteres* et *Costularia comosa*, qui sont des herbacées.

Différents facteurs peuvent expliquer la dégradation du potentiel germinatif au cours du stockage des topsoils : i) De nombreux auteurs ont attribué la persistance des graines pendant le stockage des topsoils à la présence de mécanismes de dormance (Owens et al. 1995 ; Tozer et al. 2012). La disparition des espèces ligneuses en cours du stockage pourrait ainsi être due à l'absence de mécanisme de dormance. Pourtant, certains travaux indiquent l'existence de mécanismes de dormances physiques, morphologiques ou physiologiques chez les espèces ligneuses *Hibbertia pancheri*, et *Scaevola montana* (L'Huillier et al. 2010). A l'inverse, les semences de l'espèce *Costularia comosa* (herbacée), pourtant caractérisées comme non dormantes parviennent à se maintenir durant stockage (L'Huillier et al. 2010). Il apparaît ainsi que le maintien des différences observées dans cette étude pourrait être attribué à d'autres mécanismes que la dormance. ii) Une autre cause possible pourrait être le phénomène dilution lors du décapage des topsoils, conjugué aux cycles de vie et à l'abondance de semences produites par les différentes espèces végétales. Les travaux de Goxe (2010, non publié) ont rapporté que la banque de graines des topsoils des maquis ultramaïques néo-calédoniens tendrait à se concentrer dans les 5 premiers centimètres du sol. Or, classiquement, le topsoil est récupéré sur une épaisseur de 0,3m, ce qui diminue d'emblée, par simple dilution, le potentiel séminal et de germination des topsoils. La plus grande présence dans la banque de graines des topsoils stockés des espèces d'herbacées Cypéracéennes pourrait alors être expliquée par leurs stratégies de reproduction, avec un cycle de vie court et la production de grandes quantités de graines qui tendrait à les rendre plus présentes au sein de notre échantillonnage des stocks de topsoils (Chen et al. 2013). En revanche, les espèces ligneuses produisant des semences en moins grand nombre, il est possible que celles-ci échappent plus souvent à l'échantillonnage. iii) A cela s'ajoute la possible destruction des semences de la banque de graines, par les phénomènes de vieillissement et par les conditions de compaction et d'anoxie qui se mettent en place au sein des versos. Fenner & Thompson (2005), ou Wagner & Mitshunas, (2008) ont décrit que la diminution de la concentration en oxygène, avec les phénomènes de

compaction et de respiration, accélère le métabolisme fermentaire et la décomposition des graines ou la dégradation des réserves embryonnaires des graines qui perdent alors leur capacité de germination. De tels phénomènes de compaction et d'anoxie ont été mis en évidence dans nos stocks de topsoil. La disparition des espèces ligneuses, tout comme la baisse du potentiel de germination des topsoils pendant le stockage pourraient alors également être dues aux vieillissements et à la dégradation progressive des semences. iv) Meney et al. (1994) et Ryckeboer et al. (2002) ont également rapporté que la dégradation du potentiel germinatif de la banque de graines des topsoils pendant le stockage pouvait être provoquée par des phénomènes de prédation ou d'attaques par des agents pathogènes tels que bactéries et champignons. Finalement, il apparaît probable que l'évolution du potentiel germinatif de la banque de graines des topsoils pendant stockage soit l'effet d'une combinaison de ces différents facteurs.

L'évolution des densités de germinations et de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils pendant stockage est également apparue corrélée à la profondeur de stockage. Une tendance à la meilleure conservation du potentiel germinatif en surface, par rapport aux zones les plus profondes des tas de topsoil a pu être mise en évidence.

Plusieurs auteurs ont rapporté que la longévité des graines diminuait en profondeur, avec l'augmentation des conditions de chaleur et d'humidité, ou que de telles conditions pouvaient mener à une perte de dormance et à la germination de graines à des profondeurs non favorables à la survie des plantules (Park et al. 2011; Pakeman et al. 2012; Golos & Dixon, 2014). Nos résultats n'ont cependant pas révélé de plus fortes teneurs en humidité en profondeurs des stocks de topsoils, probablement du fait de l'induration en surface, induisant une faible pénétration de l'eau, mais ont bien révélé des phénomènes de compaction plus importants. Park et al. (2010), Riveraa et al. (2012), Golos & Dixon (2014) ont décrit qu'une augmentation plus forte de température pouvait se produire en profondeur des stocks de topsoils en raison à la fois des phénomènes de compaction plus importants qui s'y produisent et de la décomposition fermentaire de la matière organique ainsi induite. La tendance à une meilleure conservation du potentiel germinatif de la banque de graines en surface plutôt qu'en profondeur dans cette étude, pourrait donc être due en particulier aux variations de température au sein des stocks de topsoils.

Les résultats de l'évolution des densités de germination et d'évolution de la richesse spécifique montrent d'avantage de pertes que les résultats rapportés par le projet BIOTOP sur des massifs miniers du sud du territoire (L'Huillier & Fogliani, 2014). Dans leurs études sur l'évolution de la banque de graines de topsoils ligno-herbacé et paraforestier stockés en andain, ces auteurs ont montré une meilleure conservation des densités de germinations et

de la richesse spécifique. Pour une durée d'étude de 18 mois, comparable à la nôtre, leurs résultats montrent encore des densités de germinations proches de 20 graines.m<sup>-2</sup> et ceci pour 5 espèces. De plus, leurs résultats ne rapportent pas d'effets profondeur sur l'évolution du potentiel germinatif. En comparaison, notre étude montre après 18 mois de stockage, que seule une densité de germination de 10 graine.m<sup>-2</sup> subsistent en surface du topsoil paraforestier, équivalent à une seule espèce. Le potentiel germinatif pour l'ensemble des autres profondeurs de topsoil paraforestier, de même que pour le topsoil ligno herbacé, tend à avoir disparu.

#### **IV.4/ INFLUENCE DU COUVERT VEGETAL ASSOCIE AU TOPSOIL SUR L'EVOLUTION DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES**

La comparaison de deux topsoils d'origines différentes nous a permis de mettre en évidence un effet origine significatif sur l'évolution des potentialités biologiques des topsoils au cours du stockage. D'une manière générale, le topsoil stocké issu du maquis paraforestier a montré au cours du temps, une dégradation plus lente et une meilleure conservation de son potentiel de restauration, quel que soit le paramètre biologique considéré. Ces différences d'évolution entre les deux topsoils peuvent être dues aux valeurs initiales plus élevées des différents paramètres suivis, dans le topsoil de maquis paraforestier. D'autre part, cela pourrait être dû aux phénomènes de compaction qui touchent différemment les deux versés de topsoils en raison de teneurs en matière organique différentes. Vian (2009), Gobat et al. (2010), Ghose (2012) ont rapporté que la matière organique contribue à améliorer la stabilité structurale des stocks de topsoils et à limiter les phénomènes de compaction et d'anoxie. Ces phénomènes de compaction ayant variés de 33% à 45% de la surface vers la profondeur au sein du tas de topsoil de maquis ligno-herbacé alors qu'ils n'ont été que de 21% à 33% pour le tas de topsoil de maquis paraforestier. De même, la matière organique, et, d'une façon plus générale, le complexe argilo-humique sont connus pour avoir des effets protecteurs physiques sur les cellules microbiennes (Amir & Alabouvette, 1993).

## CONCLUSION

Bien que parfois inévitable, le stockage des topsoils est reconnu pour avoir un effet dépressif sur la conservation du potentiel biologique de restauration. En Nouvelle-Calédonie, peu de travaux concernant le stockage des topsoils et leurs effets sur ce potentiel ont été réalisés. Ce second temps de recherche visait ainsi à caractériser l'évolution des potentialités biologiques (potentiel microbien, fertilité chimique, potentiel séminal) en fonction du couvert végétal associé, du temps et de la profondeur de stockage des topsoils, et les moyens de les conserver et de les gérer.

L'utilisation de l'outil métagénétique pour le suivi du potentiel microbien, une première dans ce type d'étude à notre connaissance, tend à démontrer une conservation possible du potentiel microbien, pour l'ensemble des profondeurs testées. Nous avons montré qu'il ne se produit aucune baisse de la richesse spécifique pendant stockage, mais une évolution dans le rapport des taxons dominants à la fois pour les communautés bactériennes et fongiques. L'évolution de la structure des communautés microbiennes est apparue notamment liée à la diminution des stocks de matière organique, mais aussi des conditions d'anoxies qui se mettent en place pendant stockage. Ces résultats permettent d'envisager le rétablissement des communautés microbiennes après réinstallation des topsoils stockés en fine couche, lors de travaux de restauration.

Le suivi du potentiel de fertilité chimique a montré une forte dégradation des teneurs en matière organique. Comme pour le potentiel microbien, la disparition de quantités trop importantes pourrait être défavorable à l'installation d'un couvert végétal, et risquent alors de diminuer les chances de réussite de la restauration écologique par la suite. Il est alors nécessaire d'envisager des apports en fertilisants lors de la réapplication des topsoils sur les sites à restaurer. Par ailleurs, bien que nos résultats aient démontré que la mobilité des éléments métalliques (Fe, Ni, Cr, Co, Mn) dans les stocks de topsoil évolue puissent évoluer à l'échelle du temps de notre étude, les valeurs atteintes ne dépassent pas les valeurs extrêmes rencontrées sur sols ultramafiques. Cela ne devrait donc pas poser de problème de toxicité lors de l'utilisation des topsoils pour les travaux de restauration.

L'observation du potentiel germinatif rapporte une tendance à la diminution des densités de germinations et de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils pendant le stockage, avec l'augmentation du temps et de la profondeur. Cela peut alors compliquer les travaux de restauration n'employant que le topsoil. Il apparaît alors nécessaire que les techniques de plantation, ou de semis d'autres espèces indigènes, viennent compléter le processus de restauration lors de la réinstallation des topsoils. Il est cependant à noter que la persistance dans la banque de graines d'espèce de Cypéracées, pionnières, à cycle de vie rapide, et produisant des semences en abondances, peuvent

contribuer à la fixation rapide des sols et au développement précoce d'un couvert végétal. Toutefois, au vu d'autres études menées sur le territoire mettant en œuvre d'autres types de stockage (étalé et andain) et ayant montré de meilleurs résultats de conservation du potentiel germinatif des topsoils à plus long terme, nous suggérons que ceux-ci devraient être envisagés avant le stockage en verse.

Enfin, la comparaison de deux types de topsoils différents a permis de mettre en évidence un effet origine (selon le couvert végétal qui leur était associé avant récupération) sur la vitesse de dégradation et les qualités de conservation des potentialités biologiques des topsoils dans le temps. En ce sens, le topsoil de maquis paraforestier est apparu supérieur au topsoil de maquis ligno-herbacé. Il devrait donc être envisagé une gestion séparée des topsoils en fonction de leur origine, ainsi qu'une caractérisation de leur niveau de dégradation avant réinstallation, lors des travaux de restauration. Ceci devrait contribuer à optimiser nos méthodes de gestion et de conservation des topsoils pendant stockage au bénéfice de la restauration de la diversité des écosystèmes miniers originels.

Enfin, de façon générale, nos résultats ont démontré un effet plus important de la période de stockage, que de l'effet profondeur, sur l'évolution des potentialités biologiques des topsoils. Nous suggérons alors que sur de courtes périodes de stockage, n'excédant pas 6 mois, il devrait être possible de stocker le topsoil sur une hauteur de 10m sans perte dramatique du potentiel de restauration. Pour des périodes plus longues, il paraît plus approprié d'envisager un stockage des topsoils sur de plus petites hauteurs (andain ou étalé) en combinaison avec un ensemencement des tas de topsoils. De récents travaux montrent en effet que l'entretien des couches superficielles des stocks de topsoils par la plantation d'un couvert végétal permet d'améliorer le maintien du potentiel de restauration dans le temps. Golos & Dixon (2014) ont montré que pour un même temps de stockage, l'installation d'un couvert végétal sur les stocks de topsoils, permettait d'améliorer la conservation du potentiel séminal par rapport à un topsoil stocké nu, rapportant une augmentation des taux de germination multipliés par 3,5. Pour des périodes de stockage, l'utilisation de Cypéracées à cycle de croissance et à fructification rapide paraît également pertinente. Elle permettrait de recharger la banque de graines des topsoils pendant le stockage. De même que l'utilisation d'espèces symbiotiques a montré un intérêt pour la conservation des propriétés structurelles des topsoils et du potentiel microbien (Balaguer, 2002).

**ANNEXE DU CHAPITRE 2**  
**Etude de l'évolution des potentialités biologiques des topsoils pendant stockage**

**ANNEXE 1. COMPOSITION DU MILIEU LPGA OU P7**

PREPARATION DU MILIEU LPGA OU P7 (pour 1L)

- 5g de peptone pancréatique de viande
- 3g d'extrait de levure
- 5g de glucose
- 20g d'agar
- 1l d'eau distillée

Ajustement à pH 7



**ANNEXE 2a. DETAILS DES POOLS ET PRIMERS UTILISES POUR LE SEQUENCAGE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES**

Pool Bactérien topsoil de maquis ligno-herbacé		
MID Primers		Sample
MID10_16S-0027F	MID10_16S-0533R	L.1.1 MID 10
MID2_16S-0027F	MID2_16S-0533R	L2.1 MID 2
MID3_16S-0027F	MID3_16S-0533R	L3.1 MID 3
MID4_16S-0027F	MID4_16S-0533R	L1.2 MID 4
MID5_16S-0027F	MID5_16S-0533R	L2.2 MID 5
MID6_16S-0027F	MID6_16S-0533R	L3.2 MID 6
MID7_16S-0027F	MID7_16S-0533R	L1.3 MID 7
MID8_16S-0027F	MID8_16S-0533R	L2.3 MID 8
MID9_16S-0027F	MID9_16S-0533R	L3.3 MID 9

Pool Bactérien topsoil de maquis paraforestier		
MID Primers		Sample
MID1_16S-0027F	MID1_16S-0533R	P1.1 MID 1
MID2_16S-0027F	MID2_16S-0533R	P2.1 MID 2
MID3_16S-0027F	MID3_16S-0533R	P3.1 MID 3
MID4_16S-0027F	MID4_16S-0533R	P1.2 MID 4
MID5_16S-0027F	MID5_16S-0533R	P2.2 MID 5
MID6_16S-0027F	MID6_16S-0533R	P3.2 MID 6
MID7_16S-0027F	MID7_16S-0533R	P1.3 MID 7
MID8_16S-0027F	MID8_16S-0533R	P2.3 MID 8
MID9_16S-0027F	MID9_16S-0533R	P3.3 MID 9

primer_forward_16S BACTERIEN	primer_forward_MIDsequence	length
MID1_16S-0027F	ACGAGTGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID2_16S-0027F	ACGCTCGACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID3_16S-0027F	AGACGCACTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID4_16S-0027F	AGCACTGTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID5_16S-0027F	ATCAGACACGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID6_16S-0027F	ATATCGCGAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID7_16S-0027F	CGTGTCTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID8_16S-0027F	CTCGCGTGTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID9_16S-0027F	TAGTATCAGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30
MID10_16S-0027F	TCTCTATGCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	30

primer_reverse_16S BACTERIEN	primer_reverse_MIDsequence	length
MID1_16S-0533R	ACGAGTGCGTTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID2_16S-0533R	ACGCTCGACATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID3_16S-0533R	AGACGCACTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID4_16S-0533R	AGCACTGTAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID5_16S-0533R	ATCAGACACGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID6_16S-0533R	ATATCGCGAGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID7_16S-0533R	CGTGTCTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID8_16S-0533R	CTCGCGTGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID9_16S-0533R	TAGTATCAGCTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29
MID10_16S-0533R	TCTCTATGCGTTACCGCGGCTGCTGGCAC	29

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type
Pool Bactérie ligno	102,5	ng/µl	1,88	2,11	DNA
Pool Bactérie para	79,4	ng/µl	1,88	2,23	DNA

**ANNEXE 2b. DETAILS DES POOLS ET PRIMERS UTILISES POUR LE SEQUENCAGE DES COMMUNAUTES FONGIQUES**

Pool Fongique topsoil de maquis ligno-herbacé		
MID Primers		Sample
MID0010_ITS3	MID0010_ITS4	L.1.1 MID 10
MID002_ITS3	MID002_ITS4	L.2.1 MID 2
MID003_ITS3	MID003_ITS4	L.3.1 MID 3
MID004_ITS3	MID004_ITS4	L.1.2 MID 4
MID005_ITS3	MID005_ITS4	L.2.2 MID 5
MID006_ITS3	MID006_ITS4	L.3.2 MID 6
MID007_ITS3	MID007_ITS4	L.1.3 MID 7
MID008_ITS3	MID008_ITS4	L.2.3 MID 8
MID009_ITS3	MID009_ITS4	L.3.3 MID 9

Pool Fongique topsoil de maquis paraforestier		
MID Primers		Sample
MID0010_ITS3	MID0010_ITS4	P1.1 MID 10
MID002_ITS3	MID002_ITS4	P2.1 MID 2
MID003_ITS3	MID003_ITS4	P3.1 MID 3
MID004_ITS3	MID004_ITS4	P1.2 MID 4
MID005_ITS3	MID005_ITS4	P2.2 MID 5
MID006_ITS3	MID006_ITS4	P3.2 MID 6
MID007_ITS3	MID007_ITS4	P1.3 MID 7
MID008_ITS3	MID008_ITS4	P2.3 MID 8
MID009_ITS3	MID009_ITS4	P3.3 MID 9

primer_forward_ITS3 FONGIQUE	primer_forward_MIDsequence	length
MID001_ITS3	ACGACTACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID002_ITS3	CGTAGACTAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID003_ITS3	TACGAGTATGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID004_ITS3	TACTCTCGTGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID005_ITS3	TAGAGACGAGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID006_ITS3	TCGTCGCTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID007_ITS3	ACATACGCGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID008_ITS3	ACGCGAGTATGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID009_ITS3	ACTACTATGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30
MID010_ITS3	ACTGTACAGTGCATCGATGAAGAACGCAGC	30

primer_reverse_ITS4 FONGIQUE	primer_reverse_MIDsequence	length
MID001_ITS4	ACGACTACAGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID002_ITS4	CGTAGACTAGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID003_ITS4	TACGAGTATGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID004_ITS4	TACTCTCGTGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID005_ITS4	TAGAGACGAGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID006_ITS4	TCGTCGCTCGTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID007_ITS4	ACATACGCGTTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID008_ITS4	ACGCGAGTATTCCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID009_ITS4	ACTACTATGTTCTCCGCTTATTGATATGC	30
MID010_ITS4	ACTGTACAGTCTCCGCTTATTGATATGC	30

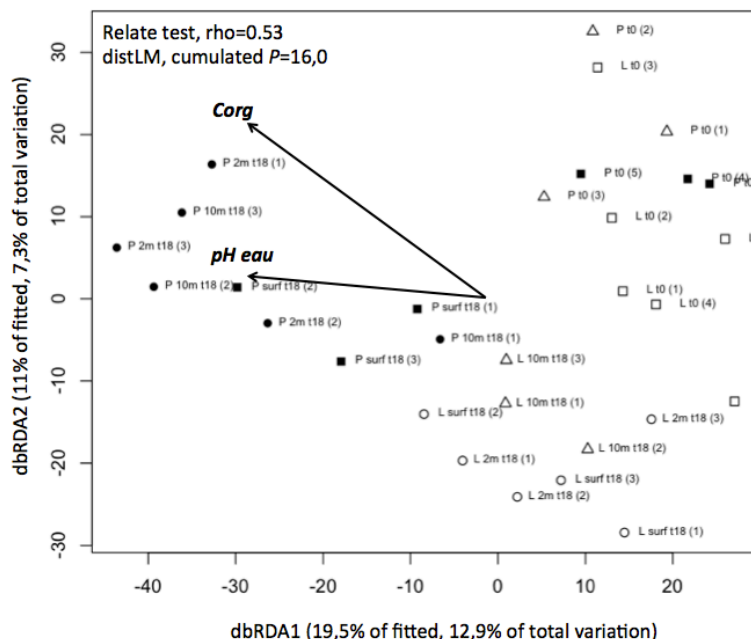
Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type	
Pool fungi ligno	70,1	ng/μl		1,93	2,12	DNA
Pool fungi para	70,7	ng/μl		1,89	2,19	DNA

**ANNEXE 3. Résultats des tests de corrélation de Spearman entre les différents facteurs de l'étude.**

Variables	pHeau	pHKCl	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Ca2+(meq%)	Mg2+ (meq%)	Na+ (meq%)	K+ (meq%)	CEC (meq%)	Ctot (g/kg)	Ntot (g/kg)	MO%	C/N	Densité germination graines.m-2)	Richesse spécifique banque de graine (sp.m-2)	UFC.g sol-1	PEM.100g sol-1	Profondeur	Temps	Origine	Min C (mgC.Kg-1)	Masse Vq App	WFPS %	Ca/Mg	
pHeau	1																											
pHKCl	0,909	1																										
Mn (mg/kg)	0,228	0,004	1																									
Ni (mg/kg)	0,526	0,348	0,766	1																								
Fe (mg/kg)	-0,156	-0,329	0,546	0,269	1																							
Cr (mg/kg)	-0,319	-0,119	-0,713	-0,706	-0,346	1																						
Co (mg/kg)	0,557	0,466	0,660	0,706	-0,002	-0,409	1																					
Ca2+(meq%)	0,582	0,351	0,705	0,781	0,374	-0,773	0,528	1																				
Mg2+ (meq%)	0,716	0,565	0,447	0,799	-0,038	-0,482	0,574	0,625	1																			
Na+ (meq%)	0,078	-0,163	0,640	0,549	0,602	-0,653	0,204	0,660	0,352	1																		
K+ (meq%)	0,536	0,309	0,748	0,792	0,447	-0,776	0,530	0,937	0,606	0,713	1																	
CEC (meq%)	0,122	-0,099	0,794	0,752	0,535	-0,809	0,428	0,753	0,464	0,787	0,778	1																
Ctot (g/kg)	0,062	-0,185	0,765	0,643	0,652	-0,753	0,276	0,766	0,351	0,793	0,793	0,912	1															
Ntot (g/kg)	0,119	-0,112	0,751	0,653	0,642	-0,802	0,256	0,762	0,357	0,753	0,809	0,897	0,949	1														
MO%	0,062	-0,185	0,765	0,643	0,652	-0,753	0,276	0,766	0,351	0,793	0,793	0,912	1,000	0,949	1													
C/N	-0,273	-0,198	-0,345	-0,363	-0,194	0,503	-0,163	-0,333	-0,242	-0,187	-0,395	-0,349	-0,277	-0,511	-0,277	1												
Densité germination (graines.m-2)	-0,065	-0,177	0,245	0,197	0,170	-0,239	0,170	0,284	0,015	0,270	0,243	0,350	0,357	0,301	0,357	0,033	1											
Richesse spécifique banque de graines	-0,107	-0,198	0,287	0,246	0,255	-0,274	0,117	0,283	0,047	0,296	0,242	0,424	0,445	0,374	0,445	0,055	0,827	1										
UFC.g sol-1	-0,195	-0,381	0,340	0,179	0,478	-0,263	0,020	0,283	-0,047	0,398	0,321	0,449	0,539	0,433	0,539	0,057	0,458	0,510	1									
PEM.100g sol-1	-0,276	-0,339	0,290	0,188	0,296	-0,260	0,130	0,213	-0,092	0,323	0,144	0,429	0,412	0,325	0,412	0,084	0,445	0,511	0,574	1								
Profondeur	0,300	0,257	-0,063	-0,024	-0,152	0,103	0,035	-0,004	0,122	-0,090	0,102	-0,173	-0,142	-0,095	-0,142	-0,066	-0,348	-0,362	-0,139	-0,527	1							
Temps	0,520	0,672	-0,240	0,057	-0,524	0,131	0,183	-0,010	0,328	-0,342	-0,021	-0,355	-0,417	-0,324	-0,417	-0,096	-0,454	-0,480	-0,790	-0,624	0,268	1						
Origine	0,449	0,296	0,422	0,600	0,183	-0,648	0,312	0,775	0,505	0,438	0,748	0,557	0,604	0,634	0,604	-0,376	0,327	0,344	0,370	0,196	0,000	0,000	1					
Min C (mgC.Kg-1)	-0,244	-0,436	0,497	0,322	0,511	-0,402	0,124	0,395	0,064	0,620	0,358	0,606	0,600	0,476	0,600	0,051	0,370	0,447	0,488	0,424	-0,334	-0,557	0,237	1				
Masse Vq App	0,045	0,045	-0,351	-0,288	-0,241	0,368	-0,146	-0,219	-0,140	-0,199	-0,173	-0,421	-0,269	-0,292	-0,269	0,137	-0,258	-0,295	-0,124	-0,322	0,549	0,210	-0,152	-0,330	1			
WFPS %	0,168	0,168	0,276	0,318	0,155	-0,254	0,162	0,281	0,233	0,105	0,226	0,278	0,140	0,170	0,140	-0,158	0,168	0,126	0,010	0,102	-0,388	0,014	0,144	0,182	-0,764	1		
Ca/Mg	0,34	0,135	0,591	0,488	0,476	-0,263	0,301	0,864	0,229	0,613	0,817	0,622	0,726	0,705	0,726	-0,381	0,339	0,322	0,414	0,261	-0,112	-0,177	0,699	0,454	0,112	0,170	1	

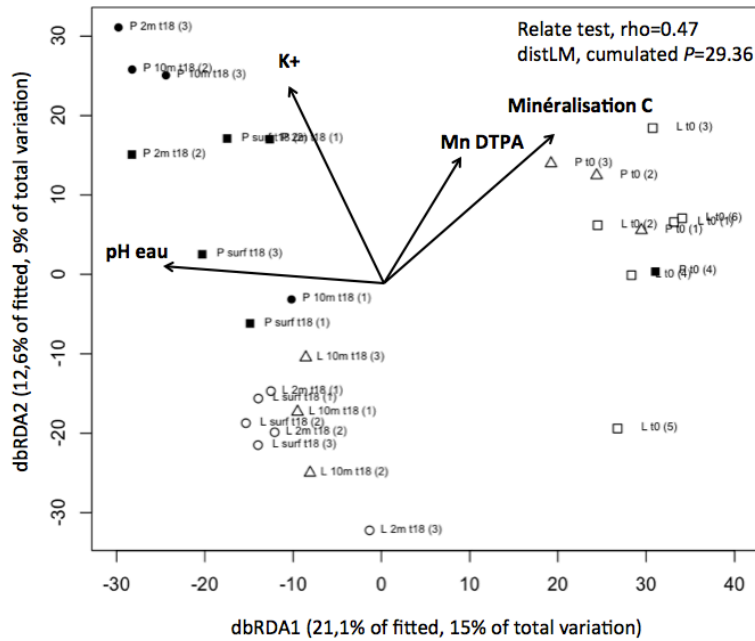
Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0.05

**ANNEXE 4a. Résultats du modèle DISTLM entre la structure de la communauté bactérienne et les variables environnementales édaphiques.**



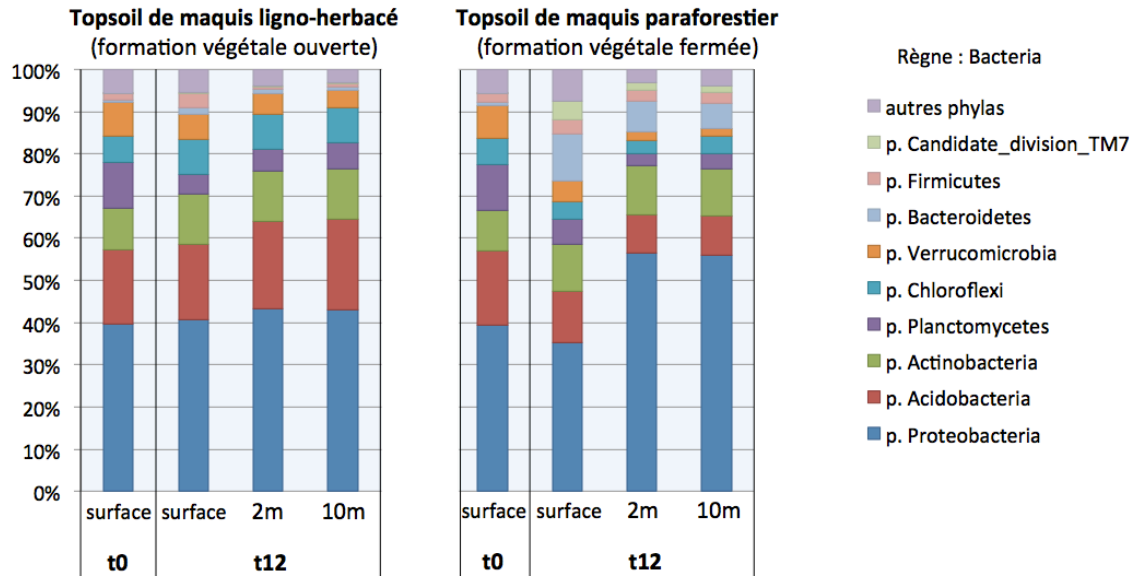
Resemblance worksheet							
Name: Bacteria							
Data type: Similarity							
Selection: All							
Transform: Square root							
Resemblance: S17 Bray-Curtis similarity							
Predictor variables worksheet							
Name: Edaphique							
Data type: Environmental							
Sample selection: All							
Variable selection: All							
Selection criterion: R^2							
Selection procedure: Step-wise							
SEQUENTIAL TESTS							
Variable	R^2	SS(trace)	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+pHeau	0.10379	10059	3.2427	0.001	0.10379	0.10379	28
+Ctot mg/g ou g/kg	0.16392	5827.9	1.9419	0.001	0.060133	0.16392	27
+WFPS	0.2009	3583.9	1.2032	0.079	0.036979	0.2009	26
+Mn mg/kg	0.23579	3381.1	1.1413	0.191	0.034887	0.23579	25
+Mineralisation C	0.26971	3287.1	1.1146	0.258	0.033917	0.26971	24
+Co mg/kg	0.30456	3377.4	1.1525	0.177	0.034848	0.30456	23
+Ni mg/kg	0.33754	3197.1	1.0955	0.288	0.032988	0.33754	22
+Fe mg/kg	0.37314	3450.1	1.1926	0.171	0.035599	0.37314	21
+porosité	0.40683	3264.6	1.1358	0.252	0.033685	0.40683	20
+Ca2+ meq%	0.44256	3462.8	1.2178	0.168	0.03573	0.44256	19
+C/N	0.47513	3156.7	1.117	0.316	0.032572	0.47513	18
+Ntot g/kg	0.50435	2831.4	1.002	0.483	0.029215	0.50435	17
+CEC meq%	0.53363	2838.5	1.0048	0.48	0.029289	0.53363	16
+Na+ meq%	0.56025	2579	0.90767	0.611	0.02661	0.56025	15
+Masse Vq App	0.58594	2489.9	0.86864	0.668	0.025691	0.58594	14
+Cr mg/kg	0.61181	2507.9	0.86659	0.657	0.025877	0.61181	13
+Mg2+ meq%	0.63869	2604.7	0.89263	0.617	0.026876	0.63869	12
+K+ meq%	0.66456	2507.2	0.84834	0.677	0.02587	0.66456	11

**ANNEXE 4b. Résultats du modèle DISTLM entre la structure de la communauté fongique et les variables environnementales édaphiques.**

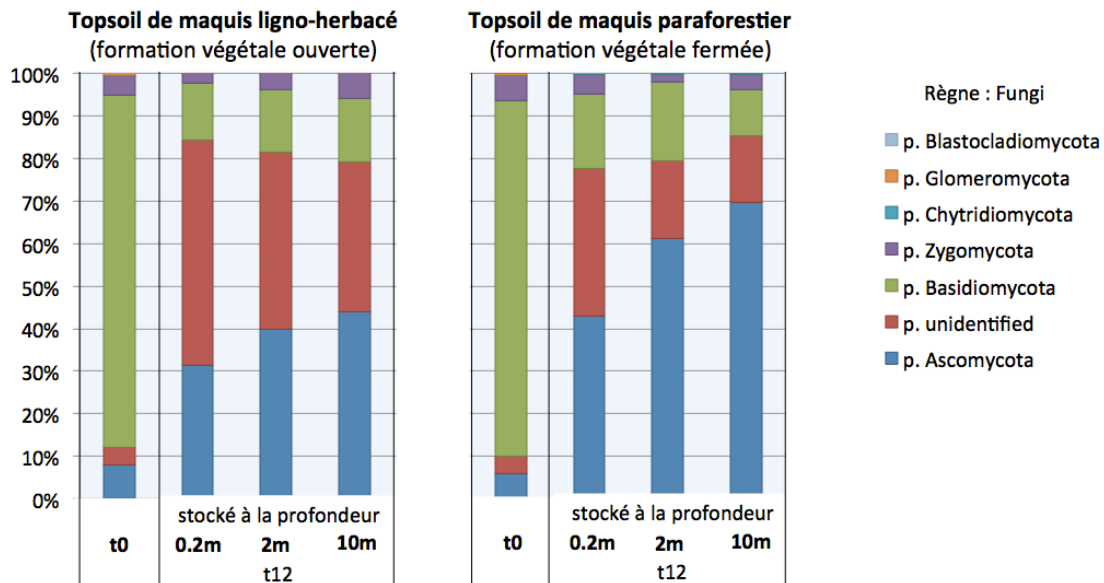


Resemblance worksheet							
Name:	Fungi						
Data type:	Similarity						
Selection:	All						
Transform:	Square root						
Resemblance:	S17 Bray-Curtis similarity						
Predictor variables worksheet							
Name:	Edaphique						
Data type:	Environmental						
Sample selection:	All						
Variable selection:	All						
Selection criterion:	R <sup>2</sup>						
Selection procedure:	Step-wise						
SEQUENTIAL TESTS							
Variable	R <sup>2</sup>	SS(trace)	Pseudo-F	P	Prop.	Cumul.	res.df
+pHeau	0.1342	12098	4.0301	0.001	0.1342	0.1342	26
+Minéralisation C	0.20703	6565.5	2.2962	0.001	0.072832	0.20703	25
+Mn mg/kg	0.24992	3865.9	1.3722	0.018	0.042885	0.24992	24
+K+ meq%	0.29375	3950.9	1.4273	0.019	0.043828	0.29375	23
+Ni mg/kg	0.32802	3089.4	1.122	0.231	0.034271	0.32802	22
+Co mg/kg	0.3618	3045	1.1115	0.267	0.033778	0.3618	21
+Ntot g/kg	0.39426	2926.1	1.0717	0.38	0.03246	0.39426	20
+Ca2+ meq%	0.42774	3018.7	1.1118	0.297	0.033487	0.42774	19
+WFPS	0.46025	2930.5	1.0841	0.342	0.032508	0.46025	18
+C/N	0.49162	2827.3	1.0488	0.427	0.031363	0.49162	17
+Na+ meq%	0.5228	2810.8	1.0454	0.415	0.031181	0.5228	16
+porosité	0.55205	2637.2	0.97962	0.535	0.029255	0.55205	15
+Ctot mg/g ou g/kg	0.58099	2608.9	0.96699	0.52	0.028941	0.58099	14
+CEC meq%	0.60963	2581.5	0.95364	0.552	0.028637	0.60963	13
+Masse Vq App	0.63779	2539	0.93313	0.587	0.028165	0.63779	12
+Cr mg/kg	0.66369	2334.8	0.84715	0.649	0.0259	0.66369	11
+Mg2+ meq%	0.68642	2048.3	0.7246	0.734	0.022722	0.68642	10
+Fe mg/kg	0.71202	2307.8	0.80007	0.675	0.025601	0.71202	9

**ANNEXE 5. Abondance relative des phylas bactériens des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). Pour plus de lisibilité, seuls 9 PHYLAS sur les 45 identifiés sont représentés. p. (phyla)**



**ANNEXE 6. Abondance relative des phylas fongiques des topsoils, au cours du stockage (t0, t12 mois) et selon la profondeur (0,2m ; 2m ; 10m). p. (phyla)**





**CHAPITRE 3**

**ESSAI DE REVITALISATION D'UN TOPSOIL DEGRADE PENDANT  
STOCKAGE**





## I/ INTRODUCTION

Comme présenté au chapitre précédent, le stockage des topsoils, parfois inévitable, peut représenter une étape défavorable à la conservation du potentiel de restauration de celui-ci, et finalement mené à son infertilité (Ghose et al. 2012). La revitalisation d'un topsoil alors rendu infertile après stockage, vise à rétablir une qualité biologique suffisante pour que celui-ci puisse à nouveau complètement jouer son rôle d'outil de restauration écologique (Ghose et al. 2012). Les méthodes, voies et moyens de revitalisation des topsoils, et plus généralement de vitalisation de substrats infertiles comme alternative au topsoil pour la restauration écologique, font aujourd'hui l'objet d'un intérêt croissant (Séré et al. 2008). De nombreux travaux rapportent l'efficacité de différentes techniques de fertilisation et d'inoculation, seule ou en combinaison, pour la revitalisation/vitalisation de substrats infertiles, et leur intérêt à promouvoir l'installation pérenne d'un couvert végétal diversifié à travers de nombreux écosystèmes et dans de nombreux pays (Sydnor & Redente, 2002 ; Puschel et al. 2008 ; Lee et al. 2012). Toutefois, il apparaît à travers la littérature, que les performances des moyens mis en œuvre varient selon la nature des fertilisants employés (fertilisants chimiques, amendement d'origine animale ou végétale), mais aussi des caractéristiques physico-chimiques des substrats sur lesquels ces moyens sont appliqués (Brofas et al. 2000 ; Dimitriu et al. 2010 ; Gardner et al. 2012). En outre, Kelly (2006), souligne que le choix des techniques de revitalisation/vitalisation repose principalement sur leur disponibilité et les coûts associés à leur utilisation. Ainsi, le choix et l'utilisation des techniques de revitalisation/vitalisation de substrats infertiles doivent donc être réalisés en fonction de leurs propriétés, de leur disponibilité à l'échelle locale, mais également des objectifs finaux de restauration (Zipper et al. 2011). Ces travaux ont apporté des résultats convaincants et de nombreuses informations permettant d'envisager le développement d'outils pertinents de revitalisation des topsoils dégradés.

Dans une expérience au champ, de type aléatoire complet, nous avons testé 10 modalités de revitalisation d'un topsoil dégradé, selon les moyens techniques dont pourrait disposer en routine Koniambo Nickel SAS. Ces modalités portent notamment sur des essais, seul ou combiné, de techniques de réensemencement du topsoil avec des graines de plantes endémiques appliquées par hydroseeding, sur application d'une couche fine de topsoil frais, mais aussi sur des plantations à l'aide d'espèces inoculées par des bactéries ou mycorhizes, et élevées en pépinière. L'effet de chaque modalité sur la croissance végétale a été évalué par le dénombrement et l'identification des émergences de plantules, l'évaluation des biomasses végétales, ainsi que par les mesures des teneurs en éléments nutritifs et métaux lourds, des parties aériennes et souterraines des plants. L'effet de ces modalités sur les micro-organismes a été mesuré par l'analyse du taux de mycorhization des plants, la

détermination de l'activité phosphatase des sols, ainsi que par le suivi de paramètres physico-chimiques. Ces mesures permettent d'approcher la dynamique d'évolution du topsoil et les capacités d'échanges entre le topsoil et la plante. La comparaison des différentes modalités permet de confirmer ou d'infirmer l'intérêt des diverses pratiques testées dans les modalités, et de quantifier leur influence sur la réintroduction de potentialités biologiques. Le cas échéant, elles permettent de proposer de nouveaux outils pour la restauration écologique des milieux miniers dégradés.

## II/ MATERIEL ET METHODE

### II.1/ CARACTERISTIQUES DU TOPSOIL A REVITALISER

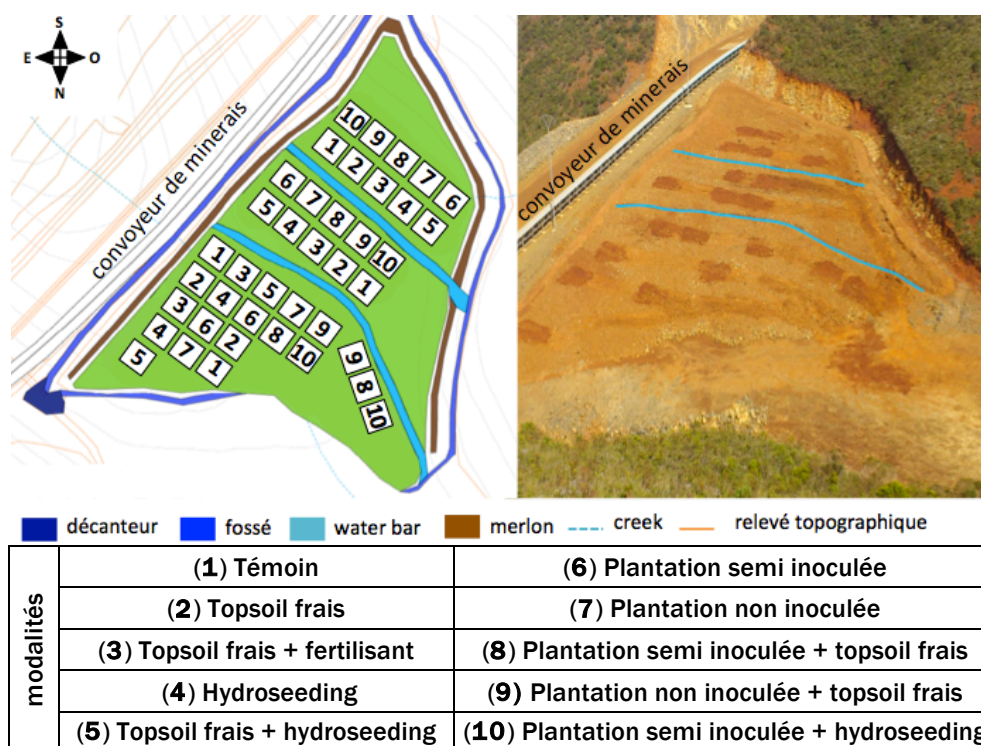
Le substrat servant de support aux essais de revitalisation est un topsoil issu de maquis ligno-herbacé, qui a été stocké durant 2 années à une profondeur de deux mètres. Afin d'évaluer le niveau de dégradation de ce topsoil, nous l'avons comparé à son équivalent en milieu naturel en utilisant les résultats obtenus au chapitre 1, « typologie des topsoils » (cf. chap1). Par rapport, à un topsoil de maquis ligno-herbacé *in situ*, le topsoil stocké était caractérisé avant expérimentation, par une faible densité moyenne de spores endomycorhiziens ( $40 \pm 8,24$ se, contre  $448,9 \pm 24,74$ se en milieu naturel), et une absence de potentiel germinatif des graines (contre  $10 \pm 4,00$ se) graines.m<sup>-2</sup>, et  $5,9 \pm 0,30$ se espèces.m<sup>-2</sup> en milieu naturel). Les caractéristiques physico-chimiques du topsoil stocké à revitaliser et de son équivalent en milieu naturel, sont présentées dans le tableau 1. Par rapport au topsoil *in situ*, le topsoil stocké montre, une augmentation significative du pH de 1,5 unité, des baisses des teneurs en azote total et carbone organique de 95% et 62%, respectivement ainsi qu'une baisse de 50% du potassium et du calcium. Sur les teneurs en métaux lourds, on note une augmentation des teneurs en fer d'environ 30%, en chrome d'environ 300%, et une diminution du cobalt d'environ 33%. Selon ces résultats, ce topsoil est ici considéré comme « dégradé », et sera nommé comme tel dans la suite de ce chapitre. Les méthodes mise en œuvre pour la caractérisation du topsoil dégradé avant expérimentation sont décrites dans le matériel et méthode du chapitre 2 (Cf. § II.5, II.6, II.8.2.1).

**Tableau 1.** Comparaison des caractéristiques physico-chimiques du topsoil de maquis ligno-herbacé, stocké pendant 2 ans, par rapport au topsoil en milieu naturel. Des lettres différentes indiquent une différence significative au seuil de 0,05.

	TOPSOIL DEGRADE	TOPSOIL DU MILIEU NATUREL
pH	7,05 ( $\pm 0,02$ )a	5,44 ( $\pm 0,17$ )b
Ntot (mg/g)	0,04 ( $\pm 0$ )a	0,88 ( $\pm 0,08$ )b
Corg(h/kg)	9,36 ( $\pm 0,25$ )a	24,73 ( $\pm 1,28$ )b
CEC	6,58 ( $\pm 0,23$ )a	7,5 ( $\pm 0,51$ )a
Na meq%	0,08 ( $\pm 0,02$ )a	0,13 ( $\pm 0,02$ )a
K meq%	0,04 ( $\pm 0$ )a	0,08 ( $\pm 0,01$ )b
Ca meq%	0,35 ( $\pm 0,02$ )a	0,83 ( $\pm 0,14$ )b
Mg meq%	6,51 ( $\pm 0,36$ )a	1,19 ( $\pm 0,37$ )b
Fe (mg/kg)	105,24 ( $\pm 10,18$ )a	77,05 ( $\pm 5,75$ )b
Ni (mg/kg)	86,2 ( $\pm 5,73$ )a	76,69 ( $\pm 28,55$ )a
Mn (mg/kg)	173,35 ( $\pm 10,14$ )a	667,61 ( $\pm 134,91$ )b
Cr (mg/kg)	2 ( $\pm 0,21$ )a	0,54 ( $\pm 0,18$ )b
Co (mg/kg)	82,17 ( $\pm 1,43$ )a	121,86 ( $\pm 34,36$ )a

## II.2/ DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le topsoil dégradé a été épandu sur une surface de 3500m<sup>2</sup>, avec une épaisseur de 30cm. La zone d'accueil de l'essai se situe sur le massif du Koniambo (Cf. Chap2, § II.1) aux coordonnées : (S 20° 59' 49.5803" ; E 164° 47' 23.0054). Dans cet essai, nous comparons dix modalités de revitalisation. Pour cela, nous avons mis en place sur zone d'essai, un plan d'expérience aléatoire complet, constitué de quatre répétitions par modalité. Ce dispositif est illustré en figure 1. Ce type de dispositif, largement utilisé au champ, permet de façon robuste, la comparaison des différentes modalités en minimisant l'erreur expérimentale (Dagnelie. 2012). Chaque modalité couvre une surface de 25m<sup>2</sup> (5m x 5m). Les modalités sont distantes du bord de l'essai, ainsi qu'entre elles, de deux mètres minimum. Conformément au schéma minier mis en place par Koniambo Nickel SAS, les travaux de terrain ont été réalisés par pelle hydraulique et articulée de 25 tonnes. La mise en place de l'essai s'est déroulée d'avril à juillet 2013. Il est à noter que la fin de mise en place de l'essai s'est située, pour des raisons logistiques, en dehors de la saison humide, contrairement au planning des travaux de restauration habituel. Pour cette raison, un arrosage par pompe motorisée a été mis en place sur chaque modalité, une fois par semaine pendant 5 mois, jusqu'à la saison humide suivante, afin d'éviter un stress physique pouvant nuire à l'essai.



**Figure 1.** a) Schéma du dispositif expérimental en bloc aléatoire complet avec les répétitions, b) photo du dispositif appliqué au champ (source : données KNS internes ; L.Bordez).

### II.3/ DETAIL DES MODALITES TESTEES

Le choix des modalités testées s'est fait en accord avec KNS, et correspondent à une combinaison d'outils de restauration des terrains miniers dégradés dont dispose déjà, ou dont pourrait facilement disposer l'opérateur minier, et qui pourrait donc être applicable à l'échelle industrielle. Ces modalités s'appuient ainsi sur des techniques de réensemencement du topsoil avec des graines de plantes endémiques appliquées par hydroseeding, de revitalisation par application d'une couche fine de topsoil frais, et de plantation à l'aide d'espèce inoculées par des bactéries ou mycorhizes, et élevées en pépinière. Les dix modalités testées sont les suivantes :

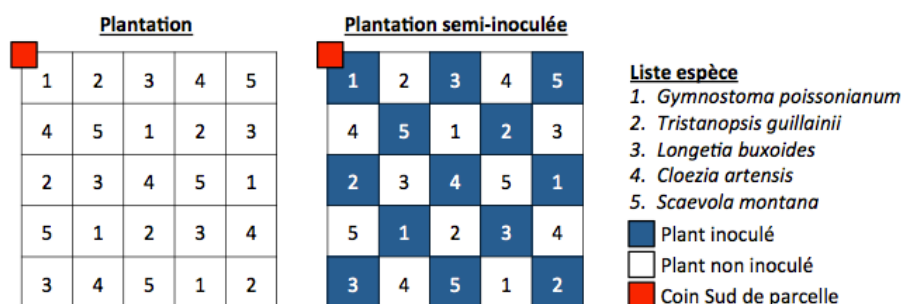
- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. Témoin                       | 6. Plantation semi inoculée                 |
| 2. Topsoil frais                | 7. Plantation non inoculée                  |
| 3. Topsoil frais + fertilisant  | 8. Plantation semi inoculée + topsoil frais |
| 4. Hydroseeding                 | 9. Plantation non inoculée + topsoil frais  |
| 5. Topsoil frais + hydroseeding | 10. Plantation semi inoculée + hydroseeding |

Témoin : Cette modalité définit une parcelle de 25m<sup>2</sup> de topsoil dégradé laissée nue, servant de témoin à l'ensemble des autres modalités.

Topsoil frais : Cette technique consiste en l'application d'un topsoil de maquis ligno-herbacé « frais », c'est à dire décapé une semaine avant son application, et épandue en couche de 3cm d'épaisseur. Il s'agit de tester la capacité d'un topsoil frais à revitaliser un topsoil dégradé par « contamination ». Un descriptif des paramètres physico-chimiques et biologiques (banque de graines et microbiologique) de ce topsoil a déjà été donné au point précédent.

Hydroseeding : Cette technique consiste en l'application par hydroseeder, d'un mélange composé d'eau, de mulch, de colle, d'engrais (Orgasol 3500kg.Ha-1 (6-4-2, +4MgO) et BIOFERT MOANA 100kg.Ha-1, N (2,2%), P (0,17%), Ca (0,1%), Mg (0,05%) Na (0,15%)) et de graines de 7 espèces indigènes (*Machaerina deplanchei*, *Joinvillea plicata*, *Cloezia artensis*, *Codia montana*, *Costularia comosa*, *Scaevola montana* et *Schoenus tendo*). Afin de correspondre à l'origine ligno-herbacé du topsoil dégradé, l'ensemble des espèces testées dans cet essai a été recensé au sein de cette formation. Les lots de graines utilisés ont été fournis par l'opérateur minier, et proviennent de récoltes manuelles réalisées par les tribus environnantes au site minier. Les capacités de germination des lots de graines ont été testées avant utilisation, selon le protocole donné en annexe 1. Les quantités introduites dans « le mélange » d'hydroseeder, ont alors été ajustées selon le matériel disponible, pour obtenir une densité de germination de 14 plants au mètre carré, comme traditionnellement recherché. Les proportions et descriptif de chaque lot de graines sont données en annexe 2.

**Plantation :** Cette technique consiste en la plantation des espèces *Gymnostoma poissonianum*, *Tristanopsis guillainii*, *Longetia buxoides*, *Cloezia artensis*, *Scaevola montana*. Ces plants ont été obtenus par production et élevage de 18 mois sur terreau, en pépinière, situé au pied du massif du Koniambo, en conditions de température non contrôlée, (Pépinière de la Néa, Koné). Les plants choisis pour la plantation ont été calibrés pour présenter des tailles homogènes. La plantation est réalisée sur une maille d'un mètre carré et selon le dispositif présenté en figure 2. De la même façon que pour l'hydroseeding, l'ensemble des espèces testées dans cet essai a été recensé au sein du maquis ligno-herbacé afin de correspondre à l'origine du topsoil dégradé. Conformément au schéma minier prévu par Koniambo Nickel SAS, les plantations ont subi une fertilisation initiale comportant 40g d'engrais retard Agriform (20.10.05), 50g de PHYSALG27 (00.27.00), 2,5kg de compost produit sur site minier, et 5g d'hydrorétenteur.



**Figure 2.** Schéma des dispositifs de plantation semi-inoculée et non inoculée.

**Plantation semi-inoculée :** Il s'agit de l'inoculation d'un plant sur deux, des espèces végétales décrites précédemment, par un mélange de symbiotes microbiens. Le but est de vérifier si l'inoculum mycorhizien peut se propager aux plants voisins. La plantation est réalisée sur une maille d'un mètre carré et selon le dispositif présenté en figure 2.

Les 5 espèces végétales utilisées, connues pour être endomycorhizées, ont été inoculées avec les souches de champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) PSB1, PSO1, RARC1, isolées à partir de substrats ultramafiques, puis élevées six mois en pépinière avant plantation. La description de ces souches et la démonstration de leur rôle fonctionnel dans l'adaptation des plantes aux contraintes ultramafiques est donné dans Gensous (2014). Les souches ont été multipliées en serre par culture trap, puis mélangées pour l'inoculation des plants dans les proportions suivantes : 12% de PSB1, 58% de PSO1 et 30% de RARC1 pour un total de 539 spores par plants. Les proportions pour chacun des isolats sont choisies en fonction des différentes quantités de spores disponibles après production. Le choix d'utiliser un mélange d'isolats est dicté par le constat que les isolats

d'AMF de sol ultramafique ont généralement des propriétés complémentaires (Gensous, 2014), et par le principe écologique selon lequel un système complexe est plus stable et globalement plus efficient. Les protocoles de production de l'inoculum et d'inoculation sont donnés en annexe 3.

Il est toutefois à noter que l'ensemble des plants utilisés dans cet essai, bien que produits en pépinière, présentaient déjà tous une mycorhization par des AMF avant que nous réalisions notre inoculation. Il s'agit là, bien sûr, d'un biais expérimental, mais que nous n'avons pas pu éviter, les plants ayant été produits indépendamment de la mise en place de notre expérimentation et n'ayant pas pu être remplacés étant donné la lenteur de croissance de ces espèces végétales. Les moyennes d'intensités de mycorhization globales sur ces plantes ont été évaluées comme suit: *Gymnostoma poissonianum* 20,2% ( $\pm 2,24se$ ), *Tristaniopsis guillainii* 8,3% ( $\pm 1,14se$ ), *Longetia buxoides* 2,1% ( $\pm 0,46se$ ), *Cloezia artensis* 1,1% ( $\pm 2,24se$ ), *Scaevola montana* 3,4% ( $\pm 2,24se$ ).

L'espèce *Gymnostoma poissonianum*, également connue pour vivre en symbiose avec des bactéries du genre *Frankia* a été inoculée avec un broyat de nodules. Un prélèvement sur des *Gymnostoma poissonianum* en milieu naturel a été réalisé. 300g de nodules ont été broyés dans 300ml d'eau et les plants inoculés avec 5ml d'inoculum par plant, le jour de la plantation.

#### II.4/ ECHANTILLONNAGE

L'expérience a été menée sur 18 mois, date à laquelle le suivi a été arrêté et l'échantillonnage réalisé. L'échantillonnage s'est déroulé en deux temps. Dans un premier temps et selon un tirage aléatoire, cinq échantillons de sols non rhizosphériques d'un volume de 300 cm<sup>3</sup> ont été prélevés pour l'ensemble des modalités, ainsi que cinq échantillons de sols rhizosphériques pour chaque espèce des modalités comportant une plantation. Les échantillons de sols ont été prélevés à l'aide d'un plantoir à bulbe, identifiés et conditionnés dans des sacs plastiques hermétiques. Dans un second temps, toujours selon un tirage aléatoire, cinq plants de chaque espèce, pour chaque modalité comportant une plantation, ont été déracinés à l'aide d'une bêche, identifiés et placés dans des sacs plastiques hermétiques de 50 litres. Les échantillons de sol ont été conservés à 4°C, pour une période maximale de trois semaines, durant laquelle l'ensemble des analyses de laboratoire a été réalisé. Cette méthode de conservation apparaissait comme la plus optimale pour la préservation du potentiel biologique de nos échantillons (MDDEPQ, 2009a, 2009b). Les plants ont été stockés à température ambiante pour un maximum de 24 heures avant mesures. Pelle terrassière et plantoir à bulbe ont été désinfectés à l'éthanol 95° entre deux échantillonnages (MDDEPQ, 2009a, 2009b).



## II.5/ SUIVI DES INOCULATIONS

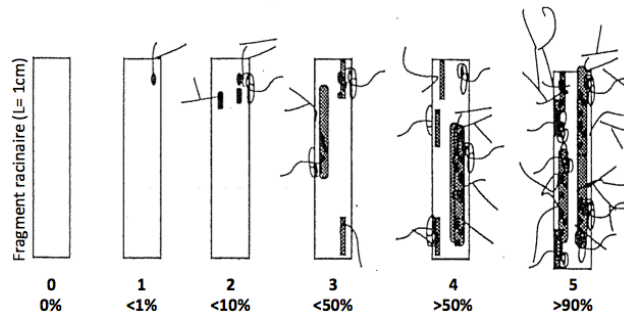
Afin de pouvoir tester l'influence de l'effet « inoculation » sur la revitalisation, la présence de nodules de *Frankia* pour l'espèce *Gymnostoma poissonianum* et les taux de mycorhization pour l'ensemble des espèces ont été évaluées.

### II.5.1/ EVALUATION DE L'ENDOMYCORHIZATION

24 heures après leur transfert au laboratoire, les racines de chaque plant ont été rincées sous eau courante afin d'éliminer les résidus de sol. 5g de racines fines ont ensuite été prélevées en différents endroits du chevelu racinaire, afin de constituer un échantillon composite destiné à l'évaluation des taux d'endomycorhization. Ces échantillons ont été stockés à 4°C en attendant leur utilisation.

L'évaluation du taux d'endomycorhization des plants est réalisée par estimation de l'importance relative des zones de cortex racinaires colonisées par des AMF (Chantelot, 2003). Chaque échantillon de racines est immergé dans une solution de KOH à 10%, puis mis à l'étuve 90°C pendant 1h, afin de décolorer les tissus racinaires. Les racines sont ensuite rincées sous eau courante et égouttées avant d'être à nouveau immergées dans une solution de Bleu de Trypan, puis remises en étuve 90°C pour 15 minutes, afin de colorer les structures fongiques (Phillips & Hayman, 1970). Les racines subissent alors un nouveau rinçage et dix fragments de racines d'une longueur d'un centimètre sont montés, dans une solution de glycérol, entre lames et lamelles. Les lames sont alors vernies pour pouvoir être conservées. La lecture des lames s'est faite sous microscope à grossissement variable, et les intensités de mycorhization relevées. Le système de notation proposé par Trouvelot et al. (1986) a été retenu pour cette étude (Fig. 3). Ce système consiste en l'attribution à chacun des fragments racinaires observés, d'une note de classe comprise entre 0 et 5 correspondant à l'estimation de la proportion de cortex colonisée par le symbiote mycorhizien. Les fréquences et intensités globales de mycorhization ont alors pu être déterminées selon les formules suivantes:

- **Fréquence de mycorhization**  $F(\%) = (\text{nb fragments mycorhizés} / \text{nb total}) * 100$  (Marx et al., 1977).
- **Intensité globale de la mycorhization**  $M(\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{nb total de fragments}$ , où  $n_5$  représente le nombre de fragments mycorhizés notés 5,  $n_4$  le nombre de fragments notés 4 et ainsi de suite jusqu'à  $n_1$ .



**Figure 3.** Système de notation utilisé pour évaluer l'importance de l'infection mycorhizienne (Trouvelot et al. 1986).

### II.5.2/ EVALUATION DE LA PRESENCE DE NODULES BACTERIEN A *FRANKIA*

L'évaluation de nodules bactérien de *Frankia*, a eu lieu après le séchage des plants et les mesures de biomasse sèche afin de ne pas biaiser les résultats (cf. point suivant). Une fois pesés, les plants de *Gymnostoma poissonianum* ont été débarrassés de leurs nodules. La masse de nodules par plant a ensuite été pesée, puis rapportée à la biomasse sèche du plant pour obtenir un rapport pondéral exprimé en pourcentage de masse sèche.

## II.6/ SUIVI DE LA REPONSE VEGETALE

### II.6.1/ SUIVI GERMINATIF

Afin de prendre en compte la réponse de la banque de graine de l'ensemble des modalités, un dénombrement des germinations a été réalisé en fin d'expérience, avant échantillonnage des plants.

### II.6.2/ EVALUATION DES TAUX DE MORTALITE

L'évaluation des taux de mortalité est un indice couramment utilisé pour le suivi des travaux de restauration (L'Huillier et al. 2010) Le taux de mortalité a été évalué en fin d'expérience, avant échantillonnage des plants. Il est calculé par espèce, et par modalité, et est exprimé en pourcentage moyen.

### II.6.3/ EVALUATION DES BIOMASSES SECHES

La mesure des biomasses sèches, qui évalue la croissance des plantes, est également considérée comme un indicateur fiable de la fertilité globale des sols lorsqu'il peut être mis en œuvre. Ces mesures ont été réalisées après 3 semaines de séchage en salle climatisée, sous néons blancs. Durant cette période, les plants étaient individuellement conditionnés dans des sacs de papier kraft. A l'issue de chaque pesée, 10g de matériel foliaire et 10g de matériel racinaire ont été prélevés sur chaque plant et conditionnés dans des sacs hermétiques pour les mesures des teneurs en éléments nutritifs et métaux lourds.

## II.6.4/ MESURE DES TENEURS EN MINERAUX ET METAUX LOURDS DES VEGETAUX

Les mesures des teneurs en éléments minéraux et métaux lourds du matériel végétal (racinaire et foliaire) collecté à l'issue des mesures des biomasses sèches, ont été réalisées par minéralisation puis dosage par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA). Les éléments dosés étaient les suivants : N, P, K, Ca, Mg, Ni, Co, Mn, Cr, Fe. 0,5g de broyat de matériel végétal additionné de 6 ml d'eau Régal (5ml acide nitrique à 69% & 1ml acide chlorhydrique à 37%) ont été minéralisé au minéralisateur Multiwave 3000 selon les cycles donnés dans le tableau 2. Le volume de minéralisât récupéré est ensuite ajusté à 25mL avec de l'eau ultrapure, et le dosage des différents éléments est alors réalisé par SAA en flamme. A cette fin, des gammes étalons sont préparées à partir de solutions pures pour chaque élément (flacons Perkin Elmer Pure 1000mg/L). Des dilutions au 100ième et au 1000ième sont préparées pour chaque échantillon afin d'avoir des résultats qui correspondent au domaine de linéarité de la courbe étalon.

**Tableau 2.** Cycle du minéralisateur Multiwave utilisé pour la minéralisation des échantillons

Puissance de cycle (en Watt)	Temps entre les cycles (en min)	Temps de maintien pour chaque cycle (en min)
200	0	1
400	16	5
600	10	15

## II.7/ MESURES DES PARAMETRES EDAPHIQUES

### II.7.1/ MESURE DES ACTIVITES PHOSPHATASES

Les mesures des activités enzymatiques du sol, de type phosphatases, sont considérées comme des indicateurs potentiels de la qualité du sol car elles traduisent l'activité globale des microorganismes (Yano et al. 2005). Elles permettent donc d'approcher la dynamique d'évolution du sol et les capacités d'échanges entre le sol et la plante (Chantelot, 2003).

Les activités phosphatases ont été évaluées selon la technique de Nannipieri et al. (1995). Cette technique est basée sur l'hydrolyse d'un substrat de paranitrophényl phosphate (pNPP) disodique par les enzymes secrétées par les microorganismes du sol. Celles-ci scindent la molécule (une molécule de paranitrophényl pour une molécule de phosphate) libérant le paranitrophényl, de couleur jaune en milieu alcalin. La coloration ainsi générée suit la loi de Beer-Lambert, où la densité optique est alors proportionnelle à la concentration enzymatique des échantillons de sol.

Deux classes de phosphatases sont distinguées selon leur pH optimum d'activité : les phosphatases alcaline et acide (Sall et al., 2002 ; Samuel et al., 2010). Les activités

phosphatases ont donc été mesurées à deux pH différents : pH 4 pour les acides et pH 9 pour les alcalines. Afin de réactiver la microflore 4g de sol de chaque échantillon de sol, tamisés à 2mm, sont mis en suspension dans 600µL d'eau distillée puis mis à incuber à 27°C pendant 48h. L'échantillon est alors additionné de 4ml d'eau distillée et agité magnétiquement afin d'obtenir une solution liquide. 100µL de solution sont alors prélevés et additionnés de 400µL de tampon Mac Ilvain à pH 4 (pour les acides), ou de 400µL de tampon Borate à pH 9 (pour les alcalines), puis de 100µL de substrat de pNPP à 1% et mis une heure à incuber à 37°C. Passé ce délais, 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,5N et 400 µl de NaOH 1N sont ajoutés à l'échantillon afin d'arrêter la réaction. Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 12000 g pendant 5 min. La lecture de l'activité enzymatique s'effectue au spectrophotomètre (Genesys 5, BIOIOCK) à une longueur d'ondes de 405 nm en prenant comme référence un témoin H<sub>2</sub>O. La densité optique (DO) réelle de chaque échantillon est donnée par la formule suivante:

$$DO_{\text{réelle}} = DO_{\text{essais}} - (DO_{\text{TS}} + DO_{\text{TE}})$$

Avec TE, un témoin sans sol, et TS un témoin sans substrat. Chaque échantillon est testé en triplicas.

L'activité enzymatique est ensuite exprimée en µg de phénol libéré par g de sol sec et par heure (avec 10µg de pNPP correspondant à 405nm). Le détail de l'ensemble des solutions et milieux réactionnels utilisés sont présentés en annexe 4.

### II.7.2/ ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS

Les propriétés physico-chimiques suivantes, des échantillons de topsoils, ont été déterminées par le laboratoire ActLabs (Activation laboratories, Canada): pF4.2, pH H<sub>2</sub>O, Carbone organique (Corg), azote total (Ntot), phosphore disponible (P Olsen), phosphore total (P), P disponible (Olsen), Capacité d'Échange Cationique (CE), bases échangeables : sodium (Na), potassium (K), calcium (Ca), magnésium (Mg), et métaux extractibles au DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) : Manganèse (Mn), Nickel (Ni), Fer (Fe), Chrome (Cr), Cobalt (Co), Magnésium (Mg).

### II.8/ ANALYSES STATISTIQUES

Nous avons utilisé plusieurs analyses statistiques multivariées pour comparer l'effet des différentes modalités sur les différentes variables mesurées. Pour l'ensemble des tests statistiques, les données ont subies une transformation racine carrée (Hellinger), avant d'être utilisées pour générer des matrices de dissimilarité Euclidienne. Les différences entre les modalités ont été testées en utilisant une analyse permutacionnelle de variance à modèle fixe (PERMANOVA) (Anderson, 2001) (PRIMER V7, Primer-E Ltd, 239 Plymouth, Royaume-Uni). En cas de différences significatives, des comparaisons PERMANOVA par paires ont été

utilisées pour identifier l'origine de ces différences. Trois niveaux de facteurs ont été définis afin de prendre en compte l'effet des différentes composantes de chaque modalité. Un facteur traitement, correspond aux outils traditionnels de la restauration écologique que sont le réensemencement du topsoil avec des graines de plantes endémiques appliquées par hydroseeding, l'épandage de topsoil frais en fine couche, et la plantation. Un facteur espèce, qui correspond au choix des espèces végétales utilisées dans cet essai. Un facteur inoculation distingue les espèces inoculées des non inoculées. Le modèle de PERMANOVA utilisé était alors le suivant

<b>Facteur</b>			
Name	Abbrev.	Type	Niveau
Espèce	Es	Fixed	6
Traitement	Tr	Fixed	10
Inoculation	In	Fixed	2

Enfin, nous avons testé l'existence de corrélation entre nos variables par l'utilisation de tests de corrélation de Spearman (PRIMER V7). Le tableau des corrélations obtenu est donné en annexe 5. La significativité statistique des tests retenue était  $p < 0,05$ .

### III. RESULTATS

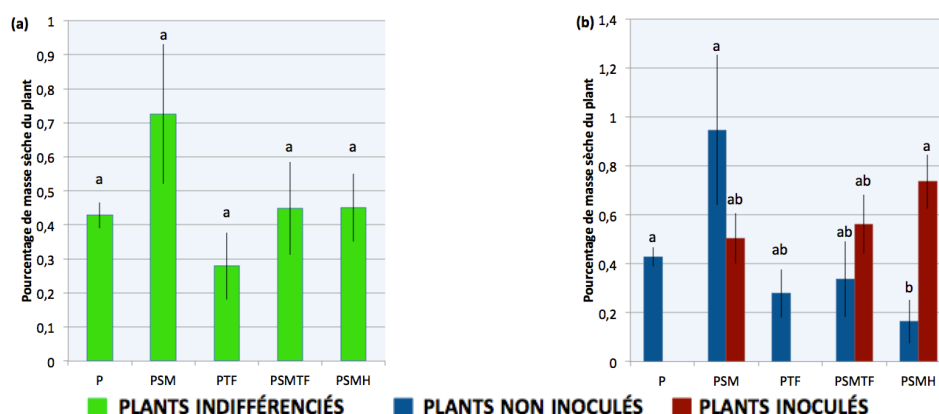
Il est à noter qu'en raison d'un taux de mortalité élevé des plants de *Cloezia artensis*, de façon indifférenciée sur l'ensemble des modalités, ceux-ci n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des résultats.

Le tableau des corrélations est donné en annexe 5.

#### III.1/ SUIVI DES INOCULATIONS

##### III.1.1/ RAPPORT PONDERAL DES SOUCHES BACTERIENNES DE *FRANKIA* SUR *GYMNOSTOMA POISSONIANUM*

L'abondance moyenne relative des nodules de *Frankia* par rapport à la masse sèche des plants est présentée en figure 4.



**FIGURE 4.** Abondance relative moyenne ( $\pm$ se) des nodules de *Frankia* chez *Gymnostoma poissonianum* (a) par modalités, (b) par espèces et par inoculation selon les modalités. (P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.

Il est tout d'abord à noter, que l'ensemble des plants de *Gymnostoma poissonianum* est porteur de nodules à *Frankia*, après 18 mois d'expérience. L'abondance relative moyenne des nodules de *Frankia* ne montre cependant aucune différence significative entre les différentes modalités, semi-inoculées et non inoculées (Fig 4a). L'abondance relative des nodules de *Frankia* varie de 0,73% ( $\pm 0,20$ se) de la masse sèche des plants de *Gymnostoma poissonianum* dans la modalité PSM, à 0,28% ( $\pm 0,10$  se) dans la modalité PTF. L'analyse permutative des variances (PERMANOVA) révèle toutefois un effet d'interaction entre les facteurs traitement et inoculation sur l'abondance moyenne des nodules de *Frankia* ( $p < 0,001$ ). Ce résultat est illustré par la figure 4b. Sur cette figure, on peut voir des variations de l'abondance relative des nodules de *Frankia* entre les plants inoculés et non inoculés au sein de chaque modalité. L'ensemble des plants inoculés en début d'expérience,

montre globalement des valeurs d'abondances relatives des nodules de *Frankia*, supérieures par rapport aux plants non inoculés supérieures des autres modalités. Les plants inoculés montrent des abondances relatives 1,67 et 4,48 fois plus importantes au sein des modalités PSMTF et PSMH respectivement, par rapport aux plants non inoculés. Cette différence n'apparaît significative qu'au sein de la modalité PSMH ( $p < 0,05$ ). Au sein de la modalité PSM, cette tendance est cependant inversée, les plants de *Gymnostoma poissonianum* inoculés montrent une abondance relative des nodules de *Frankia* 1,88 fois plus faible par rapport aux plants non inoculés.

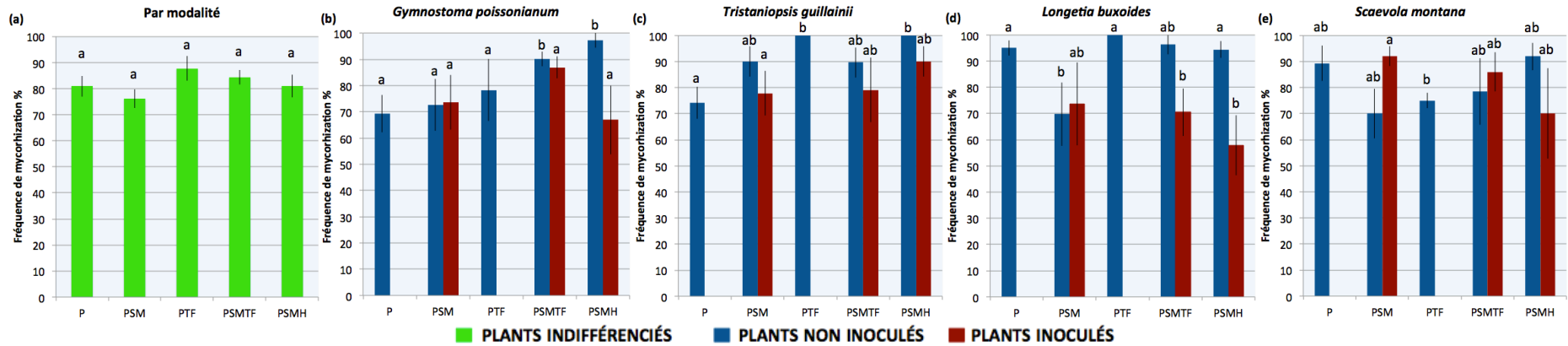
L'abondance relative des nodules de *Frankia* est apparue corrélée, positivement à la fréquence de mycorhization ( $p < 0,001$ ,  $\rho = 0,880$ ), négativement à l'intensité globale de mycorhization ( $p < 0,001$ ,  $\rho = -0,814$ ), et positivement à la teneur en azote foliaire ( $p < 0,001$ ,  $\rho = 0,477$ ).

### III.1.2/ TAUX D'ENDOMYCORHIZATION

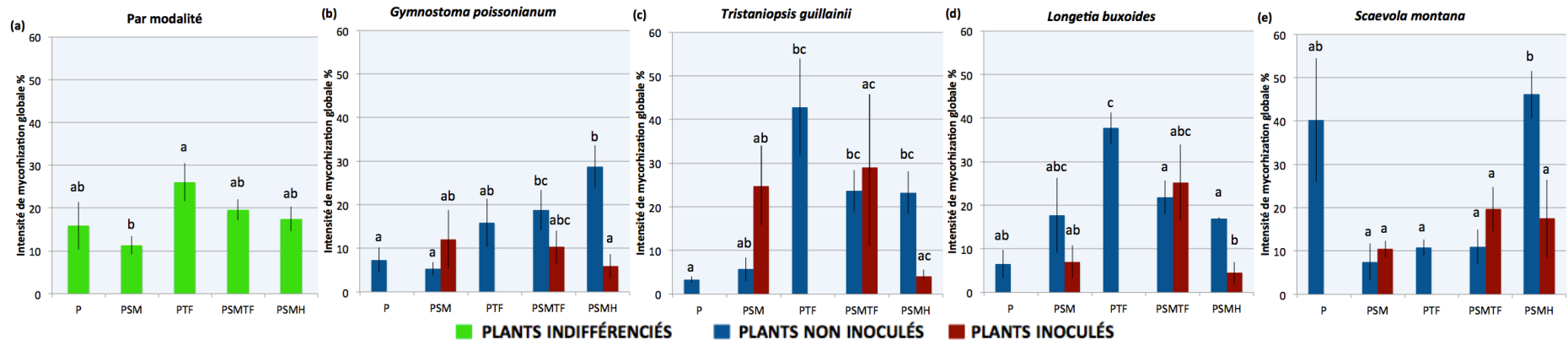
Les moyennes des fréquences et des intensités globales de mycorhization par modalité, et par espèce inoculée ou non, sont données dans les figures 5 et 6, respectivement.

De même que pour les nodules bactériens de *Frankia* décrit précédemment, il est à noter qu'après 18 mois d'expérience, l'ensemble des plants pour chaque modalité, présente une mycorhization de leur système racinaire (Fig. 5a, 5b, 5c, 5d, 5e). Globalement, les fréquences de mycorhization apparaissent élevées pour l'ensemble des modalités, variant entre 75% (modalité PSM) et 88% (modalité PTF). Les différences observées entre les modalités ne sont cependant pas significatives. Les PERMANOVA montrent que les fréquences moyennes de mycorhization varient à la fois en fonction des espèces et de l'inoculation ( $p < 0,01$ ) (Fig 5b, 5c, 5d, 5e). En observant, les réponses par espèces, on remarque que les plants inoculés en début d'expérience présentent majoritairement (plus de 66% des cas) des fréquences moyennes plus basses que les plants non-inoculés sur les mêmes modalités.

De même, l'observation des intensités globales de mycorhization après 18 mois, apparaissent élevées sur l'ensemble des modalités, variant entre 11,32% ( $\pm 2,17se$ ) et 26,08 ( $\pm 4,43se$ ), à nouveau, respectivement pour les modalités PSM, inoculées et les modalités PTF, = non inoculées (Fig. 6). La différence observée entre ces deux modalités apparaît ici, significative ( $p < 0,05$ ). L'analyse permutacionnelle des variances révèle également un effet espèce et un effet inoculation sur les taux d'intensité globaux observés entre les modalités ( $p < 0,01$ ). Dans 50% des cas, les plants inoculés en début d'expérience présentent des



**FIGURE 5.** Fréquence moyenne ( $\pm$ se) de mycorhization globale (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. (P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.



**FIGURE 6.** Intensité moyenne ( $\pm$ se) de mycorhization globale (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités (P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.



intensités moyennes de mycorhization plus basses que les plants non-inoculés sur les mêmes modalités (Fig 6b, 6c, 6d, 6e).

Fréquence et intensité de mycorhization sont apparues positivement corrélées ( $p < 0,001$ ,  $\rho = 0,460$ ). L'intensité globale de mycorhization s'est révélée également positivement corrélée à l'activité enzymatique phosphatase acide ( $p < 0,01$ ,  $\rho = 0,437$ ), ainsi qu'à la teneur en potassium des feuilles ( $\rho = 0,355$ ,  $p < 0,01$ ).

## III.2/ MESURE DE CROISSANCE

### III.2.1/ SUIVI DES GERMINATIONS DE LA BANQUE DE GRAINES

Un total de 25 germinations a été relevé sur l'ensemble des modalités après 18 mois sans qu'aucune tendance ne puisse être dégagée. L'ensemble des individus ayant germé appartenait tous à l'espèce *Machaerina deplanchei*. L'absence de différences entre les traitements avec et sans hydroseeding indique que l'ensemencement par hydroseeding n'a donné aucun résultat.

### III.2.2/ TAUX DE MORTALITE DES PLANTS

Les taux de mortalité moyens des plants par modalités, et par espèces inoculées ou non, selon les modalités sont présentés dans la figure 7. Globalement, toutes les modalités ont subi des pertes de plants (Fig. 7a). Les taux de mortalité moyens varient entre 13,6% ( $\pm 0,45se$ ) pour la modalité PSMTF, et 24,0% ( $\pm 2,07se$ ) pour la modalité PTF. La modalité PSMTF montre des taux de mortalité moyens significativement plus bas que les autres modalités ( $p < 0,01$ ). Les taux de mortalité observés sur la modalité PSMH sont également plus bas sans être toutefois significatifs par rapport aux autres modalités. Il est à noter que la modalité PSM, pourtant inoculée, présente un taux de mortalité moyen compris entre ceux des modalités non inoculées (23,2%  $\pm 1,01se$ ). Ce taux est significativement supérieur à celui observé pour les autres modalités comportant des plants inoculés ( $p < 0,01$ ). La PERMANOVA révèle que ces résultats globaux, dépendent d'un effet espèce et inoculation combiné ( $p < 0,05$ ). On observe (Fig. 7b, 7c, 7d, 7e) que, dans la majorité des cas, les plants inoculés montrent des taux de mortalité significativement inférieurs à ceux des plants non inoculés, des mêmes modalités. Sur la figure 9b, on peut voir que pour les plants inoculés de *Gymnostoma poissonianum*, aucun plant n'a été perdu, contre 8% de mortalité observée sur les plants non inoculés. Sur les figures 9c, et 9d, on constate que les plants inoculés de *Tristaniopsis guillainii* sur la modalité PSMTF, et les plants de *Longetia buxoides*, sur les modalités PSMTF et PSMH, montrent des taux de mortalité près de 3 fois plus faibles que les plants non inoculés. En revanche, on observe sur la figure 9c, un taux de mortalité

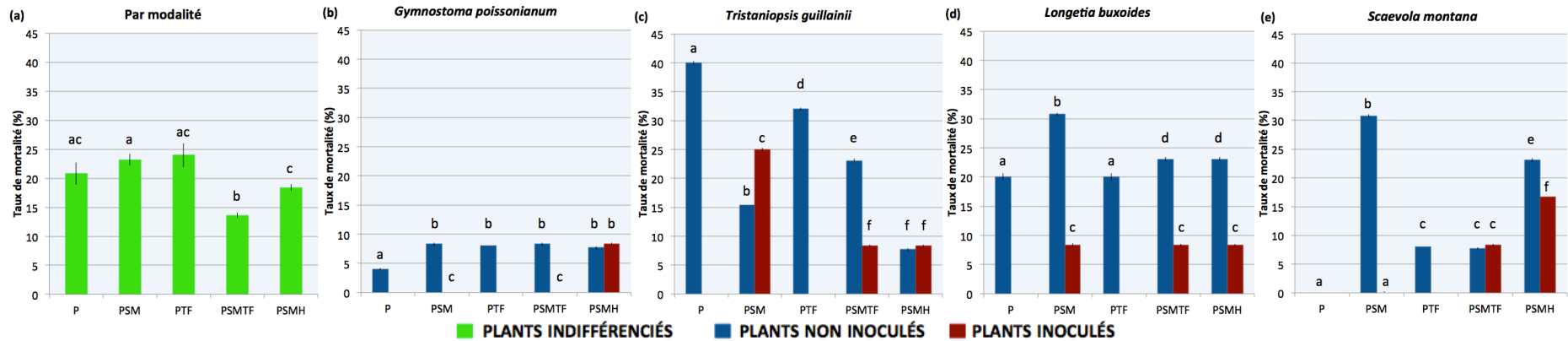
moyen 1,5 fois supérieur chez les plants inoculés par rapports aux plants non inoculés pour la modalité PSM.

En dépit de ces résultats, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les taux de mortalité et l'inoculation des plants. De même, les taux de mortalité n'ont été corrélés à aucune autre variable.

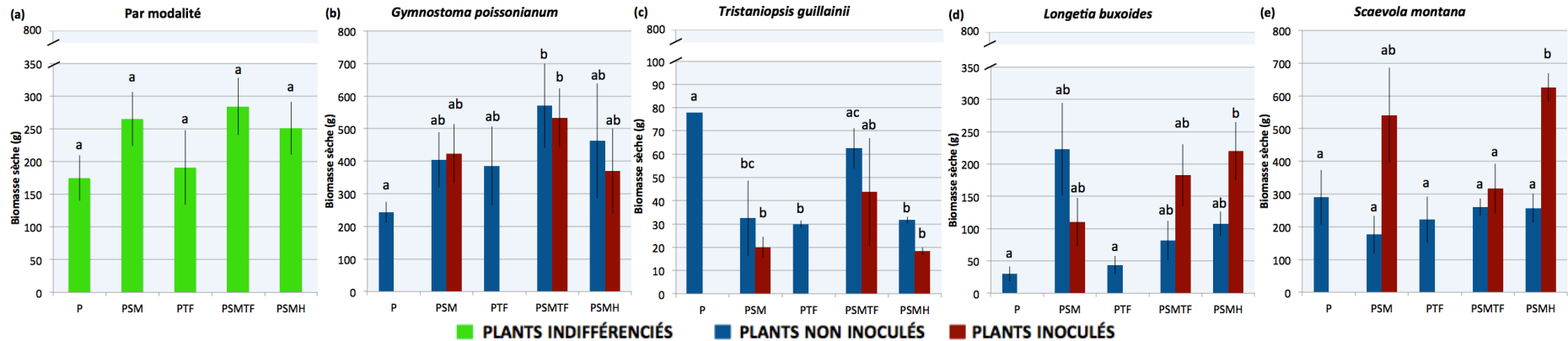
### III.2.3/ MESURE DE LA BIOMASSE SECHE DES PLANTS

Les moyennes des biomasses sèches par modalité, et par espèce inoculées ou non, sont présentées dans la figure 8. L'analyse permutational des variances n'a révélé aucune différence significative des moyennes globales de biomasses des plants entre les modalités (Fig. 8a), cependant des variations existent. Par rapport aux modalités non inoculées, les modalités inoculées montrent une augmentation globale moyenne de la biomasse sèche des plants de près de 57%. La PERMANOVA montre que la réponse globale des moyennes de biomasses dépend d'un effet combiné des facteurs espèces et inoculation ( $p < 0,01$ ) (Fig. 8b, 8c, 8d, 8e). Sur les figures 8b, 8c, 8d et 8e, on observe en effet que l'effet inoculation varie selon l'espèce. Chez l'espèce *Scaevola montana*, les plants inoculés montrent toujours une biomasse sèche supérieure aux plants non inoculés, notamment pour les modalités PSM et PSMTF (67% et 58% respectivement) (Fig. 8e). A l'inverse, les plants inoculés de l'espèce *Tristaniopsis guillainii*, présentent des biomasses sèches toujours inférieures à celles mesurées pour les plants non inoculés correspondants (Fig. 8c). Les espèces *Gymnostoma poissonianum*, et *Longetia buxoides* montrent quant à elle des tendances intermédiaires. Chez *Gymnostoma poissonianum*, la biomasse sèche des plants inoculés par rapport aux plants non inoculés, est plus élevée pour la modalité PSM, et plus basse pour les modalités PSMTF et PSMH (Fig. 8b). Ces observations sont inversées chez *Longetia buxoides*. Il est également à noter que si les variations des biomasses sèches entre les plants inoculés et non inoculés, chez *Gymnostoma poissonianum*, sont relativement peu élevées, des écarts plus importants existent pour l'espèce *Longetia buxoides*. Les moyennes des biomasses sèches des plants inoculés sont près de 125% supérieures à celles des plants non inoculés, pour les modalités PSMTF et PSMH, inversement elles sont près de 50% plus faibles pour la modalité PSM (Fig. 8d).

Les biomasses sèches observées sont corrélées négativement à la teneur en manganèse des feuilles ( $\rho = -0,511$ ,  $p < 0,01$ ), et au rapport Ca/Mg ( $\rho = -0,434$ ,  $p < 0,01$ ), et positivement aux teneurs en azote racinaire ( $\rho = 0,529$ ,  $p < 0,01$ ), au magnésium racinaire ( $\rho = 0,665$ ,  $p < 0,001$ ) et à l'ensemble des teneurs en éléments métalliques présents dans les racines (Fe :  $\rho = 0,825$  ; Ni :  $\rho = 0,795$  ; Mn :  $\rho = 0,777$  ; Cr :  $\rho = 0,840$  ; Co :  $\rho = 0,777$  ;  $p < 0,001$  dans chaque cas).



**FIGURE 7.** Taux de mortalité moyen ( $\pm$ se) (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités. (P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.



**FIGURE 8.** Biomasse sèche moyenne ( $\pm$ se) (a) par modalité (toutes espèces confondues), et (b, c, d, e) par espèce, inoculée ou non, selon les modalités (P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.

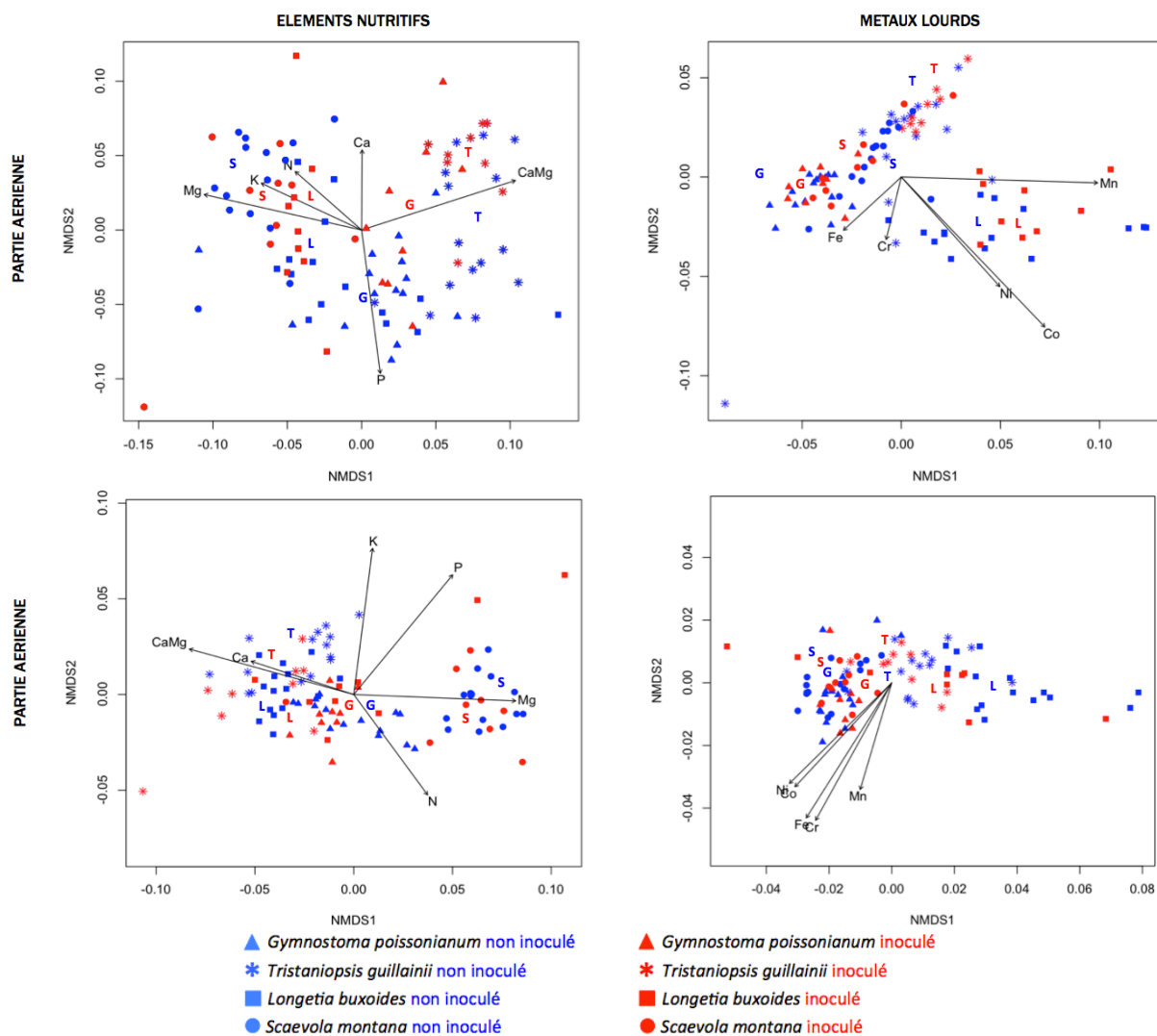
### III.2.4/ MESURE DES TENEURS EN ÉLÉMENTS DES PARTIES RACINAIRES ET AÉRIENNES

#### III.2.4.1/ ÉLÉMENTS NUTRITIFS

L'ensemble des valeurs pour les différents éléments et les différentes espèces végétales sont données en annexe 6. L'analyse permutative des variances n'a révélé aucun effet des modalités ou de l'inoculation sur la teneur en éléments nutritifs des parties aériennes ou foliaires des différentes espèces testées. Un effet espèce a toutefois pu être mis en évidence ( $p < 0,001$ ). Ces résultats sont illustrés par l'analyse non métrique multidimensionnelle en figure 9. Globalement, on peut voir sur cette figure que les espèces se répartissent selon un axe horizontal défini par le rapport Ca/Mg et les teneurs en magnésium. Dans les parties aériennes, l'espèce *Tristaniopsis guillainii* montre des moyennes de rapport Ca/mg significativement supérieures aux autres espèces, de l'ordre de 3,5 (contre 1-1,5 chez les autres espèces). *Scaevola montana* est l'espèce qui accumule le plus d'azote, de potassium et de magnésium, à la fois dans ses parties aériennes et racinaires, avec des valeurs proches de  $11\text{g.Kg}^{-1}$ . Ces teneurs sont significativement supérieures à celles observées chez l'espèce *Tristaniopsis guillainii* ( $p < 0,05$ ), où les teneurs en magnésium sont de l'ordre de  $3\text{g.kg}^{-1}$ . Les différences pour les autres éléments n'apparaissent pas significatives, que ce soit dans les parties aériennes ou racinaires.

#### III.2.4.2/ MÉTAUX LOURDS

L'ensemble des valeurs pour les différents éléments et les différentes espèces végétales sont données en annexe 7. De la même façon que pour les éléments nutritifs, l'analyse permutative des variances n'a révélé aucun effet des modalités ou de l'inoculation sur la teneur en éléments nutritifs des parties aériennes ou foliaires des différentes espèces testées. Cependant, un effet espèce, a de nouveau pu être mis en évidence ( $p < 0,001$ ). Cet effet est notamment visible chez l'espèce *Longetia buxoides* (Fig. 9), qui concentre dans ses parties aériennes des teneurs en métaux lourds plus élevées que les autres espèces :  $100\text{-}130\text{g.kg}^{-1}$  de nickel (contre  $30\text{-}60\text{g.kg}^{-1}$  chez les autres espèces),  $22\text{g.kg}^{-1}$  de cobalt (contre  $2\text{-}5\text{g.kg}^{-1}$  chez les autres espèces) et  $700\text{-}1000\text{g.kg}^{-1}$  de manganèse (contre  $400\text{g.kg}^{-1}$  chez les autres espèces).



**FIGURE 9.** Teneur moyenne en éléments nutritifs, et métaux lourds des parties aériennes et racinaires des plantes, par espèce et selon qu'elle est inoculée ou non.

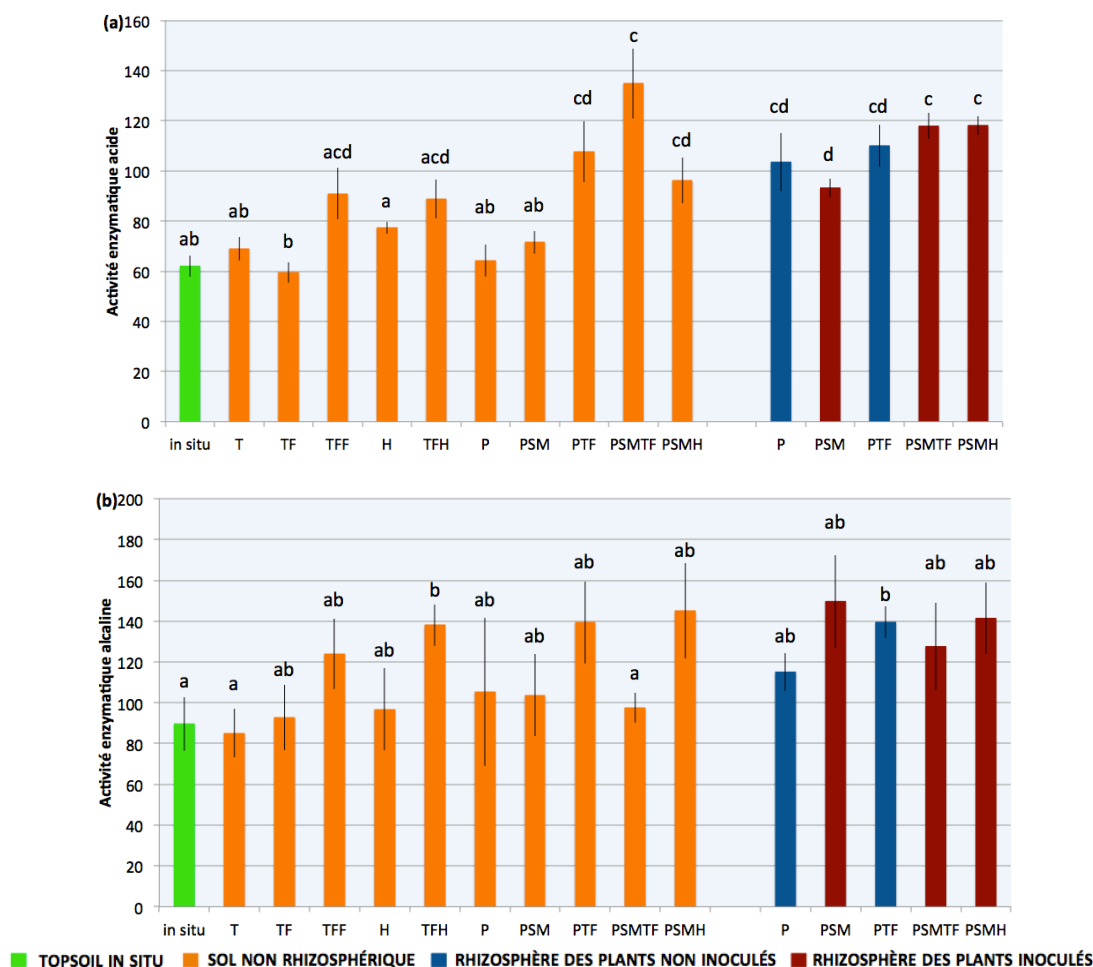
### III.3/ CARACTERISTIQUES EDAPHIQUES

#### III.3.1/ MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE DES SOLS

Les moyennes des activités phosphatases acides et alcalines par modalités, sont présentées dans les figures 10a et 10b respectivement.

Globalement, les activités phosphatases acides apparaissent plus élevées pour l'ensemble des modalités testées par rapport au témoin sol nu, à la fois pour les sols non rhizosphériques et rhizosphériques (à l'exception des sols non rhizosphériques des modalités TF et P). Les activités phosphatases acides sont significativement supérieures à celles du témoin dans l'ensemble des rhizosphères des modalités plantées, et pour les sols non rhizosphériques des modalités plantées PTF, PSMTF, PSMH ( $p < 0,001$ ). Ces différences

sont de l'ordre de 15% dans la rhizosphère des plants inoculés de la modalité PSM, à 80% dans le sol non rhizosphérique de la modalité PSMTF.



**FIGURE 10.** a) Activité phosphatase acide moyenne ( $\pm$ se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation (en  $\mu$ g de pNPP libéré par gramme de sol sec et par heure), et b) Activité phosphatase alcaline moyenne ( $\pm$ se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation (en  $\mu$ g de pNPP libéré par gramme de sol sec et par heure) (*in situ* : le topsoil du milieu naturel, T : témoin sol nu, TF : topsoil frais, TFF : topsoil frais + fertilisant, H : hydroseeding, TFH : topsoil frais + hydroseeding, P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.

L'effet des modalités est moins significatif à pH alcalin, où seul les sols non rhizosphériques de la modalité TFH et les sols rhizosphériques de la modalité PTF apparaissent significativement supérieurs du topsoil *in situ*. Ces deux modalités ne présentent cependant pas les moyennes les plus élevées. Celles-ci se retrouvent au sein des sols non rhizosphériques de la modalité PSMH, et dans la rhizosphère des plants inoculés de la modalité PSM.

Par comparaison, il est également à noter des valeurs d'activités enzymatiques moyennes, pour l'ensemble des modalités, plus fortes à pH alcalin, qu'à pH acide. L'analyse

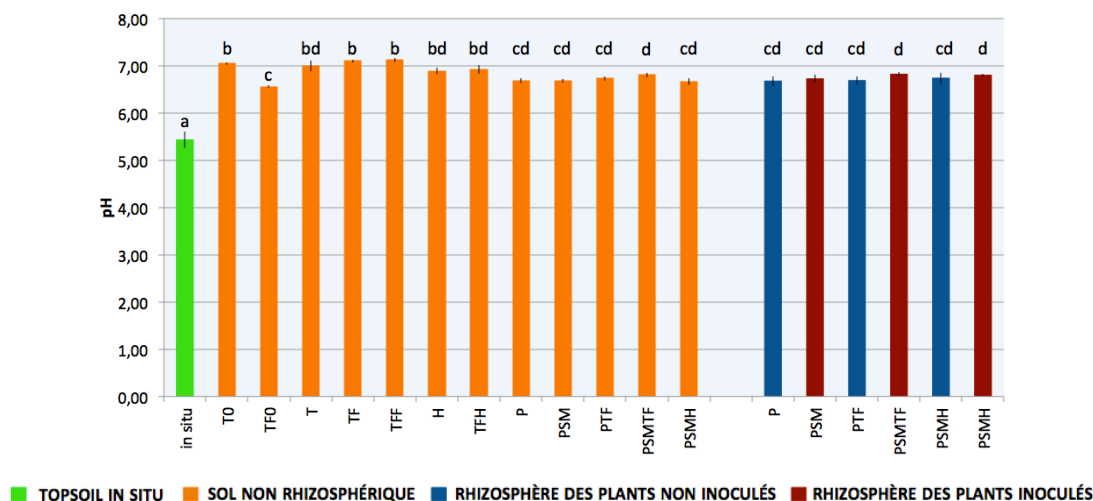
permutationnelle n'a révélé aucun autre effet, ou interaction sur les réponses mesurées d'activités enzymatiques phosphatase acide et alcaline. Seule une différence existe chez l'espèce *Longetia buxoides* à pH acide pour les modalités PSMTF et PSMH, qui montrent des activités enzymatiques significativement supérieures aux moyennes rhizosphérique des autres modalités. Les résultats des activités enzymatiques par espèces sont donnés à pH acide en annexe 8, et à pH alcalin en annexe 9.

L'analyse des corrélations de Spearman permettent de mettre en évidence une relation positive significative globale entre les activités enzymatiques observées à pH acide et l'intensité globale de mycorhization ( $\rho=0,437$ ,  $p<0,01$ ). L'activité phosphatase acide est également apparue corrélée positivement avec les teneurs en azote et calcium foliaire ( $p<0,01$ ,  $\rho= 0,528$ ) et  $\rho= 0,586$ , respectivement), et corrélée négativement aux teneurs en calcium des racines ( $p<0,01$ ,  $\rho=-0,509$ ). L'activité phosphatase alcaline montre une corrélation positive aux teneurs en calcium foliaire ( $p<0,01$ ,  $\rho=0,448$ ), et au pH du sol ( $p<0,01$ ,  $\rho=0,631$ ).

### III.3.2/ MESURE DU pH

Les moyennes de pH des différentes modalités, pour les sols non rhizosphériques et rhizosphériques sont données dans la figure 11. On constate que le topsoil dégradé (T0) présente au début de l'expérience un pH significativement supérieur de 1,5 unité (pH=7) par rapport au pH observé dans le topsoil *in situ* (pH=5,5) ( $p<0,01$ ). De même, le topsoil frais, présente à cette même date, un pH significativement supérieur au topsoil *in situ* d'une unité environ ( $p<0,01$ ). Après 18 mois d'expérience, l'ensemble des modalités plantées montre une diminution de leur moyenne de pH de 0,3 unité environ par rapport au topsoil dégradé à t0 (pH=6,7), mais les valeurs de pH atteintes restent significativement supérieures au topsoil *in situ* ( $p<0,01$ ). A l'inverse, le topsoil dégradé comme l'ensemble des modalités ne comportant pas de plantation, ne montre aucune évolution de pH par rapport au t0. La modalité topsoil frais après 18 mois montre même une augmentation de son pH pour atteindre une valeur de 7. Aucune interaction ou effet espèce et/ou inoculation n'a pu être mise en évidence.

Les variations de pH observées sont significativement corrélées au teneur en azote des parties aériennes et racinaires des plants ( $\rho=0,748$  et  $0,715$  respectivement,  $p<0,001$ ), aux teneurs en calcium des parties aériennes ( $\rho=0,671$ ,  $p<0,001$ ), aux teneurs en potassium des racines ( $\rho=0,715$ ,  $p<0,01$ ), ainsi qu'aux teneurs en calcium, magnésium, et fer des racines ( $\rho= -0,623$  ;  $0,693$  et  $0,590$  respectivement,  $p<0,001$ ). Enfin, le pH est aussi corrélé aux teneurs en carbone organique du sol ( $\rho=-0,811$ ,  $p<0,01$ ), et à l'activité enzymatique phosphatase alcaline ( $\rho=0,631$ ,  $p<0,01$ ).

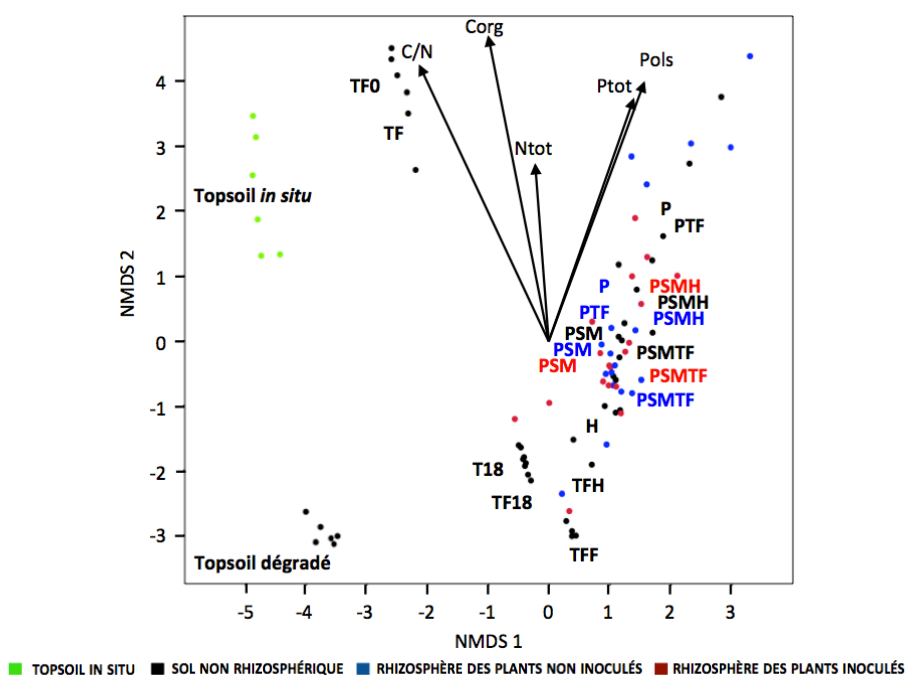


**FIGURE 11.** pH H<sub>2</sub>O moyen (±se) des sols non rhizosphériques et rhizosphériques par modalité et selon inoculation (*in situ* : le topsoil du milieu naturel, TO : topsoil dégradé au t0, TFO : topsoil frais au t0, T : témoin sol nu, TF : topsoil frais, TFF : topsoil frais + fertilisant, H : hydroseeding, TFH : topsoil frais + hydroseeding, P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Les modalités avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.

### III.3.3/ MESURE DU CARBONE ET DES ELEMENTS MINERAUX MAJEURS

L'analyse permutatonnelle des variances n'a révélé aucun effet des espèces ou de l'inoculation sur la teneur en carbone ou en éléments minéraux des sols, rhizosphériques ou non. Un effet modalité a toutefois pu être mis en évidence ( $p < 0,001$ ). Ces résultats sont illustrés par l'analyse non métrique multidimensionnelle en figure 12. A t0 le topsoil dégradé montre des valeurs significativement plus basses que le topsoil *in situ*, à la fois pour le carbone et l'ensemble des éléments minéraux. Après 18 mois, on constate que l'ensemble des modalités testées montre une augmentation des teneurs en carbone et en éléments minéraux par rapport au topsoil dégradé à t0. Ces différences n'apparaissent cependant significatives par rapport au t0 que pour les modalités comportant une plantation ( $p < 0,01$ ). Ces données sont présentées en détail en annexe 10. Toutefois, on constate une amélioration du topsoil qui ne rejoint pas qualitativement l'état du topsoil *in situ*. Cette divergence semble liée d'une part, au fort rapport C/N présent dans le topsoil *in situ* ( $28,88 \pm 2,19$ , contre des valeurs comprises entre 3 et 5 pour les autres modalités), et d'autre part aux teneurs élevées en phosphore des modalités testées par rapport au topsoil *in situ* (entre 10-16ppm pour les modalités testées, contre 0 pour le topsoil *in situ*).



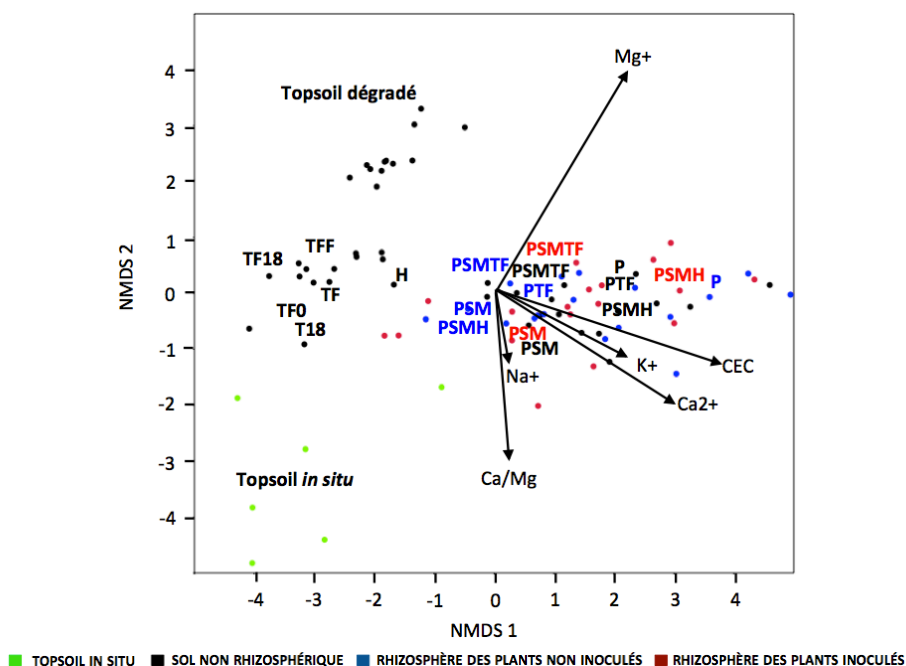


**FIGURE 12.** Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en carbone organique (Corg), azote total (Ntot), phosphore total (Ptot) et disponible (Pols), et du rapport C/N du topsoil par modalité. (*in situ* : le topsoil du milieu naturel, T0 : topsoil dégradé au t0, TFO : topsoil frais au t0, T : témoin sol nu, TF : topsoil frais, TFF : topsoil frais + fertilisant, H : hydroseeding, TFH : topsoil frais + hydroseeding, P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Stress-level= 0,02.

### III.3.3/ MESURE DE LA CAPACITE D'ÉCHANGE CATIONIQUE ET DES BASES ÉCHANGEABLES

L'ensemble des valeurs pour la capacité d'échange cationique et bases échangeables sont données en annexe 11. Comme précédemment, l'analyse permutationnelle des variances n'a révélé aucun effet des espèces ou de l'inoculation sur la teneur en carbone et en éléments nutritifs majeurs des sols rhizosphériques ou non. Cependant, un effet modalité a été mis en évidence ( $p < 0,001$ ). Ces résultats sont illustrés par l'analyse non métrique multidimensionnelle en figure 13. De même que pour les éléments minéraux, on constate après 18 mois, une amélioration de la capacité d'échange cationique et des teneurs en bases échangeables pour l'ensemble des modalités testées par rapport au topsoil dégradé. Deux groupes de modalités peuvent cependant être distingués. Un premier groupe constitué des modalités non plantées montre une évolution qui tend à se rapprocher du topsoil *in situ*. À l'inverse, un second groupe, constitué des modalités comportant une plantation montre une évolution parallèle. Les différences entre ces deux groupes sont liées à des teneurs en calcium et magnésium significativement plus élevées pour les modalités plantées. De même, on observe une différence entre ces deux groupes et

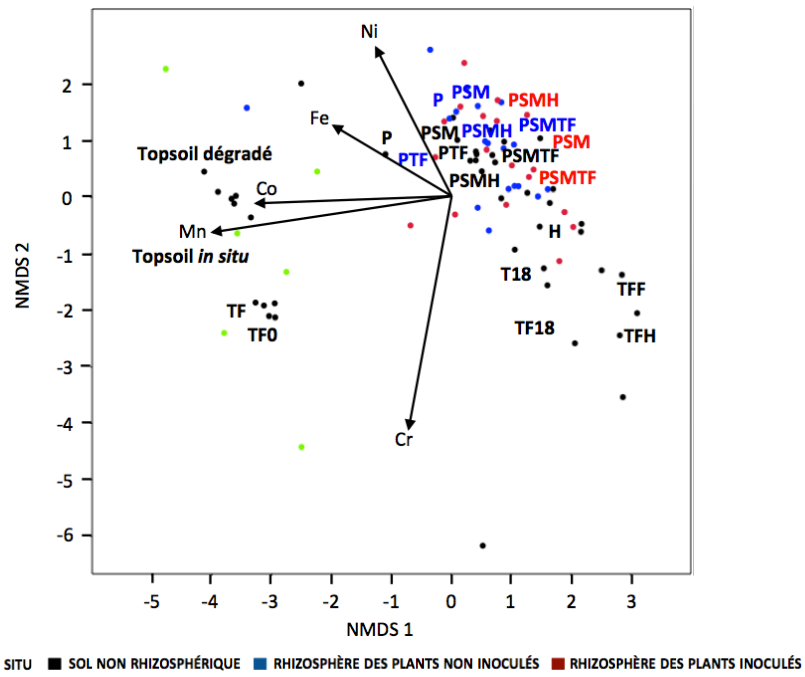
le topsoil *in situ*, principalement en raison de plus fortes teneurs en magnésium dans les sols des modalités testées (de l'ordre de 3-6meq%) contre 0,83meq% pour le topsoil *in situ*.



**FIGURE 13.** Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en bases échangeables et capacité d'échange cationique par modalité. (*in situ* : le topsoil du milieu naturel, T0 : topsoil dégradé au t0, TFO : topsoil frais au t0, T : témoin sol nu, TF : topsoil frais, TFF : topsoil frais + fertilisant, H : hydroseeding, TFH : topsoil frais + hydroseeding, P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Stress-level= 0,12.

### III.3.3/ METAUX LOURDS

L'ensemble des valeurs pour les différents éléments sont données en annexe 12. L'évolution des teneurs en métaux lourds dans les sols non rhizosphériques et rhizosphériques, par modalité est présentée en figure 14. A l'inverse des deux points précédents, on remarque sur cette figure que le topsoil dégradé ne présente pas, après stockage, d'évolution significative des teneurs en métaux lourds par rapport au topsoil *in situ*, les deux topsoils étant caractérisés par des teneurs élevées en Cobalt et Manganèse. Après 18 mois, on constate une diminution des teneurs pour l'ensemble des modalités testées par rapport au topsoil dégradé à t0. Néanmoins, deux groupes peuvent se distinguer, un premier groupe constitué des modalités plantées, et un second groupe constitué des modalités non plantées. On observe ainsi des baisses de fer de l'ordre de 50% au sein du premier groupe et de 70% pour le second groupe. Des baisses de près de 170% des teneurs en manganèse, et de 90% en cobalt sont observées pour les deux groupes. Par rapport au topsoil dégradé, les modalités plantées ne montrent pas d'évolution des teneurs en nickel, alors que celui-ci baisse de près de 50% au sein des modalités non plantées.



**FIGURE 14.** Ordination non métrique multidimensionnelle des teneurs en métaux lourds par modalité. (*in situ* : le topsoil du milieu naturel, T0 : topsoil dégradé au t0, TF0 : topsoil frais au t0, T : témoin sol nu, TF : topsoil frais, TFF : topsoil frais + fertilisant, H : hydroseeding, TFH : topsoil frais + hydroseeding, P : Plantation, PSM : Plantation semi-inoculée, PTF : Plantation + topsoil frais, PSMTF : Plantation semi-mycorhizé + topsoil frais, PSMH : Plantation semi-mycorhizée + hydroseeding). Stress-level= 0,06.

## IV/ DISCUSSION

Un premier constat global concernant les effets des diverses modalités testées est l'absence de différences significatives nettes entre les modalités pour la plupart des paramètres mesurés. Ce constat peut être expliqué par plusieurs effets complémentaires : i) Comme dans toute expérimentation sur terrain, les effets des modalités sont tamponnés par la complexité des interactions qui se manifestent en conditions non contrôlées. (Fluctuations d'humidité, de températures, hétérogénéité du sol, etc.) ; ii) L'effet « inoculation » des plants a été plus ou moins neutralisé par le fait que ceux-ci étaient déjà plus ou moins mycorhizés au départ et par la présence de spores mycorhiziennes, même en petite quantité, dans le topsoil dégradé ; iii) Enfin la modalité hydroseeding n'a produit aucun effet (pas de germinations supplémentaires de graines). Malgré ces limites, un certain nombre d'effets intéressants sont à relever.

### IV.1/ EFFET DES MODALITES TESTEES SUR LES CARACTERISTIQUES DU SOL

Globalement, l'ensemble des modalités testées dans cet essai montre une amélioration significative des différentes caractéristiques suivies, par rapport au topsoil dégradé. Au t0, le topsoil dégradé présentait notamment par rapport au topsoil *in situ*, des valeurs de pH plus importantes, et des teneurs en carbone, en éléments nutritifs essentiels, en capacité d'échange cationique et en bases échangeables plus faibles. Les activités phosphatases ainsi que les teneurs en métaux lourds étaient toutefois proches des valeurs observées *in situ*. Après 18 mois, il a pu être constaté pour l'ensemble des modalités une augmentation significative des teneurs en éléments nutritifs et une tendance à une diminution des valeurs de pH. De plus, une augmentation des activités phosphatases et une diminution des teneurs en éléments métalliques ont également été enregistrées. Ces résultats soulignent l'efficacité des différentes modalités testées à revitaliser un topsoil, en favorisant le retour des conditions édaphiques plus aptes à soutenir l'installation d'un couvert végétal et ceci malgré les faiblesses expérimentales soulignées ci-dessus.

Deux groupes de modalités, selon les réponses mesurées, peuvent être distingués. Ces deux groupes distinguent d'une part les modalités comportant une plantation (modalité plantation, plantation semi-mycorhizée, plantation + topsoil frais, plantation semi-mycorhizée + topsoil frais, plantation semi-mycorhizée + hydroseeding), d'autre part, les modalités non plantées (modalités topsoil frais, topsoil frais + fertilisant, hydroseeding, topsoil frais + hydroseeding). Les valeurs des paramètres édaphiques mesurés pour les modalités plantées se sont révélées être supérieures, aux valeurs enregistrées pour les modalités non

plantées. Pour l'ensemble des paramètres édaphiques testées, les modalités plantées se révèlent supérieures aux modalités non plantées pour la revitalisation d'un topsoil dégradé. Les modalités plantées ont montré à la fois des activités enzymatiques globalement supérieures aux autres modalités, mais également des teneurs significativement supérieures en éléments nutritifs, capacité d'échange cationique, bases échangeables, ainsi que des valeurs significativement plus basses de pH, et de métaux lourds.

Cet effet de la plantation serait dû d'abord à un apport de matière organique plus important au sein de ces modalités, par rapport aux modalités non plantées. Les modalités plantées comprennent en effet l'application d'un paillage organique, ainsi que de compost (2,5kg par plant). Cet apport de matière organique additionnel peut expliquer les plus fortes teneurs en éléments minéraux constatés, du fait d'une plus forte minéralisation, mais aussi la stimulation des activités enzymatiques des sols de ces modalités, ainsi que la diminution du pH. La matière organique est en effet connue pour augmenter la capacité d'échange cationique des sols (Soltner, 2003), et augmenter leur pouvoir tampon, ce qui permet de diminuer la biodisponibilité des métaux lourds (Balasdent, 1996), mais aussi de diminuer le pH des sols (FIFA, 2006). Ces résultats tendent à confirmer l'intérêt des amendements organiques pour la revitalisation des topsoils dégradés.

Par ailleurs, l'effet des plantes elles-mêmes peut expliquer les différences observées entre les modalités plantées et non plantées. Les exsudats racinaires des plants, et plus généralement la rhizodéposition, favorisent le développement de la microflore et la minéralisation de la matière organique (Gobat et al. 2010). La présence de champignons mycorhiziens à arbuscules actifs en présence de plantes, présence relevée sur l'ensemble des espèces végétales testées, et corrélée à l'activité phosphatases, peut aussi expliquer l'amélioration plus importante des topsoils plantés. Nos résultats témoignent aussi de la fixation de métaux lourds dans les parties racinaires et foliaires des plants, favorisant d'avantage la diminution des teneurs en métaux lourds des sols.

Concernant le non développement d'un couvert végétal sur les modalités non plantées, il semble qu'un problème technique se soit produit au moment de l'hydroseeding, ce qui explique l'absence totale de différence entre les parcelles hydroseedées et les autres, en terme de quantités et de diversité des plantules dénombrées.

#### **IV.2/ EFFET DE L'INOCULATION**

Au sein des modalités plantées, aucun effet inoculation n'a été mis en évidence sur l'amélioration des caractéristiques édaphiques par rapport au topsoil dégradé. Comme nous l'avons montré, toutes les espèces végétales de l'essai ont montré, après 18 mois, la présence d'endomycorhizes dans leurs systèmes racinaires. Ces résultats peuvent alors expliquer l'absence de différences observées.

Bien qu'un des objectifs de cette étude était d'évaluer l'intérêt de la mycorhization des plants en pépinière et de vérifier si des plants mycorhizés en pépinières permettraient aux d'autres plants voisins d'être colonisés à leur tour par les symbiotes, il est difficile de déterminer l'origine de la mycorhization constatée. Cette dernière peut avoir trois origines. La première proviendrait de la persistance, voire du développement, sur le terrain des mycorhizations constatées en pépinière. Cette hypothèse est cependant peut probable. Les plants ont été élevés sur terreau, il est donc fort probable que les souches observées avant inoculations soit exogènes aux substrats ultramafiques. Or, Amir et al. (2008), Amir & Ducouso (2010) rapportent de tels souches ne persistent pas, sur le terrain, face aux souches natives mieux adaptées aux conditions des terrains ultramafiques, en raison de phénomènes de compétition. La seconde hypothèse serait une mycorhization par les symbiotes issus des inoculations en début d'expérience. Les travaux de Malcova et al. (2001), Sykorova et al. (2003), et Puschel et al. (2008) montrent en effet que les réseaux mycéliens de plants inoculés tendent à mycorhizer plus rapidement les plants voisins que les spores libres du sol. Cependant, les taux de mycorhization plus faibles observées en fin d'expérience chez les plants inoculés par rapport aux plants non inoculés tendent à réfuter cette hypothèse. Enfin, une dernière hypothèse serait, comme le propose Johnson et al. (1991), une mycorhization des plants non inoculés par les spores endomycorhiziennes présentes dans le topsoil dégradé au t<sub>0</sub>. Il apparaît ainsi nécessaires que des études complémentaires mettant en œuvre des outils moléculaires, soient mises en oeuvre pour clarifier l'origine du développement, la synergie et/ou la concurrence des symbiotes fongiques dans la rhizosphère des plantes de cet essai.

Il est cependant important de noter que les plants inoculés ont montré des taux de mortalité significativement plus bas, que les plants non inoculés. De même, l'activité phosphatase a pu être corrélée aux intensités de mycorhization, et les teneurs en azote dans les plants, à l'abondance de nodules bactériens à *Frankia*. Ces résultats soulignent l'importance de l'inoculation pour les travaux de revitalisation des topsoils dégradés.

## CONCLUSION

Cet essai a permis de mettre en évidence l'efficacité des différentes modalités testées pour la revitalisation des caractéristiques édaphiques d'un topsoil dégradé. Les modalités plantées ont montré un effet significativement supérieur, par rapport aux modalités non plantées sur la mise en place de conditions de fertilité plus favorables à l'installation et au développement d'un couvert végétal secondaire qui pourrait intervenir par la suite. Les modalités plantées ne montrant pas de différences significatives entre elles, toutes peuvent être considérées comme favorables à la revitalisation.

Nos résultats ont également mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'amendements organiques, favorisant une augmentation des teneurs en éléments nutritifs, capacité d'échange cationique, bases échangeables et amélioration du pH des sols. Aussi, nous suggérons, que ceux ci soient utilisés autant que possible, constituant une alternative à l'utilisation des boues de STEP, d'avantage préconisé à ce jour.

Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence d'effets significatifs de l'inoculation sur la revitalisation du topsoil, en raison notamment d'une mycorhization de l'ensemble des plants après 18 mois d'expérience, l'avantage de l'utilisation de plants mycorhizés pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés à été maintes fois prouvé et doit également être mise en œuvre autant que possible. C'est notamment le cas pour une expérimentation sur un topsoil dégradé montrant des effets très importants de la mycorhization en pépinière de *Carpolepis laurifolia*. (Amir et al 2014).

Enfin, bien que nous ayons montré la capacité des différentes modalités à revitaliser un topsoil, il apparaît que celle-ci dépasse les objectifs qualitatifs correspondant au topsoil *in situ*. Les résultats obtenus pourraient alors entraîner un remplacement de l'écosystème originel, plutôt qu'une restauration de celui-ci. Nous suggérons donc qu'un suivi à plus long terme permettra d'infirmer ou de confirmer cette tendance, et le cas échéant de mettre en place des outils adaptés aux objectifs de restauration. De plus, la présence de spores de champignons endomycorhiziens, ainsi que l'utilisation de plants présentant déjà une mycorhization avant expérimentation ont compliqué l'interprétation des résultats. Il faudrait donc envisager de pouvoir reproduire cet essai en veillant à un meilleur contrôle de ces paramètres. L'utilisation d'outils moléculaires notamment, permettrait de suivre la dynamique de mycorhization des espèces végétales. Enfin, l'absence de germinations issues de l'hydroseeding, laisse à supposer qu'un problème technique ait pu se produire. Aussi d'autres essais mettant en œuvre l'ensemencement hydraulique devrait être menés afin d'améliorer l'usage de cette technique pour les travaux de revitalisation.

### ANNEXE DU CHAPITRE 3

#### Essai de revitalisation d'un topsoil dégradé pendant stockage

**ANNEXE 1.** Protocoles d'évaluation des capacités germinatives des lots de graines avant leur utilisation en ensemencement hydraulique pour les espèces *Machaerina deplanchei*, *Joinvillea plicata*, *Cloezia artensis*, *Codia montana*, *Costularia comosa*, *Scaevola montana*, et *Schoenus tendo*. (Source IAC)

Les semences des espèces *Codia montana*, *Baumea deplanchei* et *Joinvillea plicata* sont dormantes et ont donc fait l'objet d'un pré-traitement consistant à lever les inhibitions avant expérience afin d'accélérer le processus de germination. Ces pré-traitements se basent sur les données de germination et de dormances de ces espèces, mises en évidence par l'IAC (L'Huillier et al. 2010).

- Les semences de *Codia montana* ont été mises à tremper la veille de l'expérience, sous agitation pendant 24 heures.
- Les semences de *Baumea deplanchei* ont été soumises à une scarification au papier de verre.
- Les semences de *Joinvillea plicata* ont été immergées 24 heures dans une solution de GA3 à 0,3g/L.

Pour chaque espèce, 4 boîtes de Pétri, tapissées de coton hygroscopique ont été préparées, contenant chacune 25 graines. L'ensemble des boîtes est ensuite placé dans une enceinte de germination ayant une plage de température comprise alternant des températures de 15 et 25°C, selon des cycles d'éclairages jour-nuit (Phytotron). Chaque boîte reçoit un arrosage manuel, deux fois par semaine, afin de maintenir une humidité constamment élevée.

Dans le cadre de cette thèse, l'expérience a été conduite 4 mois.



**ANNEXE 2. Descriptif des lots de graines de chaque espèce, et des proportions utilisées en hydroseeding.**

Espèce	<i>Cloezia artensis</i>	<i>Schoenus tendo</i>	<i>Costularia nervosa</i>	<i>Machaerina deplancheii</i>	<i>Codia montana (lot 1)</i>	<i>Codia montana (lot 2)</i>	<i>Joinvillea plicata (lot 1)</i>	<i>Joinvillea plicata (lot 2)</i>	<i>Scaevolo montana (lot 1)</i>	<i>Scaevolo montana (lot 2)</i>
date de récolte	19.5.11	6.4.12	6.4.12	28.1.11	19.1.12	19.1.12	24.6.9	8.2.10	28.5.12	20.6.12
Récolteur	Mettesio (poya)	KNS		Fernand Malouna (Poya-Poum)			Claudia Malouna (Poya-Pouebout)		KNS	
Masse disponible (g)	12	7	83	300	600	600	500	400	800	935
masse de 100 graines ou fruits	0	0	0	1	0	0	0	0	100 noyaux = 2g = 200graines	
nombre de graines ou fruits disponible	29175	43750	30844	60000	2000000	2000000	166667	133333	80000	93500
Pourcentage de germination obtenue lors des tests	15	65	15	15	10	10	10	10	10	10
Quantité germante estimée pour le lot	4376	28438	4627	9000	200000	200000	16667	13333	8000	9350
Pourcentage de survie estimée pour le lot	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Quantité survivante estimée pour le lot	438	2844	463	900	20000	20000	1667	1333	800	935
Masse introduite dans l'hydroseeder (en g)	8	5	54	100	45	45	60	40	150	150
Equivalents graines ou fruits	20000	28438	20000	20000	150000	150000	20000	13333	15000	15000
Quantité germée estimée sur terrain	3000	18484	3000	3000	15000	15000	2000	1333	1500	1500
Quantité survivante estimée sur terrain	300	1848	300	300	1500	1500	200	133	150	150

Total graines hydroseeder	6382
Nombre de graines, fruits estimé par m2 après un an	14

**ANNEXE 3. Protocoles de production des spores AMF par culture trap sur sorgho. (Source LIVE)****Matériel et solutions :****\* Préparation des plants de sorgho**

Les graines de sorgho sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 4% (v/v) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite soigneusement rincées à l'eau distillée stérile. Les graines sont mises à germer dans de la vermiculite préalablement désinfectée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Le semis est effectué dans une mini-serre. Le bac est placé à la lumière artificielle (luminosité : 5000 lux) pendant 14h par jour. Et arrosé à l'eau du robinet.

**\* Préparation du substrat de culture**

Désinfecter à l'autoclave un mélange humidifié : sol (d'ici) / terreau (10% en poids) ; 1h à 121°C, 2 fois à 24h d'intervalle. Prévoir pour chaque échantillon 2 pots de culture (500mL). Les substrats sont ainsi vierges de tout parasites susceptibles de nuire à la germination des graines et de polluer le substrat et les spores.

**Inoculation avec des mycorhizes d'un sol :****\* Préparation de l'inoculum**

4 à 5g de sol, récolté contenant les racines de la plante hôte, est broyé. (mortier-pilon).

**\* Inoculation des spores sur les plants de sorgho**

Prendre un plant de sorgho, le transplanter dans le pot, contenant le substrat désinfecté, en mettant ses racines en contact avec l'inoculum. Disposer les pots à la serre.

**Inoculation avec les mycorhizes de la collection :****\* Préparation de l'inoculum**

Les spores de mycorhizes sont récupérées des sols secs (en sacs), et triées. Elles sont mises en suspension, on peut calculer la densité pour inoculer un nombre précis de spores ;

**\* Inoculation des spores sur les plants de sorgho**

Repiquer un plant de sorgho en versant la suspension de spores le long de sa racine.

Tous les ustensiles utilisés font l'objet d'un rinçage eau et éthanol 70° entre les différents échantillons.

**ANNEXE 4. Préparation des solutions pour le dosage de l'activité enzymatique phosphatase.**

**Solution A à 0,1M (1l) = Acide citrique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>O)**

- 21,04 g dans 1 l d'eau distillée
- 

**Solution B (1l) = Phosphate de sodium dibasique (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O)**

- 71,7 g dans 1 l d'eau distillée

**Tampon Mac Ilvain à pH 4 (250ml)**

- 30,7 ml de solution A + 19,3 ml de solution B
- Ajustage du pH avec HCl ou NaOH

**Tampon Borate à pH 9 (1l)**

- 2,86 g de di Na-tétraborate (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10H<sub>2</sub>O) dans 75 ml d'eau distillée
- ajustage du pH avec NaOH
- Compléter à 1 l avec de l'eau distillée

**Substrat para-Nitrophenylphosphate (pNPP) (80ml)**

- 0,08 g dans 10 ml d'eau distillée (0,8%)

**Référence** : P4744 SIGMA Phosphatase substrate

**Hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N (500ml)**

- 20 g dans 500 ml d'eau distillée

**Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 0,5 N (500ml)**

- 27,75 g dans 500 ml

**ANNEXE 5.** Tableau des corrélations de Spearman pour l'ensemble des variables de l'étude. Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0.05$ . Pour une meilleure lisibilité les résultats ont été scindés en 4 tableau selon le plan suivant :

	Mesure de croissance	Suivi Inoculation	Teneur en éléments aériens	Teneur en élément racinaires	Caractéristiques édaphiques
Mesure de croissance	Annexe 5.a				
Suivi Inoculation					
Teneur en éléments aériens					
Teneur en élément racinaires	Annexe 5.b			Annexe 5.C	
Caractéristiques édaphiques					Annexe 5.d

**ANNEXE 5a.**

		Croissance				Inoculation				Teneur en éléments aériens											
		Biomasse Fraîche (g)	Biomasse Sèche (g)	Teneur en eau (%)	Taux de mortalité	FREQUENCE F(%)	INTENSITE M(%)	INTENSITE GLOBAL m(%)	% de nodules de biomasse sèche	N (mg/l)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Fe (g/kg)	Ni (g/kg)	Mn (g/kg)	Cr (g/kg)	Co (g/kg)	Ca/Mg	
Croissance	Biomasse Fraîche (g)																				
	Biomasse Sèche (g)	<b>0,946</b>																			
	Teneur en eau (%)	<b>0,452</b>	0,215																		
	Taux de mortalité	-0,523	-0,517	-0,190																	
Inoculation	FREQUENCE F(%)	-0,256	-0,301	0,054	0,0246																
	INTENSITE M(%)	0,011	-0,048	0,256	0,098	<b>0,585</b>															
	INTENSITE GLOBAL m(%)	0,041	-0,039	0,313	0,13608	<b>0,460</b>	<b>0,976</b>														
	% de nodules de biomasse sèche	0,214	0,357	0,666	0,0608	<b>0,880</b>	<b>0,904</b>	<b>-0,814</b>													
Teneur en éléments aériens	N (mg/l)	0,176	0,051	<b>0,452</b>	0,313	-0,125	0,163	0,221	<b>0,476</b>												
	P (g/kg)	-0,342	-0,225	<b>-0,389</b>	0,035	0,234	0,125	0,050	0,642	-0,168											
	K (g/kg)	0,183	-0,005	<b>0,608</b>	0,200	-0,060	0,278	<b>0,355</b>	0	<b>0,547</b>	-0,195										
	Ca (g/kg)	-0,131	-0,267	0,162	-0,150	-0,014	0,056	0,085	0,619	<b>0,438</b>	0,016	<b>0,469</b>									
	Mg (g/kg)	<b>0,482</b>	<b>0,365</b>	<b>0,385</b>	-0,038	-0,167	-0,043	0,014	-0,166	<b>0,473</b>	-0,004	<b>0,525</b>	0,307								
	Fe (g/kg)	0,290	0,162	<b>0,456</b>	0,245	-0,145	-0,119	-0,080	-0,071	<b>0,423</b>	-0,002	<b>0,506</b>	<b>0,423</b>	<b>0,538</b>							
	Ni (g/kg)	0,048	-0,015	0,022	0,544	-0,214	-0,061	-0,015	-0,119	<b>0,404</b>	0,313	<b>0,371</b>	<b>0,419</b>	<b>0,722</b>	<b>0,548</b>						
	Mn (g/kg)	<b>-0,427</b>	<b>-0,511</b>	-0,123	0,080	0,002	0,187	0,212	-0,166	0,222	0,236	0,291	<b>0,562</b>	0,203	0,018	<b>0,645</b>					
	Cr (g/kg)	0,155	0,045	0,302	0,426	-0,177	-0,099	-0,049	-0,261	<b>0,429</b>	0,148	<b>0,489</b>	<b>0,423</b>	<b>0,659</b>	<b>0,892</b>	<b>0,819</b>	0,302				
	Co (g/kg)	<b>-0,352</b>	<b>-0,389</b>	-0,183	0,245	-0,028	-0,144	-0,131	-0,287	0,236	<b>0,447</b>	0,230	0,336	<b>0,474</b>	<b>0,358</b>	<b>0,847</b>	<b>0,686</b>	<b>0,652</b>			
Ca/Mg	<b>-0,513</b>	<b>-0,434</b>	-0,348	-0,412	0,139	0,055	0,020	-0,047	-0,293	0,066	<b>-0,428</b>	0,128	<b>-0,855</b>	<b>-0,353</b>	<b>-0,534</b>	-0,023	<b>-0,457</b>	-0,345			

**ANNEXE 5b.**

		Croissance				Inoculation				Teneur en éléments aériens										
		Biomasse Fraîche (g)	Biomasse Sèche (g)	Teneur en eau (%)	Taux de mortalité	FREQUENCE F(%)	INTENSITE M(%)	INTENSITE GLOBAL m(%)	% de nodules de biomasse sèche de nodules de biomasse sèche	N (mg/l)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Fe (g/kg)	Ni (g/kg)	Mn (g/kg)	Cr (g/kg)	Co (g/kg)	Ca/Mg
Te	N (mg/l)	<b>0,622</b>	<b>0,529</b>	<b>0,458</b>	0,304	-0,139	0,083	0,129	0,190	<b>0,458</b>	-0,342	<b>0,424</b>	0,155	<b>0,365</b>	<b>0,357</b>	0,014	-0,308	0,194	-0,240	-0,308
	P (g/kg)	-0,276	-0,314	-0,053	0,067	0,170	0,065	0,029	0,190	<b>0,413</b>	<b>0,377</b>	0,286	<b>0,535</b>	0,159	0,305	<b>0,513</b>	<b>0,510</b>	<b>0,437</b>	<b>0,501</b>	0,039
	K (g/kg)	0,284	0,102	<b>0,616</b>	0,334	0,044	0,136	0,147	-0,095	<b>0,604</b>	-0,182	<b>0,591</b>	<b>0,463</b>	<b>0,569</b>	<b>0,662</b>	<b>0,466</b>	0,210	<b>0,624</b>	0,242	<b>-0,378</b>
	Ca (g/kg)	-0,349	-0,247	<b>-0,361</b>	-0,394	-0,038	-0,044	-0,072	0,642	<b>-0,352</b>	<b>0,372</b>	<b>-0,427</b>	-0,144	<b>-0,413</b>	-0,146	0,039	0,194	-0,013	0,150	<b>0,416</b>
	Mg (g/kg)	<b>0,758</b>	<b>0,665</b>	<b>0,536</b>	-0,515	-0,220	-0,064	-0,029	0,166	<b>0,441</b>	-0,195	<b>0,391</b>	0,038	<b>0,750</b>	<b>0,501</b>	<b>0,382</b>	-0,211	<b>0,504</b>	0,044	<b>-0,681</b>
	Fe (g/kg)	<b>0,893</b>	<b>0,825</b>	<b>0,506</b>	-0,441	-0,227	-0,065	-0,028	0,261	0,334	-0,287	0,320	-0,020	<b>0,651</b>	<b>0,480</b>	0,210	<b>-0,387</b>	<b>0,374</b>	-0,140	<b>-0,626</b>
	Ni (g/kg)	<b>0,877</b>	<b>0,795</b>	<b>0,549</b>	-0,361	-0,270	-0,063	-0,018	0,214	<b>0,359</b>	-0,280	<b>0,377</b>	-0,022	<b>0,663</b>	<b>0,487</b>	0,250	-0,336	<b>0,398</b>	-0,106	<b>-0,636</b>
	Mn (g/kg)	<b>0,851</b>	<b>0,777</b>	<b>0,463</b>	-0,495	-0,247	0,016	0,080	0,452	<b>0,391</b>	-0,220	<b>0,371</b>	0,081	<b>0,742</b>	<b>0,439</b>	<b>0,353</b>	-0,205	<b>0,424</b>	0,011	<b>-0,650</b>
	Cr (g/kg)	<b>0,902</b>	<b>0,840</b>	<b>0,498</b>	-0,437	-0,211	-0,043	-0,009	0,309	0,332	-0,271	0,328	-0,025	<b>0,668</b>	<b>0,442</b>	0,203	<b>-0,380</b>	0,340	-0,155	<b>-0,655</b>
	Co (g/kg)	<b>0,859</b>	<b>0,777</b>	<b>0,516</b>	0,487	-0,278	-0,080	-0,038	-0,619	<b>0,408</b>	-0,267	<b>0,387</b>	0,024	<b>0,691</b>	<b>0,505</b>	0,286	-0,309	<b>0,434</b>	-0,062	<b>-0,647</b>
Ca/Mg	<b>-0,753</b>	<b>-0,666</b>	<b>-0,534</b>	-0,318	0,201	0,029	-0,014	-0,714	<b>-0,461</b>	0,289	<b>-0,416</b>	-0,033	<b>-0,687</b>	<b>-0,395</b>	-0,220	0,294	-0,324	0,104	<b>0,655</b>	
Teneur en éléments racinaires en élément racina	pH	0,238	0,015	0,513	0,175	0,433	0,414	0,304	-0,717	<b>0,748</b>	-0,304	0,418	<b>0,671</b>	0,484	0,235	0,425	0,565	0,235	0,370	-0,233
	Ntotal (mg/g)	0,193	0,042	0,231	0,227	-0,046	0,139	0,231	0,676	-0,210	-0,143	0,277	0,265	0,378	0,277	0,248	0,340	0,277	0,324	-0,208
	Corg (g/kg)	0,025	0,116	-0,396	-0,165	-0,242	-0,154	-0,056	0,942	<b>-0,761</b>	0,193	-0,186	-0,435	-0,305	-0,158	-0,295	-0,274	-0,158	-0,225	0,162
	C/N	0,169	0,088	0,112	-0,138	0,260	-0,025	-0,102	-0,405	0,341	-0,035	-0,011	0,070	-0,039	0,011	0,049	-0,200	0,011	-0,053	0,063
	P Olsen (mg/kg)	-0,175	-0,343	0,147	-0,009	-0,175	0,021	0,175	0,600	-0,231	-0,189	0,399	0,049	0,231	0,301	0,245	0,364	0,301	0,287	-0,186
	P total (mg/kg)	-0,306	-0,218	0,218	-0,030	-0,480	-0,306	-0,306	-0,654	0,480	-0,480	0,131	0,218	0,306	0,393	0,393	0,218	0,393	0,393	-0,219
	CEC (meq%)	-0,070	0,137	-0,418	-0,009	-0,512	-0,284	-0,221	0,347	-0,551	-0,119	-0,260	-0,337	-0,344	-0,137	-0,256	-0,088	-0,137	-0,189	0,214
	Na (meq%)	0,256	0,102	0,256	0,198	0,154	0,154	0,256	-0,097	0,205	-0,256	0,102	<b>0,615</b>	0,205	-0,102	0,102	0,512	-0,102	-0,102	0,231
	K (meq%)	0,259	0,130	0,065	-0,086	0,324	0,194	0,194	0,654	-0,518	0,000	0,130	0,000	0,065	0,000	-0,130	0,194	0,000	0,000	-0,130
	Ca (meq%)	0,007	0,109	-0,196	-0,279	-0,348	-0,254	-0,196	0,637	<b>-0,624</b>	0,196	0,065	-0,174	0,015	0,080	0,022	0,080	0,080	0,036	-0,189
	Mg (meq%)	-0,095	0,144	-0,414	0,146	-0,389	-0,105	-0,098	-0,115	-0,344	-0,144	-0,333	-0,291	-0,393	-0,246	-0,330	-0,042	-0,246	-0,232	0,278
	Ca/mg	0,079	0,136	-0,090	-0,353	-0,083	-0,366	-0,403	0,216	-0,336	0,426	0,057	-0,087	0,053	0,015	0,049	-0,117	0,015	-0,045	-0,257
	Fe (mg/kg)	-0,168	-0,266	0,133	0,220	-0,280	0,091	0,231	0,257	0,014	-0,308	0,287	0,238	0,189	0,175	0,224	0,552	0,175	0,224	-0,028
	Ni (mg/kg)	-0,249	-0,158	0,035	0,090	-0,077	0,112	0,105	-0,485	0,165	-0,032	0,095	0,074	0,056	0,032	0,095	0,329	0,032	0,063	-0,102
	Mn (mg/kg)	-0,042	-0,007	-0,154	-0,439	0,196	0,014	-0,014	-0,028	-0,371	-0,140	-0,077	-0,455	-0,238	0,035	-0,224	-0,329	0,035	-0,098	0,018
	Cr (mg/kg)	0,405	0,330	0,153	-0,001	-0,039	-0,188	-0,281	-0,058	0,082	0,156	0,124	0,256	0,185	0,156	0,245	0,082	0,156	0,171	-0,231
	Co (mg/kg)	0,077	-0,060	0,236	-0,437	0,366	0,176	0,127	-0,057	-0,011	-0,267	0,176	-0,137	0,077	0,316	0,084	-0,077	0,316	0,207	-0,202
	Phosphatase acide (DO)	0,120	0,048	0,281	0,596	0,153	0,405	<b>0,437</b>	-0,085	<b>0,528</b>	-0,137	0,288	<b>0,586</b>	0,186	-0,096	0,047	0,162	-0,042	-0,059	0,112
	Phosphatase alcaline (DO)	0,068	0,023	0,217	0,108	0,176	0,226	0,202	0,200	0,180	0,052	0,228	<b>0,448</b>	0,297	-0,141	0,182	0,357	0,048	0,071	-0,165

**ANNEXE 5c.**

		Teneur en élément racinaires										
		N (mg/l)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Fe (g/kg)	Ni (g/kg)	Mn (g/kg)	Cr (g/kg)	Co (g/kg)	Ca/Mg
Teneur en élément racinaires	N (mg/l)											
	P (g/kg)	0,077										
	K (g/kg)	<b>0,450</b>	<b>0,483</b>									
	Ca (g/kg)	<b>-0,438</b>	0,084	-0,151								
	Mg (g/kg)	<b>0,637</b>	0,091	<b>0,603</b>	<b>-0,415</b>							
	Fe (g/kg)	<b>0,649</b>	-0,149	<b>0,404</b>	<b>-0,482</b>	<b>0,904</b>						
	Ni (g/kg)	<b>0,637</b>	-0,109	<b>0,458</b>	<b>-0,492</b>	<b>0,926</b>	<b>0,982</b>					
	Mn (g/kg)	<b>0,603</b>	-0,108	<b>0,412</b>	<b>-0,389</b>	<b>0,856</b>	<b>0,925</b>	<b>0,921</b>				
	Cr (g/kg)	<b>0,640</b>	-0,153	<b>0,407</b>	<b>-0,497</b>	<b>0,902</b>	<b>0,993</b>	<b>0,978</b>	<b>0,928</b>			
	Co (g/kg)	<b>0,646</b>	-0,050	<b>0,485</b>	<b>-0,497</b>	<b>0,945</b>	<b>0,978</b>	<b>0,988</b>	<b>0,918</b>	<b>0,976</b>		
	Ca/Mg	<b>-0,655</b>	0,032	<b>-0,428</b>	<b>0,725</b>	<b>-0,906</b>	<b>-0,899</b>	<b>-0,916</b>	<b>-0,811</b>	<b>-0,904</b>	<b>-0,927</b>	<b>-0,627</b>
Caractéristiques édaphiques	pH	<b>0,715</b>	0,447	<b>0,715</b>	<b>-0,623</b>	<b>0,693</b>	<b>0,590</b>	0,546	0,572	0,561	0,554	-0,155
	Ntotal (mg/g)	0,080	0,248	0,332	-0,210	0,240	0,101	0,147	0,147	0,193	0,286	0,435
	Corg (g/kg)	-0,491	-0,396	-0,551	0,439	-0,425	-0,249	-0,239	-0,309	-0,235	-0,168	-0,214
	C/N	0,130	-0,084	-0,109	-0,067	0,246	0,362	0,327	0,295	0,299	0,179	0,007
	P Olsen (mg/kg)	-0,021	-0,399	0,028	-0,028	-0,077	0,063	0,028	-0,070	-0,014	0,077	-0,044
	P total (mg/kg)	0,393	0,218	0,480	-0,131	0,044	-0,306	-0,218	-0,131	-0,218	-0,131	<b>0,582</b>
	CEC (meq%)	-0,340	-0,351	-0,375	0,540	-0,575	-0,481	-0,467	-0,481	-0,481	-0,337	-0,307
	Na (meq%)	0,000	-0,154	0,154	-0,256	0,256	0,461	0,358	0,307	0,358	0,256	0,130
	K (meq%)	0,130	0,000	0,130	0,130	0,000	0,130	0,000	-0,065	0,065	0,000	0,312
	Ca (meq%)	-0,290	-0,276	-0,341	0,305	-0,297	-0,181	-0,189	-0,239	-0,123	-0,138	0,533
	Mg (meq%)	-0,207	-0,123	-0,168	0,442	-0,537	-0,533	-0,512	-0,470	-0,537	-0,351	0,106
	Ca/mg	-0,204	-0,166	-0,437	0,181	-0,057	0,090	0,038	-0,026	0,136	-0,075	-0,014
	Fe (mg/kg)	-0,035	-0,224	0,175	-0,098	-0,098	-0,028	-0,035	-0,063	-0,098	0,070	-0,007
	Ni (mg/kg)	0,098	-0,109	0,172	-0,060	-0,137	-0,112	-0,140	-0,109	-0,154	-0,165	0,280
	Mn (mg/kg)	0,210	-0,441	-0,126	0,357	-0,224	-0,063	-0,154	-0,238	-0,161	-0,231	-0,142
	Cr (mg/kg)	-0,078	0,320	-0,107	-0,043	0,277	0,266	0,298	0,323	0,348	0,298	-0,060
	Co (mg/kg)	0,422	-0,127	0,264	0,049	0,130	0,176	0,109	0,070	0,088	0,007	-0,339
Phosphatase acide (DO)	0,276	0,115	0,157	<b>-0,509</b>	0,171	0,210	0,210	0,310	0,187	0,245	-0,175	
Phosphatase alcaline (DO)	0,302	0,273	0,298	-0,114	0,271	0,173	0,130	0,246	0,182	0,128	-0,135	

**ANNEXE 5d.**

		Caractéristiques édaphiques																		
		pH	Ntotal (mg/g)	Corg (g/kg)	C/N	P Olsen (mg/kg)	P total (mg/kg)	CEC (meq%)	Na (meq%)	K (meq%)	Ca (meq%)	Mg (meq%)	Ca/mg	Fe (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Phosphatase acide (DO)	Phosphatase alcaline (DO)
Caractéristiques édaphiques	pH																			
	Ntotal (mg/g)	-0,214																		
	Corg (g/kg)	<b>-0,811</b>	<b>0,578</b>																	
	C/N	0,369	<b>-0,767</b>	<b>-0,577</b>																
	P Olsen (mg/kg)	-0,187	0,563	0,547	<b>-0,654</b>															
	P total (mg/kg)	0,275	0,105	-0,394	-0,220	0,044														
	CEC (meq%)	-0,572	0,512	<b>0,746</b>	<b>-0,788</b>	<b>0,660</b>	0,131													
	Na (meq%)	0,483	-0,092	-0,257	0,206	0,154	-0,213	-0,231												
	K (meq%)	-0,068	0,506	0,390	<b>-0,651</b>	<b>0,648</b>	-0,135	0,520	0,158											
	Ca (meq%)	-0,510	0,505	<b>0,728</b>	<b>-0,627</b>	<b>0,696</b>	-0,045	<b>0,764</b>	0,000	0,537										
	Mg (meq%)	-0,351	0,415	0,479	<b>-0,811</b>	0,484	0,263	<b>0,894</b>	-0,283	0,520	0,477									
	Ca/mg	-0,194	-0,292	0,114	0,387	-0,102	-0,330	-0,159	0,193	-0,175	0,399	-0,482								
	Fe (mg/kg)	0,015	0,525	0,340	<b>-0,724</b>	<b>0,888</b>	0,218	<b>0,670</b>	0,256	<b>0,583</b>	0,544	<b>0,653</b>	-0,339							
	Ni (mg/kg)	0,334	-0,213	-0,332	-0,262	0,336	0,394	0,204	0,308	0,389	0,196	0,364	-0,123	0,518						
	Mn (mg/kg)	-0,077	-0,076	0,098	-0,190	0,392	0,131	0,333	-0,102	<b>0,583</b>	0,210	0,351	-0,185	0,238	0,494					
	Cr (mg/kg)	0,035	-0,143	-0,073	0,509	-0,473	-0,222	-0,355	-0,026	-0,527	-0,055	-0,521	<b>0,611</b>	-0,522	-0,566	<b>-0,696</b>				
	Co (mg/kg)	0,254	-0,135	-0,282	-0,016	0,186	0,307	0,005	-0,077	0,456	-0,106	0,134	-0,318	0,109	0,512	<b>0,875</b>	<b>-0,586</b>			
Phosphatase acide (DO)	0,576	0,042	-0,351	0,109	0,042	-0,044	-0,344	0,358	-0,194	-0,500	-0,151	-0,528	0,266	0,053	-0,329	-0,124	-0,116			
Phosphatase alcaline (DO)	<b>0,631</b>	0,256	-0,309	-0,063	0,112	0,044	-0,298	0,410	0,453	-0,138	-0,189	-0,170	0,105	0,165	0,196	-0,274	0,309	0,217		

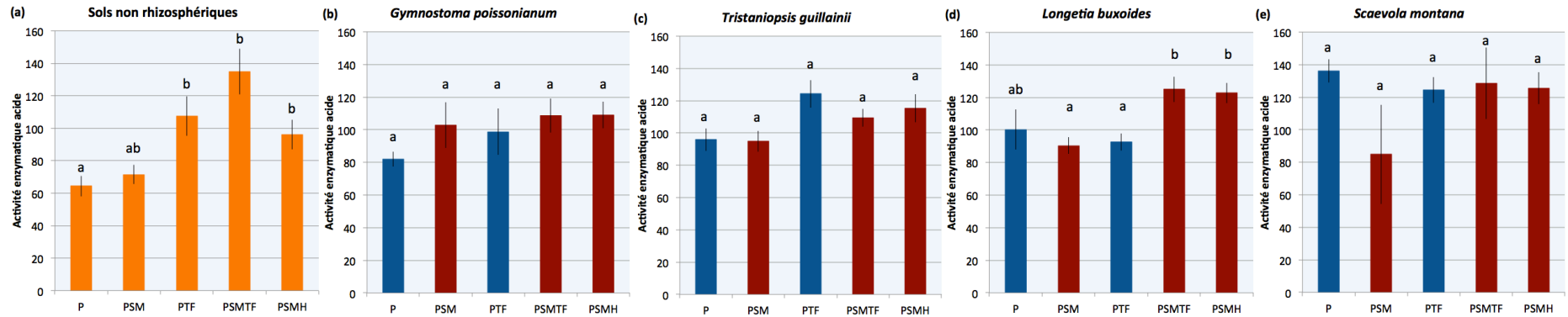


**Annexe 6. Teneurs moyennes en éléments nutritifs des parties foliaires et racinaires des plants, selon les facteurs espèces et inoculation.**

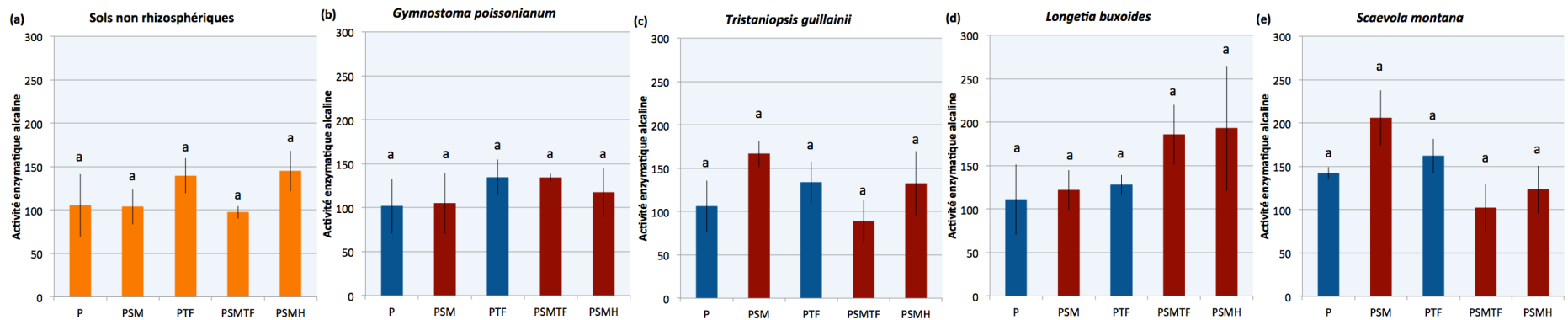
ELEMENTS NUTRITIFS		N (mg/l)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Ca/Mg (g/kg)		
FEUILLE	<i>Gymnostoma poissonianum</i>	NON INOCULÉ	6,42 (±0,42)	1101,33 (±223,33)	5,67 (±1,25)	4,15 (±0,53)	3,27 (±0,82)	1,42 (±0,07)	
		INOCULÉ	8,62 (±0,49)	695,98 (±233,71)	4,01 (±0,54)	4,96 (±0,66)	2,72 (±0,29)	1,86 (±0,07)	
	<i>Tristaniopsis guillainii</i>	NON INOCULÉ	8,7 (±0,61)	1431,14 (±512,86)	6,15 (±0,62)	8,97 (±1,36)	2,45 (±0,18)	3,79 (±0,45)	
		INOCULÉ	7,3 (±0,68)	581,46 (±164,4)	6,23 (±0,84)	7,94 (±0,59)	2,23 (±0,2)	3,57 (±0,12)	
	<i>Longetia buxoides</i>	NON INOCULÉ	7,56 (±0,68)	1450,84 (±358,51)	5,67 (±0,66)	7,18 (±1,14)	5,55 (±0,79)	1,44 (±0,05)	
		INOCULÉ	9 (±0,4)	1208,35 (±468,47)	6,2 (±0,96)	8,51 (±1,3)	8,14 (±1,22)	1,04 (±0,43)	
	<i>Scaevola montana</i>	NON INOCULÉ	12,06 (±0,79)	777,46 (±194,84)	11,31 (±1,11)	9,08 (±0,57)	9,93 (±1,21)	0,97 (±0,07)	
		INOCULÉ	10,38 (±2,31)	933,03 (±320,7)	9,47 (±1,79)	8,91 (±1,79)	9,1 (±1,46)	1,01 (±0,03)	
	RACINE	<i>Gymnostoma poissonianum</i>	NON INOCULÉ	6,85 (±0,49)	1248,21 (±135,12)	2,38 (±0,28)	5,2 (±0,6)	6,08 (±1,11)	0,99 (±0,26)
			INOCULÉ	6,52 (±0,93)	1256,32 (±403,76)	2,77 (±0,49)	6,43 (±0,69)	5,3 (±0,56)	1,24 (±0,3)
		<i>Tristaniopsis guillainii</i>	NON INOCULÉ	5,68 (±0,33)	3301,23 (±368,92)	3,31 (±0,31)	6,34 (±0,58)	3,48 (±0,39)	1,99 (±0,33)
			INOCULÉ	5,7 (±0,52)	1418,65 (±332,12)	2,5 (±0,31)	5,2 (±0,49)	2,35 (±0,35)	2,34 (±0,5)
<i>Longetia buxoides</i>		NON INOCULÉ	4,69 (±0,26)	1637,99 (±1147,29)	2,81 (±1,73)	7,4 (±0,81)	3,84 (±2,44)	1,92 (±0,11)	
		INOCULÉ	5,87 (±0,75)	3769,47 (±367,9)	5,84 (±0,46)	7,04 (±1,58)	9,95 (±0,97)	1,37 (±0,06)	
<i>Scaevola montana</i>		NON INOCULÉ	8,27 (±0,57)	1645,98 (±189,93)	7,77 (±0,53)	2,99 (±0,34)	11,06 (±1,23)	0,28 (±0,14)	
		INOCULÉ	7,76 (±0,85)	1732,17 (±316,82)	6,75 (±1,31)	4,02 (±0,54)	12,19 (±2,76)	0,48 (±0,19)	

**Annexe 7. Teneurs moyennes en métaux lourds des parties foliaires et racinaires des plants, selon les facteurs espèces et inoculation.**

METAUX LOURDS		Ni (g/kg)	Fe (g/kg)	Mn (g/kg)	Cr (g/kg)	Co (g/kg)		
FEUILLE	<i>Gymnostoma poissonianum</i>	NON INOCULÉ	34,47 (±4,58)	770,78 (±167,51)	84,11 (±13,76)	11,7 (±3,25)	2,22 (±0,48)	
		INOCULÉ	33,08 (±7,37)	710,92 (±205,98)	83,48 (±13,32)	10,59 (±3,6)	1,83 (±0,38)	
	<i>Tristaniopsis guillainii</i>	NON INOCULÉ	40,81 (±9,04)	905,11 (±119,27)	447,16 (±84,04)	14,32 (±2,11)	4,96 (±1,68)	
		INOCULÉ	28,76 (±3,28)	591,61 (±71,65)	423,35 (±42,42)	8,63 (±1,1)	2,37 (±0,3)	
	<i>Longetia buxoides</i>	NON INOCULÉ	102,08 (±20,38)	850,21 (±138,21)	776,9 (±96,01)	17,49 (±2,79)	23,05 (±2,31)	
		INOCULÉ	138,67 (±22,27)	765,94 (±120,16)	1054,27 (±261,96)	19,81 (±6,92)	22,32 (±4,34)	
	<i>Scaevola montana</i>	NON INOCULÉ	65,78 (±10,99)	1360,63 (±316,81)	384,53 (±44,4)	21,61 (±5,27)	5,43 (±1,18)	
		INOCULÉ	66,75 (±14,57)	1434,23 (±368,73)	358,28 (±114,24)	23,55 (±6,4)	4,84 (±1,15)	
	RACINE	<i>Gymnostoma poissonianum</i>	NON INOCULÉ	1388,62 (±381,91)	40090,4 (±14044,13)	572,45 (±163,39)	720,73 (±245,51)	128,54 (±38,3)
			INOCULÉ	1202,15 (±180,19)	34155,14 (±6988,82)	506,76 (±81,53)	601,21 (±113,55)	107,18 (±15,3)
		<i>Tristaniopsis guillainii</i>	NON INOCULÉ	299,66 (±58,51)	6773,71 (±1266,31)	180,84 (±27,95)	127,27 (±24,72)	32,68 (±5,64)
			INOCULÉ	191,55 (±58)	4169,09 (±1208,08)	109,37 (±29,41)	75 (±19,68)	20,55 (±6,27)
<i>Longetia buxoides</i>		NON INOCULÉ	340,53 (±257,93)	7550,73 (±6021,28)	386,76 (±29,79)	140,58 (±103,5)	34,82 (±28,36)	
		INOCULÉ	1040,08 (±224,05)	25146,1 (±5251,93)	579,56 (±141,65)	442,66 (±90,7)	112,76 (±23,17)	
<i>Scaevola montana</i>		NON INOCULÉ	2085,48 (±488,33)	55578,93 (±12923,24)	792,97 (±180,94)	1029,22 (±245,38)	215,57 (±43,76)	
		INOCULÉ	2326,7 (±924,43)	56799,46 (±21266,36)	924,44 (±349,82)	1120,82 (±484,54)	239,08 (±92,07)	



**ANNEXE 8.** Activité phosphatase acide moyenne ( $\pm$ se) par espèce et par modalité pour a) les sols non rhizosphériques, et b, c, d, e) par pour les sols rhizosphériques de chaque espèce. (P : Plantation ; PSM : Plantation semi-inoculée ; PTF : Plantation + topsoil frais ; PSMTF : Plantation semi-inoculée + topsoil frais ; PSMH : Plantation semi-inoculée + Hydroseeding). Les traitements avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.



**ANNEXE 9.** Activité phosphatase alcaline moyenne ( $\pm$ se) par espèce et par modalité pour a) les sols non rhizosphériques, et b,c,d,e) par pour les sols rhizosphériques de chaque espèce. (P : Plantation ; PSM : Plantation semi-inoculée ; PTF : Plantation + topsoil frais ; PSMTF : Plantation semi-inoculée + topsoil frais ; PSMH : Plantation semi-inoculée + Hydroseeding). Les traitements avec des lettres différentes présentent une différence significative au seuil de 0,05.

**Annexe 10. Teneurs moyennes en carbone organique, azote total, phosphore disponible te total, et rapport C/N, par modalité, pour les sols rhizosphériques et non rhizosphériques.**

		Corg (g/kg)	Total N mg/g	C/N	Olsen P 10 PPM	Total P 0;0002 %
Sol non rhizosphérique	in situ	24,73 (±1,28)	0,87 (±0,09)	28,88 (±2,19)	0 (±0)	0,01 (±0)
	T0	9,36 (±0,25)	0,04 (±0)	23,79 (±0,94)	0 (±0)	0 (±0)
	TFO	13,69 (±0,7)	0,06 (±0)	25,09 (±0,68)	5 (±0)	0 (±0)
	T18	4,17 (±0,12)	0,05 (±0)	8,35 (±0,25)	5 (±0)	0 (±0)
	TF	3,95 (±0,08)	0,05 (±0)	7,9 (±0,16)	5 (±0)	0,01 (±0)
	TFF	4,26 (±0,12)	0,1 (±0,03)	5,16 (±1,71)	5 (±0)	0,01 (±0)
	H	4,51 (±0,45)	0,1 (±0,02)	5,13 (±1,09)	10,25 (±3,11)	0,03 (±0,01)
	TFH	4,33 (±0,12)	0,13 (±0,02)	3,55 (±0,33)	6,67 (±1,67)	0,02 (±0,01)
	P	6,6 (±0,56)	0,24 (±0,05)	3,1 (±0,42)	18,38 (±6,28)	0,1 (±0,03)
	PSM	5,8 (±0,11)	0,19 (±0)	3,22 (±0,13)	11,52 (±0,88)	0,08 (±0,01)
	PTF	6,83 (±0,72)	0,31 (±0,06)	2,45 (±0,2)	16,28 (±3,63)	0,09 (±0,02)
	PSMTF	5,67 (±0,46)	0,19 (±0,01)	3,08 (±0,02)	10,82 (±1,92)	0,07 (±0,02)
	PSMH	6,14 (±1,02)	0,19 (±0,02)	3,33 (±0,1)	11,75 (±0,55)	0,05 (±0,01)
Rhizosphère	P	6,23 (±0,46)	0,22 (±0,03)	3,02 (±0,33)	16,16 (±4,52)	0,09 (±0,02)
	PSM inoculé	5,7 (±0,28)	0,18 (±0,02)	3,31 (±0,18)	11,02 (±1,02)	0,07 (±0,01)
	PTF	6,77 (±0,53)	0,28 (±0,05)	2,71 (±0,33)	14,19 (±3,07)	0,08 (±0,01)
	PSMTF inoculé	5,92 (±0,39)	0,18 (±0,02)	3,56 (±0,36)	9,71 (±1,67)	0,06 (±0,02)
	PSMH	5,83 (±0,94)	0,19 (±0,03)	3,14 (±0,25)	11,71 (±0,95)	0,05 (±0,01)
	PSMH inoculé	6,17 (±0,59)	0,2 (±0,04)	4,09 (±1,11)	12,17 (±1,9)	0,07 (±0)

**Annexe 11. Valeurs moyennes de capacité d'échange cationique et bases échangeables, par modalité, pour les sols rhizosphériques et non rhizosphériques.**

		CEC	Na meq%	K meq%	Ca meq%	Mg meq%	Ca/mg
Sol non rhizosphérique	in situ	7,5 (±0,51)	0,13 (±0,02)	0,08 (±0,01)	0,83 (±0,14)	1,19 (±0,37)	0,99 (±0,26)
	T0	6,58 (±0,23)	0,08 (±0,02)	0,04 (±0)	0,35 (±0,02)	6,51 (±0,36)	0,05 (±0)
	TFO	6,05 (±0,19)	0,07 (±0,01)	0,06 (±0,01)	0,32 (±0,02)	5,95 (±0,36)	0,06 (±0,01)
	T18	4,85 (±0,23)	0,02 (±0)	0,03 (±0)	0,95 (±0,1)	3,46 (±0,56)	0,3 (±0,08)
	TF	4,22 (±0,18)	0,02 (±0)	0,03 (±0)	0,7 (±0,02)	3,43 (±0,16)	0,21 (±0,01)
	TFF	4,97 (±0,41)	0,03 (±0,01)	0,03 (±0)	0,87 (±0,05)	3,98 (±0,34)	0,22 (±0,01)
	H	6,7 (±0,87)	0,05 (±0,01)	0,04 (±0,01)	1,12 (±0,21)	4,49 (±0,34)	0,25 (±0,03)
	TFH	4,84 (±0,49)	0,02 (±0)	0,03 (±0)	0,88 (±0,06)	3,51 (±0,75)	0,27 (±0,05)
	P	12,21 (±1,82)	0,05 (±0,01)	0,09 (±0,02)	2,97 (±0,4)	7,04 (±1,18)	0,42 (±0,01)
	PSM	10,29 (±0,33)	0,08 (±0,01)	0,12 (±0,01)	2,69 (±0,36)	5,51 (±0,05)	0,51 (±0,08)
	PTF	11,25 (±1,11)	0,06 (±0,01)	0,08 (±0,01)	2,74 (±0,29)	6,34 (±0,61)	0,43 (±0)
	PSMTF	9,98 (±1,06)	0,04 (±0)	0,06 (±0,02)	2,03 (±0,18)	6,14 (±0,65)	0,35 (±0,01)
	PSMH	9,89 (±0,55)	0,06 (±0,01)	0,06 (±0,02)	2,32 (±0,29)	5,49 (±0,08)	0,42 (±0,04)
Rhizosphère	P	11,43 (±1,42)	0,05 (±0,01)	0,08 (±0,02)	2,81 (±0,36)	6,41 (±0,89)	0,44 (±0,02)
	PSM inoculé	9,98 (±0,68)	0,07 (±0,01)	0,11 (±0,01)	2,58 (±0,24)	5,38 (±0,41)	0,5 (±0,07)
	PTF	11,05 (±0,8)	0,05 (±0,01)	0,08 (±0,01)	2,61 (±0,21)	6,24 (±0,47)	0,42 (±0,01)
	PSMTF inoculé	9,65 (±1,05)	0,04 (±0,01)	0,05 (±0,01)	1,97 (±0,19)	5,88 (±0,74)	0,35 (±0,03)
	PSMH	9,97 (±0,7)	0,07 (±0,01)	0,07 (±0,02)	2,27 (±0,35)	5,76 (±0,3)	0,4 (±0,06)
	PSMH inoculé	11,17 (±1,19)	0,08 (±0,01)	0,07 (±0,01)	2,62 (±0,29)	6,45 (±0,83)	0,43 (±0,05)

**Annexe 12.** Teneurs moyennes en métaux lourds, par modalité, pour les sols rhizosphériques et non rhizosphériques.

	Fe (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	
Sol non rhizosphérique	in situ	77,05 (±5,75)	76,69 (±28,55)	667,61 (±134,91)	0,54 (±0,18)	121,86 (±34,36)
	T0	105,24 (±10,18)	86,2 (±5,73)	173,35 (±10,14)	2 (±0,21)	82,17 (±1,43)
	TFO	68,98 (±11,99)	31,52 (±3,88)	95,51 (±13,34)	2,04 (±0,26)	53,99 (±8,35)
	T18	28,33 (±1,55)	43,55 (±2,89)	9,41 (±0,26)	0,81 (±0,62)	4,33 (±0,61)
	TF	20,38 (±1,63)	31,34 (±8,36)	7,66 (±0,64)	1,62 (±0,8)	2,88 (±0,7)
	TFF	25,16 (±2,9)	34,13 (±9,6)	6,07 (±0,44)	2,08 (±0,85)	1,71 (±0,4)
	H	41,36 (±6,09)	62,72 (±10,04)	10,34 (±2,59)	0,36 (±0,13)	3,09 (±0,47)
	TFH	22,7 (±1,99)	30,11 (±9,24)	6,69 (±0,92)	2,3 (±0,91)	1,97 (±0,46)
	P	80,75 (±20,21)	80,72 (±18,52)	46,06 (±21,68)	0,46 (±0,23)	9,31 (±4,41)
	PSM	57,79 (±5,6)	72,06 (±2,67)	13,22 (±1,41)	0,79 (±0,02)	3,33 (±0,27)
	PTF	76,51 (±10,51)	59,09 (±8,21)	11,55 (±0,53)	0,42 (±0,02)	2,39 (±0,21)
	PSMTF	50,45 (±8,21)	64,27 (±8,98)	11,59 (±2,71)	0,73 (±0,29)	2,88 (±0,66)
	PSMH	55,51 (±2,59)	65,87 (±2,72)	10,68 (±1,26)	0,63 (±0,12)	2,46 (±0,33)
	Rhizosphère	P	71,86 (±14,72)	81,44 (±12,22)	34,01 (±23,59)	0,4 (±0,18)
PSM inoculé		52,01 (±8,74)	74,32 (±3,32)	16,63 (±5,39)	0,6 (±0,2)	4,05 (±1,23)
PTF		67,63 (±9,45)	58,96 (±6,17)	11,29 (±0,84)	0,43 (±0,06)	2,27 (±0,18)
PSMTF inoculé		47,42 (±6,72)	59,97 (±7,7)	11,42 (±2,67)	0,72 (±0,27)	2,75 (±0,6)
PSMH		56,82 (±6,96)	71,79 (±7,97)	10,31 (±0,9)	0,49 (±0,21)	2,36 (±0,33)
PSMH inoculé		61,92 (±10,17)	69,34 (±7,73)	8,91 (±1,23)	0,79 (±0,38)	1,81 (±0,09)



## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



Les topsoils sont reconnus pour être au cœur des problématiques de restauration écologique. Largement employés dans un grand nombre de programmes de restauration minière à travers le monde, depuis plus de 40 ans, l'utilisation des topsoils est considérée à travers la littérature, comme la technique la plus efficace, et leur utilisation abondamment préconisée. En Nouvelle-Calédonie, l'utilisation des topsoils pour les travaux de restauration écologique des terrains miniers dégradés ne date que des années 2000. Les connaissances actuelles locales liées à cet outil sont encore fragmentaires, et les caractéristiques des topsoils, tout comme les résultats obtenus sont hétérogènes. Ce travail de thèse avait pour objectif de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les topsoils néo-calédoniens, notamment par la caractérisation de leurs potentialités biologiques (fertilité physico-chimique, banque de graines, micro-organismes). Ainsi, trois temps de recherches ont été mis en place durant notre étude : la caractérisation de six topsoils appartenant répartis le long d'un gradient de succession végétale, le suivi des modifications engendrées par le stockage de topsoils et enfin un essai sur terrain visant à revitaliser un topsoil dégradé après stockage.

## **ETUDE TYPOLOGIQUE DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES DES TOPSOILS**

Il est couramment admis que les environnements extrêmes auraient tendance à abriter de faibles biodiversités (Rothschild & Mancinelli, 2001). L'approche métagénomique des populations microbiennes, première étude de ce type sur des écosystèmes ultramafiques en Nouvelle-Calédonie, nous a cependant permis de montrer que les sols ultramafiques ne limitent pas les diversités bactériennes et fongiques. Les données recueillies révèlent une moyenne de  $3477 \pm 317$  OTU par habitat pour les bactéries. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés, dans des milieux forestiers non ultramafiques, reconnus pour faire partis d'écosystèmes terrestres les plus complexes et les plus riches (Myers et al. 1992). Nous avons également montré la présence de 40 phyla bactériens, chiffre supérieur à ceux rapportés dans ces mêmes milieux forestiers. De même, nous avons trouvé un nombre de phyla fongiques (6) équivalent à ceux trouvés dans d'autres environnements non ultramafiques. Ces résultats montrent que les écosystèmes ultramafiques sont parmi les écosystèmes les plus riches et les plus complexes. Nos résultats ont également permis de montrer que la distribution des communautés bactérienne et fongique, à l'échelle d'un paysage ultramafique, est plus structurée par le couvert végétal que par les propriétés édaphiques, bien que ces dernières interviennent aussi de façon notable. De plus, chaque formation végétale étudiée est caractérisée par une communauté bactérienne et fongique unique, avec une structure plus complexe dans les milieux forestiers ou para-forestiers fermés, en comparaison avec les maquis plus ouverts.



Notre étude de la banque de graines des topsoils souligne la faiblesse de celle-ci en termes de richesse spécifique par rapport au couvert végétal correspondant. Les résultats montrent que moins de 15% de la richesse spécifique totale du couvert végétal est retrouvée dans la banque de graines des topsoils. Toutefois, nos résultats révèlent également la présence dans le banque de graines des topsoils de sept espèces végétales ne faisant pas partie des espèces dont la production ou la récolte sont à ce jour maîtrisées en Nouvelle-Calédonie (ie, *Nepenthes Vieillardii*, *Caladenia catenata*, *Smilax sp.*, *Dracophyllum verticillatum*, *Styphelia sp.*, *Guettarda ngoyensis* et *Ilex sebertii*). Ce résultat suggère que l'utilisation du topsoil en restauration écologique peut permettre d'augmenter la diversité végétale sur les sites restaurés, en combinaison avec d'autres techniques. Par ailleurs, nous avons montré que la banque de graines des topsoils tend, dans cette étude, à être dominée par des espèces herbacées (Cypéacée), présentes en abondance. Ces espèces, considérées comme pionnières, ayant la capacité de s'installer dans des zones ouvertes, et des conditions difficiles, peuvent avoir des effets positifs pour les travaux de restauration écologique, en favorisant la mise en place de conditions favorables pour l'installation d'espèces de succession secondaire. Enfin, comme pour les communautés microbiennes, nous avons montré que la composition de la banque de graines des topsoils est plus structurée par le couvert végétal que par les propriétés édaphiques, à la fois en terme de composition, de richesse spécifique et de densités de germination. Les formations végétales fermées présentent, par rapport aux formations végétales ouvertes, des richesses spécifiques et des densités de germinations respectivement, près de deux et six fois supérieures, ainsi que des compositions spécifiques distinctes.

Notre évaluation des propriétés biologiques des topsoils des systèmes ultramafiques néo-calédoniens, pourrait trouver une application dans la conception de nouvelles stratégies de restauration écologiques des terrains miniers dégradés du territoire, en particulier pour la gestion des topsoils. Comme souligné par Van Etten et al., (2014), une question centrale liée à l'utilisation du topsoil est de savoir si une gestion séparée de celui-ci peut contribuer à la restauration de la diversité des communautés végétales avant exploitation minière. Nos résultats montrent que le potentiel biologique des topsoils intervenant dans la restauration des systèmes dégradés se caractérise différemment selon le couvert végétal qui lui est associé. Nous suggérons donc qu'une gestion distincte des topsoils selon les caractéristiques de ce potentiel biologique, se basant sur l'identification du couvert végétal associé, favorisera une meilleure restauration des différentes communautés végétales des écosystèmes ultramafiques néo-calédoniens.

Il faut cependant rappeler que les résultats liés à l'étude de la banque de graines montrent également que celle-ci ne peut, à elle seule, restaurer la totalité de la diversité végétale qui caractérise les substrats ultramafiques du territoire, en raison notamment de la

faible diversité de celle-ci par rapport à celle du couvert végétal. De fait, nous suggérons que l'utilisation des topsoils pour les travaux de restauration doit être associée à d'autres techniques de restauration, telle que la plantation ou l'ensemencement afin d'augmenter la diversité des communautés végétales restaurées. Nous suggérons également que la préservation de zone végétale non impactée sur site minier, pourrait contribuer à former une source de semences et de propagules, aisément disponible à la récolte et pouvant se disperser alentour. Enfin, comme suggéré par Van Etten et al., (2014), nous proposons que l'utilisation séparée des topsoils doit être complétée par une utilisation raisonnée de celui-ci en fonction de son origine, notamment topographique. La réintégration du topsoil dans un environnement topographique proche des conditions d'origine de celui-ci, devrait favoriser une meilleure réponse du potentiel biologique et par conséquent, une meilleure réussite des travaux de restauration.

Les résultats obtenus dans cette étude, peuvent également trouver une application pour la surveillance de l'évolution des communautés bactériennes et fongiques vis-à-vis de leur réponse à l'impact minier, ainsi que leur maintien et rétablissement lors des travaux de restauration écologique. Une approche fonctionnelle, par les outils de métatranscriptomique permettrait également de compléter notre compréhension de la complexité des écosystèmes ultramaïques, notamment en termes d'interaction sol/plante. Nous proposons également qu'une étude phénologique des espèces végétales composant le couvert végétal étudié dans ce travail, permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes de formations de la banque de graines, et notamment de comprendre pourquoi seuls environ 15% des espèces sont retrouvées dans les graines viables du sol. Des études sur les relations entre types de dormances et conservation des graines dans le sol pourraient également nous aider à éclaircir cette problématique.

## **ETUDE DE L'EVOLUTION DES POTENTIALITES BIOLOGIQUES DES TOPSOILS PENDANT STOCKAGE**

Le mode de stockage étudié dans cette étude était la verse (hauteur 10m) pour une durée de 18 mois. L'utilisation de l'outil métagénomique pour le suivi du potentiel microbien pendant le stockage des topsoils, une première à notre connaissance dans ce type d'étude, nous a permis de montrer qu'aucune baisse de la richesse spécifique ne se produisait pendant stockage, quelle que soit la profondeur considérée. Ceci démontre que les espèces seraient apparemment capables de se maintenir, même à très faible densité, dans ces conditions défavorables. Nous avons cependant montré une évolution dans le rapport des taxons dominants à la fois pour les communautés bactériennes et fongiques. L'évolution de la structure des communautés microbiennes est apparue notamment liée à la diminution des

stocks de matière organique, mais aussi des conditions d'anoxie qui se mettent en place pendant stockage.

Nos résultats ont aussi montré une dégradation du potentiel de fertilité chimique des topsoil pendant stockage, en relation avec une diminution de la teneur en matière organique. A l'inverse, nous avons observé peu de changements importants dans les teneurs en éléments métalliques. Les valeurs observées fluctuent entre les valeurs extrêmes rencontrées sur sols ultramafiques, et ne devrait par conséquent pas poser de problèmes de phytotoxicité lors de la réutilisation du topsoil stocké, pour les travaux de restauration.

Le potentiel germinatif montre de fortes baisses des densités de germinations et de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils pendant le stockage, augmentant avec le temps et la profondeur de stockage. Nous avons cependant pu constater, après 18 mois de stockage, le maintien d'un potentiel germinatif d'espèces Cypéracéennes (*Machaerina deplanchei* et *Lepidosperma perteres*).

Enfin, la comparaison de deux types de topsoils issus de deux formations végétales différentes nous a permis de mettre en évidence un effet origine (selon le couvert végétal qui leur était associé avant récupération) sur la vitesse de dégradation et les qualités de conservation des potentialités biologiques des topsoils dans le temps. Il est apparu une meilleure conservation des différentes potentialités biologiques au sein d'un topsoil issu d'un maquis paraforestier, par rapport à un topsoil issu de maquis ligno-herbacé, principalement corrélée à la présence de matière organique.

Les résultats obtenus dans ce second temps de recherche permettent tout d'abord d'envisager le rétablissement des communautés microbiennes après réinstallation des topsoils en fine couche, lors de travaux de restauration. Les baisses en éléments nutritifs constatées pendant stockage, et qui pourraient compliquer l'installation d'un couvert végétal, devrait être compensées par des apports en fertilisants, minéraux et organiques. Nous suggérons également une gestion séparée du stockage des topsoils, en fonction du couvert végétal qui leur est associé, ainsi qu'une caractérisation de leur niveau de dégradation avant réinstallation, lors des travaux de restauration. Ceci devrait contribuer à optimiser les méthodes de gestion et de conservation des potentialités biologiques des topsoils pendant stockage au bénéfice de la restauration de la diversité des écosystèmes miniers originels. Enfin, il apparaît nécessaire que les techniques de plantation, ou de semis d'autres espèces indigènes, viennent compléter le processus de restauration lors de la réinstallation des topsoils afin de compenser les pertes enregistrées pendant stockage. Il est cependant à noter que la persistance dans la banque de graines d'espèce de Cypéracées, pionnières, à cycle de vie rapide, et produisant des semences en abondances, peuvent contribuer à la fixation rapide des sols et au développement précoce d'un couvert végétal lors de la réutilisation des topsoils stockés.

Nous suggérons également que sur de courtes périodes de stockage, n'excédant pas 6 mois, il devrait être possible de stocker le topsoil sur une hauteur de 10m sans perte dramatique du potentiel de restauration. Pour des périodes plus longues, il paraît plus approprié d'envisager un stockage des topsoils sur de plus petites hauteurs (andain ou étalé), en combinaison avec un ensemencement des tas de topsoils. De récents travaux montrent en effet que l'entretien des couches superficielles des stocks de topsoils par la plantation d'un couvert végétal permet d'améliorer le maintien du potentiel de restauration dans le temps. De même, nous proposons que pour des périodes de stockage supérieures à deux ans l'utilisation d'espèces Cypéracéennes, comme cité précédemment, à cycle de croissance et à fructification rapide, permettrait de recharger la banque de graines des topsoils pendant le stockage. De même, il pourrait être envisagé l'utilisation d'espèces symbiotiques, qui ont montré leur intérêt pour la conservation des propriétés structurales des topsoils et du potentiel microbien (Balaguer, 2002).

Nous proposons qu'un suivi de l'évolution des communautés bactériennes et fongiques pendant stockage, permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes intervenant dans l'évolution des rapports de dominance des taxons microbiens, notamment afin de clarifier leur métabolisme. D'autre part, une analyse des mécanismes de dormance des semences, pourrait également favoriser les mesures de gestion du potentiel germinatif de la banque de graines pendant le stockage des topsoils, afin d'en diminuer les pertes.

## **ESSAI DE REVITALISATION D'UN TOPSOIL DEGRADE PENDANT STOCKAGE**

Dans cet essai nous testions la capacité de dix modalités à revitaliser un topsoil dégradé par une phase de stockage. Ces modalités s'appuyaient sur des techniques de réensemencement du topsoil avec des graines de plantes endémiques appliquées par hydroseeding, de revitalisation par application d'une couche fine de topsoil frais, et de plantation à l'aide d'espèces inoculées par des bactéries ou mycorhizes, et élevées en pépinière.

Nos résultats ont mis en évidence l'efficacité des différentes modalités testées pour la revitalisation des caractéristiques édaphiques du topsoil dégradé. Nous avons pu mettre en évidence un effet significatif des modalités comportant une plantation sur la mise en place de conditions de fertilité plus favorables à l'installation et au développement d'un couvert végétal secondaire qui pourrait intervenir par la suite. Nos résultats ont également mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'amendements organiques, favorisant une augmentation des teneurs en éléments nutritifs, des capacités d'échanges cationiques, des teneurs en bases échangeables et une amélioration du pH des sols. Aussi, nous suggérons, que ceux ci

soient utilisés autant que possible, constituant une alternative à l'utilisation des boues de STEP, d'avantage préconisé à ce jour.

Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence d'effets significatifs de l'inoculation sur la revitalisation du topsoil, en raison notamment d'une mycorhization de l'ensemble des plants après 18 mois d'expérience, nos résultats ont cependant montré un intérêt de l'utilisation des plants inoculés. Ceux-ci ont montré des taux de mortalité significativement plus bas, que les plants non inoculés. De même que l'activité phosphatase des sols a été corrélée aux intensités de mycorhization. Aussi, nous préconisons que l'utilisation de plants mycorhizés pour la restauration écologique des terrains miniers dégradés doit être mise en œuvre autant que possible.

Les conclusions de cet essai restent cependant incomplètes au vue des questions posées, principalement en raison du fait que les plants utilisés étaient déjà plus ou moins mycorhizés au départ, mais aussi du fait de la présence de spores mycorhiziennes dans le topsoil dégradé en début d'expérience. Nous suggérons donc de reproduire, tout ou une partie de cet essai en veillant à un meilleur contrôle de ces paramètres initiaux. Nous proposons que l'utilisation d'outils moléculaires, non mis en œuvre ici, permettrait un meilleur suivi des dynamiques microbiennes intervenant pendant la revitalisation des topsoils. Enfin, l'absence de germinations issues de l'hydroseeding, laisse à supposer qu'un problème technique ait pu se produire lors de la mise en place de l'essai. Aussi, d'autres essais mettant en œuvre l'ensemencement hydraulique devraient être menés afin d'améliorer l'usage de cette technique pour les travaux de revitalisation.

Ce travail de recherche a permis d'améliorer notre compréhension des interactions entre les composantes biologiques des topsoils et les phénomènes intervenant dans leur évolution. Nous avons montré que l'utilisation des topsoils en restauration écologique peut favoriser la restauration des écosystèmes. Néanmoins, il est important de rappeler que les travaux de restauration menés en Nouvelle-Calédonie, consistent à amorcer le processus de la succession primaire, et/ou à redynamiser le processus de la succession végétale secondaire. Il est par conséquent indispensable de mettre en place, quelques soient les techniques employées, des mesures de suivi et d'évaluation sur plusieurs années de l'évolution de l'écosystème en reconstitution afin de s'assurer du succès à long terme des opérations de restauration.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- Abarenkov K., Nilsson H.R., Larsson K.H., Alexander I.J., Eberhardt U., et al. (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. *The New phytologist*, 186 : 281–285.
- Abdul-Kareem A.W., & McRae S.G. (1984) The effects on topsoil of long-term storage in stockpiles. *Plant and Soil*, 76 : 357–363.
- Acosta J.A., Jansen B., Kalbitz K., Faz A., Martínez-Martínez S. (2011) Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere*, 85 : 1318–1324.
- AFES - Association Française pour l'Étude du Sol (2009) Référentiel pédologique 2008. Coll. Savoir-faire, Editions Quae, Paris, France.
- Alday J.G., Marrs R.H., Martínez-Ruiz C. (2011). Vegetation succession on reclaimed coal wastes in Spain: the influence of soil and environmental factors. *Applied Vegetation Science*, 14 : 84–94.
- Alvarez-Aquino C., Barradas-Sánchez L., Ponce-Gonzalez O., Williams-Linera G. (2014) Soil seed bank, seed removal, and germination in a seasonally dry tropical forest in Veracruz, Mexico. *Botanical Sciences*, 92 : 111–121.
- Amend A.S., Seifert K., Bruns T.D. (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular ecology*, 1 : 5555–5565.
- Amiaud B., & Touzard B. (2004) The relationships between soil seed bank, aboveground vegetation and disturbances in old embanked marshlands of Western France. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199 : 25–35.
- Amir H. & Ducouso M. (2010) Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. Pages 129-146. In: *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration* L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Editions IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Amir H., & Alabouvette C. (1993) Involvement of soil abiotic factors in the suppressiveness to *Fusarium* wilts. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 : 157-164.
- Amir H., & Pineau R. (2003) Relationships between extractable Ni, Co and other metals and some microbiological characteristics of different ultramafic soils from New-Caledonia. *Australian Journal of Soil Research*, 41 : 215-228.
- Amir H., Fogliani B., Cavaloc Y., Pagand P., Gunkel P., et al. (2009) Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. Perspectives d'application à la restauration écologique. Texte du projet - Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Amir H., L'huillier L., Fogliani B., Cavaloc Y., Jourand P., et al. (2014) – Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d'application à la restauration écologique. Rapport Final - Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Amir H., Lagrange A., Hassaine N., Cavaloc Y. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza*, 23 : 585-595.
- Anderson M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26 : 32–46.
- Aon M.A., Sarena D.E., Burgos J.L., Cortassa S. (2001) (Micro)biological, chemical and physical properties of soils subjected to conventional or no-till management: an assessment of their quality status. *Soil & Tillage Research*, 60 : 173-186.
- Arriagada C., Pereira G., García-Romera I., Ocampo A. (2010) Improved zinc tolerance in *Eucalyptus globules* inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Corioliopsis rigida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 : 118–124.
- Arriagada C.A., Herrera M.A., Garcia-Romera, I., Ocampo J.A. (2004) Tolerance of cadmium of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globules*) inoculated with arbuscular mycorrhiza and saprobe fungi. *Symbiosis*, 36 : 285-299.



- Arriagada C.A., Herrera M.A., Ocampo J.A. (2005) Contribution of arbuscular mycorrhiza and saprobe fungi to the tolerance of Eucalyptus globules to Pb. *Water, Air and Soil pollution*, 166 : 31-47.
- Auld T.D. (1995) Soil seedbank patterns of four trees and shrubs from arid Australia. *Journal of Arid Environments*, 29 : 33-45.
- Balesdent J. (1996) Un point sur l'évolution des réserves organiques des sols en France. *Etude et gestion des sols. INRA.(afes)*, 3 : 245-260.
- Baskin C.C., & Baskin J.M. (1998) *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press/School of Biological Sciences, Lexington, Kentucky, USA.
- Bates S.T., Ahrendt S., Bik H.M., Bruns T.D., Caporaso J.G., et al. (2013) Meeting Report : Fungal ITS Workshop ( October 2012 ). *Standards in Genomic Sciences*. 8.
- Bengtsson-Palme J., Ryberg M., Hartmann M., Branco S., Wang Z., et al. (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data (M Bunce, Ed.). *Methods in Ecology and Evolution*, 4 : 914-919.
- Berg B. & McClaugherty C. (2003) *Plant litter : Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. Springer, Berlin, Germany.
- Bergey's Manual (2012) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Collection vol 1-5. Springer-Verlag, New York, USA.
- Bertiller M.B. (1998) Spatial patterns of the germinable soil seed bank in northern Patagonia. *Seed Science Research*, 8 : 39-45.
- Binkley D. (1995) The influence of tree species on forest soils: processes and patterns. *Agronomy Society of New Zealand Special publication*, Canterbury, New Zealand.
- Bliss S.A., & Zedler P.H. (1997) The germination process in vernal pools, sensitivity to environmental conditions and effects on community structure. *Oecologia*, 113 : 67-73.
- Blondel J. (2003) Guilds or functional groups : does it matter ? *Oikos*, 100 : 223-231.
- Boer de W., Folman L.B., Summerbell R.C., Oddy L. (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 : 795-811.
- Bonito G., Reynolds H., Li M.S.R., Nelson J. (2014) Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*, 23 : 3356-3370.
- Bonvallot J., Gay J.C., Habert E. (2013) *Atlas de la Nouvelle-Calédonie*. IRD éditions, Bondy, France.
- Borůvka L., Kozák J., Mühlhanselová M., Donátová H., Nikodem D., et al. (2012) Effect of covering with natural topsoil as a reclamation measure on brown-coal mining dumpsites. *Journal of Geochemical Exploration*, 113 : 118-123.
- Bossuyt B., & Hermy M. (2001) Influence of land use history on seed banks in European temperate forest ecosystems: a review. *Ecography*, 24 : 225-238.
- Bradshaw A. (1997) Restoration of mined lands - using natural process. *Ecological Engineering*, 8 : 255-269.
- Bradshaw A. (2000) The use of natural processes in reclamation - advantages and difficulties. *Landscape and Urban Planning*, 51 : 89-100.
- Brady K.U., Kruckeberg A.R., Bradshaw H.D. (2005). Evolutionary ecology of plant adaption to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36 : 243-66.
- Branco S. (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Molecular ecology*, 19 : 5566-76.
- Branco S., & Ree R.H. (2010) Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. *PLoS ONE*, 5, e11757.
- Briones-Salas M., Sánchez-Cordero V., Sánchez-Rojas G. (2006) Multi-species fruit and seed removal in a tropical deciduous forest in Mexico. *Canadian Journal of Botany*, 84 : 433-442.
- Brofas G., Michopoulos P., Alifragis D. (2000) Sewage Sludge as an Amendment for Calcareous Bauxite Mine Spoils Reclamation. *Journal of Environment Quality*, 29 : 811-816.

- Buée M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R.H., et al. (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *The New phytologist*, 184 : 449–56.
- Caballero I., Olano J.M., Escudero A., Loidi J. (2008) Seed bank spatial structure in semi-arid environments: Beyond the patch-bare area dichotomy. *Plant Ecology*, 195 : 215–223.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7 : 335–336.
- Céspedes B., Torres I., Luna B., Pérez B., Moreno J.M. (2012) Soil seed bank, fire season, and temporal patterns of germination in a seeder-dominated Mediterranean shrubland. *Plant Ecology*, 213 : 383–393.
- Chantelot E. (2003) *Activité biologiques des sols – Méthode d'évaluation*. Institut technique de l'agriculture biologique, Paris, France.
- Chapman S.K., Langlely J.A., Hart S.C., Koch G.W. (2006) Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. *The New phytologist*, 169 : 27–34.
- Chen H., Cao M., Tang Y. (2013) Soil seed banks in plantations and tropical seasonal rainforests of Xishuangbanna, Southwest China. *Journal of Tropical Forest Science* 25 : 375–386
- Chevillotte V. (2005) *Morphogenèse tropicale en contexte épirogénique modéré. Exemple de la Nouvelle-Calédonie (Pacifique Sud-Ouest)*. Université de la Nouvelle-Calédonie. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Chevron (2014) *Gorgon Gas Development and Jansz Feed Gas Pipeline. Topsoil Management Plan*. Consulté le 23 mai 2014, Tiré de <http://www.chevronaustralia.com/docs/default-source/default-document-library/gorgon-emp-post-construction-rehabilitation-plan.pdf?sfvrsn=4>
- Chiarucci A., Baker A.J.M. (2007) Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant and Soil*, 293 : 1–2.
- Clarke K.R. (1993) Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18 : 117-143.
- Clarke K.R., Warwick R.M. (2001) *Change in Marine Communities: an Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. 2nd edn. PRIMER-E, Plymouth, United Kingdom.
- Code Minier (2009) *Code Minier De La Nouvelle-Calédonie (Partie Législative)*. Consultée le 12 février 2014. Tiré de [http://www.juridoc.gouv.nc/juridoc/jdcodes.nsf/0/439DAD26CCF5ADF34B2576E300774560/\\$File/code\\_minier\\_de\\_la\\_NC\\_PL\\_ChG.pdf](http://www.juridoc.gouv.nc/juridoc/jdcodes.nsf/0/439DAD26CCF5ADF34B2576E300774560/$File/code_minier_de_la_NC_PL_ChG.pdf)
- Cookson W.R., Murphy D.V., Roper M.M. (2008) Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 40 : 763-777.
- Daghino S., Murat C., Sizzano E., Girlanda M., Perotto S. (2012) Fungal diversity is not determined by mineral and chemical differences in serpentine substrates. *PloS ONE*, 7, e44233.
- Dagnelie P. (2012) *Principes d'expérimentation (deuxième édition)*. Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique.
- Dahlstrand A. (1995) Closure concerns at Sonora Mining's Jamestown Mine, *Mining Engineering*, March 1995 : 236-239.
- Dalling J.W., Swaine M.D., Garwood N.C. (1997) Soil seed bank community dynamics in seasonal moist lowland tropical forest, Panamá. *Journal of Tropical Ecology*, 13 : 659-680.
- Das M., & Maiti S.K. (2005) Metal mine waste and phytoremediation. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 4 : 169-176.
- Davies K.F., Chesson P., Harrison S., Inouye B.D., Melbourne B.A., et al. (2005) Spatial heterogeneity explains the scale dependence of the native-exotic diversity relationship. *Ecology*, 86 : 1602–1610.
- Davies R., Hodgkinson R., Younger A., Chapman R. (1995) Nitrogen loss from a soil restored after surface mining. *Journal Environmental Quality* 24 : 1215-1222.

- De Deyn G.B., Raaijmakers C.E., Zoomer H.R. (2003) Soil invertebrate fauna enhance grassland succession and diversity. *Nature*, 422 : 711–713.
- Decaens T., Jimenez J. J., Gioia C., Measey G.J., Lavelle P. (2006) The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology*, 42 : 23-38.
- Decaens T., Lavelle P., Jimenez J.J. (2008) Priorities for conservation of soil animals. In *CAB Reviews – Perspective in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1-18.
- DeGroot S.H., Claassen V.P., Scow K.M. (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1427–1435.
- DePuit E.J. (1984) Potential topsoiling strategies for enhancement of vegetation diversity on mined lands. *Minerals and the Environment*, 6: 115–120.
- Dewolf Y., & Bourrié G. (2008) *Les formations superficielles. Génèse, typologie, classification, paysages et environnements, ressources et risques*. Ellipses éditions, Paris.
- Dimitriu P.A., Prescott C.E., Quideau S.A., Grayston S.J. (2010) Impact of reclamation of surface-mined boreal forest soils on microbial community composition and function. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 : 2289–2297.
- Djukic I., Zehetner F., Mentler A., Gerzabek M.H. (2010) Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 : 155–161.
- Dowling D.K., & Simmons L.W. (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276 : 1737–1745.
- Eichberg C., Storm C., Stroh M., Schwabe A. (2010) Is the combination of topsoil replacement and inoculation with plant material an effective tool for the restoration of threatened sandy grassland? *Applied Vegetation Science*, 13 : 425–438.
- ELAW - Environmental Law Alliance Worldwide (2010) *Guide pour l'évaluation des EIE de projets miniers*. Environmental Law Alliance Worldwide. Oregon, USA.
- Erenler H.E., Ashton P.A., Gillman M.P., Ollerton J. (2010) Factors determining species richness of soil seed banks in lowland ancient woodlands. *Biodiversity and Conservation*, 19 : 1631–1648.
- Erickson T., Dixon K., Merritt D. (2010) *Pilbara Seed Science and Resource Management Project, BHP Billiton Iron Ore - Progress Report August 2010*. Botanic Gardens and Parks Authority, West Perth, Western Australia.
- Esmailzadeh O., Hosseini S.M., Tabari M., Baskin C.C., Asadi H. (2011) Persistent soil seed banks and floristic diversity in *Fagus orientalis* forest communities in the Hyrcanian vegetation region of Iran. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206 : 365–372.
- Eviner V.T., & Chapin III F.S. (2003) Functional matrix: A conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34 : 455–485.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014) *Classification des sols*. Consulté le 16 octobre 2014. Tiré de <http://www.fao.org/soils-portal/etude-des-sols/classification-des-sols/fr/>
- Fardoux J., Fernandes P., Niane-Badiane A., Chotte J.L. (2001) Effet du séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne Comparaison de deux méthodes biocidales de référence. *Etude et Gestion des sols*, 7 : 385–394.
- Faugier A. (2010) *Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires « the rare biosphere »*. Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon, Lyon, France.
- Fenner M., & Thompson K. (2005) *The ecology of seeds*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Fierer N., & Jackson R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 : 626–631.

- Fierer N., Breitbart M., Nulton J., Salamon P., Lozupone C., et al. (2007) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and environmental microbiology*, 73 : 7059–66.
- Fierer N., Schimel J.P., Holden P.A. (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 : 167-176.
- FIFA (2010) Australian Soil Fertility Manual. Third edition. CSIRO publishing, Collingwood, Australia.
- Fogliani B., & L'Huillier L. (2011) Has the soil seed bank the capacity to restore high biodiversity areas? Some case studies from New caledonian ultramafic environment Communication, SER's 4th World Conference on Ecological Restoration (Society for Ecological Restoration International) In: August 21-25, 2011, Merida, Mexico.
- Foster R.C. (1988) Microenvironments and soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6 : 189–203.
- Frankenberg W.T., & Arshad M. (1995) *Phytohormones in Soils Microbial Production & Function*. CRC Press.
- Frey S.D., Knorr M., Parrent J.L., Simpson R.T. (2004) Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management*, 196 : 159–171.
- Frouz J., Elhottova D., Kuraz V., Sourkova M. (2006). Effect of soil macrofauna on other soil biota and soil formation in reclaimed and non reclaimed post mining sites: a result of field microcosms experiment. *Applied Soil Ecology*, 33 : 308–320
- Frouz J., Prach K., Pizl V., Háněla L., Starýa J., et al. (2008) Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *European Journal of Soil Biology*, 44 : 109–121
- Gadd G.M. (1993) Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytologist*, 124 : 25–60.
- Gage D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 68 : 280–300.
- Gardner W.C., Naeth A.M., Broersma K., Chanasyk D.S., Jobson A.M. (2012) Influence of biosolids and fertilizer amendments on element concentrations and revegetation of copper mine tailings. *Canadian Journal of Soil Science*, 92 : 89–102.
- Garwood N.C. (1983) Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: a community study. *Ecological Monographs* 53 : 159-181.
- Gensous S. (2014) Les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Gerdemann J.W., & Nicolson T.H. (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46 : 235-244.
- GESSOL (2008) *Gestion durable des sols*. Coll. *Savoir-faire*, Editions Quae, Paris, France.
- Ghose M. (2012) *Management of Topsoil: the Key Element in Reclamation of Mining Areas*. Editions LAP Lambert. Academic Publishing, Saarbrücken, Germany.
- Ghose M.K. (2001) Management of topsoil for geoenvironmental reclamation of coal mining areas. *Environmental Geology*, 40 : 1405–1410.
- Ghose M.K. (2004) Effect of opencast mining on soil fertility. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63 : 1006–1009.
- Ghose M.K., & Kundu N.K. (1998) Microbial population in different aged soil dumps in coal mining areas. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 2 : 15-17.
- Ghose, M.K. (2005) Soil conservation for rehabilitation and revegetation of mine-degraded land. *TIDEE – TERI Information Digest on Energy and Environment* 4 : 137-150.

- Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda C., Leiros M.C., Seoane S. (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 : 877-887.
- Giovanetti M., Avio L., Salutini L. (1991) Morphological, cytological, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Canadian Journal of Botany*, 69 : 161-167.
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. (2003) Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 : 1800–1809.
- Gitt M.J., & Dollhopf D.J. (1991) Coal waste reclamation using automated weathering to predict lime requirement. *Journal Environmental Quality*, 20 : 285-288.
- Gobat J.M., Aragno M., Matthey W. (2010) *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques, Lausanne, Switzerland.
- Golos P.J., & Dixon K.W. (2014) Waterproofing topsoil stockpiles minimizes viability decline in the soil seed bank in an arid environment. *Restoration Ecology*, 22 : 495–501.
- Gomaa N.H. (2012) Soil seed bank in different habitats of the Eastern Desert of Egypt. *Saudi. Journal of Biological Sciences*, 19 : 211–220.
- Goodson J.M., Gurnell A.M., Angold P.G., Morrissey I.P. (2001) Riparian seed banks: structure, process and implications for riparian management. *Progress in Physical Geography*, 25 : 301–325
- Goxe J. (2010) Comparaison de topsoils provenant de différentes formations écologiques des sites miniers de Nouvelle-Calédonie. Mémoire de Master de l'Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Grant C.D., & Koch J.M. (1997) Ecological Aspects of Soil Seed-banks in Relation to Bauxite Mining. II. Twelve Year old Rehabilitated Mines, *Australian Journal of Ecology*, 22 : 177-184.
- Griffiths B.S., Hallett P.D., Kuan H.L., Gregory A.S., Watts C.W., et al. (2008) Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils*, 44 : 745–754.
- Guo Q., Rundel P.W., Goodall D.W. (1998) Horizontal and vertical distribution of desert seed banks: patterns, causes, and implications. *Journal of Arid Environments*, 38 : 465–478
- Guo W., Zhao R., Yang H., Zhao J., Zhang J. (2013) Using native plants to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on revegetation of iron tailings in grasslands. *Biology and Fertility of Soils*, 49 : 617–626.
- Hall S.L., Barton C.D., Baskin C.C. (2010) Topsoil Seed Bank of an Oak-Hickory Forest in Eastern Kentucky as a restoration tool on Surface Mines. *Restoration Ecology* 18 : 834–842.
- Hallé F. (dir) (2008) *Aux origines des plantes*, tome 1. Editions Fayard, Paris, France.
- Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. (2008) Changes in bacterial and archeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 : 1620-1633.
- Hargis N.E., & Redente E.F. (1984). Soil handling for surface mine reclamation. *Journal of Soil and Water Conservation*, 39 : 300–305.
- Harris J. A., Birch P., Short K.C. (1989) Changes in the microbial community and physico-chemical characteristics of topsoils stockpiled during opencast mining. *Soil Use and Management*, 5 : 161–168.
- Harris J. A., Birch P., Short K.C. (1993) The impact of storage of soil during opencast mining on the microbial community: a strategist theory interpretation. *Restoration Ecology* 1 : 88–100.
- Harrison S., & Rajakaruna N. (2011) *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. Berkeley, CA: University of California Press, Orlando, FL, USA.
- Heerdts G.N.J. Ter, Verweij G.L., Bekker R.M., Bakker J.P. (1996) An Improved Method for Seed-Bank Analysis: Seedling Emergence After Removing the Soil by Sieving. *Functional Ecology*, 10 : 144-151.

- Heintz T. (2008). Valorisation des boues d'épuration pour la revégétalisation de sites miniers en Nouvelle-Calédonie. Rapport de stage de Master, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, 56 p.
- Heras M.M.L. (2009) Development of soil physical structure and biological functionality in mining spoils affected by soil erosion in a Mediterranean-Continental environment. *Geoderma*, 149: 249-256.
- Herrera A., Héry M., Stach J.E.M., Jaffré T., Normand P. et al. (2007) Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology*, 43: 130–139.
- Hobbs R.J., & Harris J.A. (2001) Repairing the earth's ecosystems in the new millennium. *Restoration Ecology*, 9 : 239–246.
- Honnay O., & Jacquemyn H. (2006). Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 21 : 823-831.
- Hosogi D., & Matsue M. (2010) Competence of forest topsoil as revegetation material after stockpiling for one year. *Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology*, 35: 462–472.
- IIED - International Institute for Environment and Development (2002) "Breaking New Ground: Mining, Minerals and Sustainable Development: Chapter 9: Local Communities and Mines. Breaking New Grounds." 197-230.
- INSG - International Nickel Study Group (2014) Statistics. Consulté le 16 Octobre 2014. Tiré de <http://www.insg.org/publist.aspx#>
- Iverson L.R., & Wali M.K. (1982) Buried, viable seeds and their relation to revegetation after surface mining. *Journal of Range Management*, 35 : 648–652.
- Jaffré T. (1992). Floristic and ecological diversity of the vegetation on ultramafic rocks in New Caledonia. *International Conference on Serpentine Ecology*, 1. Intercept, 101-107.
- Jaffré T., & L'Huillier L. (2010) La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. Pages 45-103 In: *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration* L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Editions IAC, Noumea, Nouvelle-Calédonie.
- Jaffré T., & Pelletier P. (1992) Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers. SLN, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Jaffré T., Rigault F., Sarrailh J.M. (1994) Végétalisation des anciens sites miniers. *Bois et Forêts des Tropiques*, 242 : 45-57.
- Jasper D., Abbott L., Robson A. (1989) The loss of VA mycorrhizal infectivity during bauxite mining may limit the growth of *Acacia pulchella* R. Br. *Australian Journal of Botany*, 37 : 33-42.
- Jiménez H.E., & Armesto J. (1992) Importance of the soil seed bank of disturbed sites in Chilean matorral in early secondary succession. *Journal of Vegetation Science* 3 : 579-586.
- Joergensen R.G. (1996) The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the kEC value. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 : 25–31.
- Johansson J.F., Paul L.R., Finlay R.D. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48 : 1-13.
- Johnson D.B., & Williamson J.C. (1994) Conservation of mineral nitrogen in restored soils at opencast mines sites: I. Result from field studies of nitrogen transformations following restoration. *European Journal of Soil Science*, 45 : 311-317.
- Johnson D.B., Williamson J.C., Bailey A.J. (1991) Microbiology of soils at opencast coal sites. I. Short- and long-term transformations in stockpiled soils. *Journal of Soil Science*, 42 : 1–8.
- Jourand P., Carriconde F., Ducouso M., Majorel C., Hannibal L., et al. (2014b) Diversity and adaptation of ectomycorrhizal symbioses to ultramafic soils in New Caledonia. Pages 101-125. In Amadou M. Bâ, Krista L. McGuire, Abdala G. Diédhiou (eds) *Ectomycorrhizal Symbioses in Tropical and Neotropical Forests*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- Jourand P., Hannibal L., Majorel C. Mengant S., Ducouso M., et al. (2014a) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *Journal of plant physiology*, 171 : 164–72.
- Kadowaki K., Sato H., Yamamoto S., Tanabe A.S., Hidaka A., et al. (2014) Detection of the horizontal spatial structure of soil fungal communities in a natural forest. *Population Ecology*, 56 : 301–310.
- Kaldorf M., Kuhn A.J., Schroder W.H., Hildebrandt U., Bothe H. (1999) Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 154 : 718–728.
- Kazakou E., Dimitrakopoulos P., Baker A., Reeves R., Trumbis A. (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*, 83 : 495-508.
- Kelly G.L. (2006). Recycled organics in mine site rehabilitation. A review of the scientific literature. Australia, Department of Environment and Conservation NSW, 65 p.
- Kennedy N., Edwards S., Clipson N. (2005) Soil bacterial and fungal community structure across a range of unimproved and semi-improved upland grasslands. *Microbial ecology*, 50 : 463–73.
- Khade S.W., & Adholeya A. (2007) Feasible Bioremediation through Arbuscular Mycorrhizal Fungi Imparting Heavy Metal Tolerance: A Retrospective. *Bioremediation Journal*, 11 : 33–43.
- Khan A.G. (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace element contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18 : 355-364.
- Khurana E., & Singh J.S. (2001) Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation* 28:39-52.
- Kim M., Kim W., Tripathi B.M. (2014) Distinct Bacterial Communities Dominate Tropical and Temperate Zone Leaf Litter. *Microbial Ecology*, 67 : 837–848.
- Kisa M., Sanon A., Thioulouse J., Assigbetse K., Sylla S., et al. (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62 : 32-44.
- Koch J.M. (2007) Restoring a Jarrah Forest Understorey Vegetation after Bauxite Mining in Western Australia. *Restoration Ecology*, 15 : 26–39.
- Koch J.M., Ward S.C., Grant C.D., Ainsworth G.L. (1996) Effects of bauxite mine restoration operations on topsoil seed reserves in the jarrah forest of Western Australia. *Restoration Ecology*, 4 : 368–376.
- Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K., Tedersoo L., Taylor A.F.S., et al. (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular ecology*, 22 : 5271–5277.
- Kunin V., Engelbrekton A., Ochman H., Hugenholtz P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental microbiology*, 12 : 118–23.
- L'Huillier L. (2007) Assessment of soil seed banks for rehabilitation of nickel mines in New Caledonia. Page 51 In: Turner S, Merritt D, Clarke S, Commander L, Dixon K (eds) *Proceedings of the Seed Ecology. Conference*, 9-13 September, Perth, Australia. Kings Park and Botanic Garden, Perth, Australia.
- L'Huillier L., & Fogliani B. (2014) Caractérisation du topsoil et de son évolution pendant son stockage en mine. Pages 30-71. In *Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d'application à la restauration écologique. Rapport Final - Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement*. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

- L'Huillier L., Jaffré T., Wulff A. (2010) Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les Milieux sur substrats ultramafiques et Leur Restauration. Editions IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Lagrange A., Ducouso M., Jourand P., Majorel C., Amir H. (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of Microbiology*, 57 : 21-28.
- Lambers H., Raven J.A., Shaver G.R., Smith S.E. (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology, Evolution*, 23 : 95-103.
- Laroche O. (2011) Revégétalisation de sites miniers et valorisation de boues de stations d'épuration: cas de la Nouvelle-Calédonie. Mémoire de Master de l'Université de Sherbrook, Canada.
- Latham M. (1986) Altération et pédogenèse sur roches ultrabasiqes en Nouvelle-Calédonie, Études et Thèses ORSTOM. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology*, 75 : 5111–5120.
- Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40 : 2407–2415.
- Lavelle P. (2002) Functional domains in soil. *Ecological Research*, 17 : 441-540.
- Lebrija-Trejos E., Pérez-García E.A., Meave J.A., Poorter L., Bongers F. (2011) Environmental changes during secondary succession in a tropical dry forest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 27 : 477-489.
- Leckie S., Velland M., Bell G., Waterway M.J., Lechwicz M.J. (2000) The seed bank in an old-growth, temperate deciduous forest. *Canadian Journal of Botany*, 78 :181–192.
- Leclercq N. (2012) Amélioration de la technique d'enrobage de graines d'espèces endémiques avec des spores de champignons mycorrhiziens pour la revégétalisation de sites miniers par hydroseeding. Mémoire de Master de Agrocampus oust, Angers, France.
- Lee E., Eo J., Lee C., Eom A. (2012) Effect of Soil Ameliorators on Ectomycorrhizal Fungal Communities that Colonize Seedlings of *Pinus densiflora* in Abandoned Coal Mine Spoils. *Mycobiology*, 40 : 168–172.
- Lemenih M., & Teketay D. (2006) Changes in soil seed bank composition and density following deforestation and subsequent cultivation of a tropical dry Afromontane forest in Ethiopia. *Tropical Ecology*, 47 : 1-12.
- Lenczewski M., Rigg L., Enright N., Jaffré T., Kelly H. (2009) Microbial communities of ultramafic soils in maquis and rainforest at Mont Do, New Caledonia. *Austral Ecology*, 34 : 567–576.
- Lim Y.W., Kim B.K., Kim C., Jung H.S., Kim B.S., et al. (2010) Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 48 : 284–289.
- Logan T.J. (1992) Reclamation of chemically degraded soils. *Advances in Soil Science*, 17 : 13-35.
- Lortie C.J., Ellis E., Novoplansky A., Turkington R. (2005) Implications of spatial pattern and local density on community-level interactions. *Oikos*, 109 : 495–502.
- Ma M., Ma Z., Du G. (2014) Effects of Water Level on Three Wetlands Soil Seed Banks on the Tibetan Plateau. *PLoS ONE* 9 : e101458.
- Mackenzie D.D., & Naeth M.A. (2010) The role of the forest soil propagule bank in assisted natural recovery after oil sands mining. *Restoration Ecology*, 18 : 418–427.
- Maiti S.K., & Ghose M.K. (2005) Ecological restoration of acidic coal mine overburden dumps- an Indian case study. *Land Contamination and Reclamation*, 13 : 361-369.
- Marañón T. (1998) Soil seed bank and community dynamics in an annual-dominated Mediterranean salt-marsh. *Journal of Vegetation Science*, 9 : 371–378.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437 : 376–380.



- Martinez-Duro E., Luzuriaga A.L., Ferrandis P., Escudero A., Herranz J.M. (2012) Does aboveground vegetation composition resemble soil seed bank during succession in specialized vegetation on gypsum soil? *Ecological Research*, 27 : 43–51.
- Martínez-Ruiz C., & Fernández-Santos B. (2005) Natural revegetation on topsoiled mining-spoils according to the exposure. *Acta Oecologica*, 28 : 231-238.
- Maza-Villalobos S., Lemus-Herrera C., Martínez-Ramos M. (2011) Successional trends in soil seed banks of abandoned pastures of a Neotropical dry region. *Journal of Tropical Ecology*, 27 : 35-49.
- McCoy S. (2007) Plan de réutilisation de la terre végétale dans l'emprise du projet Goro Nickel. Projet Goro Nickel : Demande d'autorisation d'exploiter des installations classées, Annexe III-C-5-3.
- McGill W.B. (2007) The Physiology and Biochemistry of Soil Organisms, p. 231-256, In E. A. Paul, ed. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, Academic press ed.
- McHugh T.A., Koch G.W., Schwartz E. (2014) Minor changes in soil bacterial and fungal community composition occur in response to monsoon precipitation in a semiarid grassland. *Microbial ecology*, 68 : 370–380.
- McMurdie P.J., & Holmes S. (2014) Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. (AC McHardy, Ed.). *PLoS computational biology*, 10 : 1-12.
- MDDEPQ- Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (2009a) Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales : Cahier 5 – Échantillonnage des sols, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante, <http://wceaeg/documents/publications/echantillonnage.html>
- MDDEPQ- Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (2009b) Modes de conservation pour l'échantillonnage des sols – Échantillonnage des sols, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante, <http://wceaeg/documents/publications/echantillonnage.html>
- MEA - Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystem Wealth and Human Well-Being*, Island Press, DC, USA.
- Meave J.A., Flores-Rodríguez C., Pérez-García E.A., Romero-Romero M.A. (2012) Edaphic and seasonal heterogeneity of seed banks in agricultural fields of a tropical dry forest region in southern Mexico. *Botanical Sciences*, 90 : 313–329.
- MEDDE - Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie (2010) *Projet de caractérisation des fonctions écologiques des milieux en France. Etudes et Documents - Commissariat général au développement durable*. Consulté le 5 avril 2013. Tiré de <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/ED20.pdf>
- Meddour R. (2011) La méthode phytosociologique sigmatiste. Consulté le 10 avril 2012. Tiré de [http://www.tela-botanica.org/page:methode\\_phytosociologique\\_sigmatiste](http://www.tela-botanica.org/page:methode_phytosociologique_sigmatiste)
- Meney K.A., Nielsen G.M., Dixon K.W. (1994) Seed bank patterns in Restionaceae and Epacridaceae after wildfire in kwongan in southwestern Australia. *Journal of Vegetation Sciences*, 5 : 5-12.
- Mengoni A., Schat H., Vangronsveld J. (2009) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant and Soil*, 331, 5–16.
- Mesgaran M.B., Mashhadi H.R., Zand E., Alizadeh H.M. (2007) Comparison of three methodologies for efficient seed extraction in studies of soil weed seedbanks. *Weed Research*, 47 : 472–478.
- Meyer VF, Redente EF, Barbarick K.A., Brobst R.B., Paschke M.W., et al. (2000) Ecosystem Restoration. *Journal of Environmental Quality*, 33 : 873–881.
- Miao S., & Zou C.B. (2009) Seasonal variation in seed bank composition and its interaction with nutrient enrichment in the Everglades wetlands. *Aquatic Botany*, 90 : 157–164.
- Millard P., & Singh B.K. (2009) Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 88 : 147–158.
- Miller R.M., Carnes B.A., Moorman T.B. (1985) Factors influencing survival of vesicular-arbuscular mycorrhiza propagules during topsoil storage. *Journal Applied Ecology* 22 : 259-266.

- Moffet C.A., Zartman R.E., Wester D.B., Sosebee R.E. (2005). Surface Biosolids Application: Effects on Infiltration, Erosion, and Soil Organic Carbon in Chihuahuan Desert Grasslands and Shrublands. *Journal of Environmental Quality*, 34 : 299-311.
- Morimoto J., Kominami R., Koike T. (2010) Distribution and characteristics of the soil seed bank of the black locust (*Robinia pseudoacacia*) in a headwater basin in northern Japan. *Landscape and Ecological Engineering*, 6 : 193–199.
- Mouillot D, Bellwood DR, Baraloto C et al. (2013) Rare species support vulnerable functions in high-diversity ecosystems. *PLoS biology*, 11, e1001569.
- Mummey D.L., Stahl P.D., Buyer J.S. (2002) Soil microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 34 : 1717–1725.
- Murdoch, A. J., & Ellis R.H. (1992) Longevity, viability and dormancy. Pages 193–230 in M. Fenner, editor. *Seeds - the ecology of regeneration in plant communities*. CAB, Wallingford, United Kingdom.
- Myers N. (1992) *The Primary Source: Tropical Forests and Our Future*. Norton. Cambridge University Press, London, United Kingdom.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403 : 853–858.
- Nacke H., Thürmer A., Wollherr A., Will H., Hodac L., et al. (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE*, 6, e17000.
- Nadian H., Smith S.E., Alston A.M., Murray R.S. (1997) Effects of soil compaction on plant growth phosphorus uptake and morphological characteristics of vesicular–arbuscular mycorrhizal colonization of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist*, 135 : 303–311.
- Nielsen N.M., & Winding A. (2002) *Microorganisms as Indicators of Soil Health*. Technical Report No. 388. National Environmental Research Institute, Denmark.
- Nielsen U.N., Osler G.H.R., Campbell C.D., Burslem D.F.R.P., van der Wal R. (2010) The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. *Journal of Biogeography*, 37 : 1317–1328.
- Nilsson R.H., Tedersoo L., Abarenkov K., Ryberg M., Kristiansson E., et al. (2012) Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys*, 4: 37–63.
- O'Dell R.E., & Claassen V. P. (2009) *Serpentine Revegetation: A Review*. *Soil and Biota of Serpentine : A World View 2009*, Northerestern Naturalist, 16 : 253-271.
- Ojeda G., Alcañiz J., Le Bissonnais Y. (2008) Differences in aggregate stability due to various sewage sludge treatments on a Mediterranean calcareous soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 125 : 48-56.
- Okunola K.A., & Oke S.O. (2008) Seed Bank Dynamics in Altitudinal Gradient on an Inselberg in a Nigerian Secondary Forest. *Research Journal of Environmental Sciences*, 2 : 81-90.
- Olano J.M., Caballero I., Escudero A. (2012) Soil seed bank recovery occurs more rapidly than expected in semi-arid Mediterranean gypsum vegetation. *Annals of Botany*, 109 : 299–307.
- Oline D.K. (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. *Applied and environmental microbiology*, 72 : 6965–6971.
- Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., den Nijis J.C.M. (2003). Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*, 113 : 389-398.
- Opik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., et al. (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *The New phytologist*, 188 : 223–241.

- Orłowska E., Przybyłowicz W., Orłowski D., Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J. (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution*, 159 : 3730–3738.
- Owens M.K., Wallace R.B., Archer S. (1995) Seed dormancy and persistence of *Acacia berlandieri* and *Leucaena pulverulenta* in a semiarid environment. *Journal of Arid Environments*, 29 : 15–23.
- Page M.J. (2009) Using heat and smoke treatments to simulate the effects of fire on soil seed banks in four Australian vegetation communities. *Proceedings of the Royal Society of Queensland*, 115 : 1–9.
- Pakeman R.J., Small J.L., Torvell L. (2012) Edaphic factors influence the longevity of seeds in the soil. *Plant Ecology*, 213 : 57–65.
- Park S.G., Myung-Hoon Y.I., Shin H.T., Kurosawa K. (2011) Temporal change of soil animals of the stockpiled forest topsoil in relation to soil temperature and soil moisture. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 56 : 9–13.
- Parry S., Renault P., Chadoeuf J., Chenu C., Lensi R. (2000) Particulate organic matter as a source of variation in denitrification in clods of soil. *European Journal of Soil Science* 51 : 271–281.
- Pearson T.R.H., Burslem D.F.R.P., Mullins C.E., Dalling J.W. (2002) Germination ecology of Neotropical pioneers: interacting effects of environmental conditions and seed size. *Ecology*, 83 : 2798–2807.
- Pelletier B., & Esterle M. (1995). *Revegetation of nickel mines in New Caledonia. Quelle recherche française en environnement dans le Pacifique Sud, Bilan et perspectives*, Paris, 28 au 31 mars.
- Pérez E.M., & Santiago E.T. (2001) Dinámica estacional del banco de semillas en una sabana en los Llanos Centro-Orientales de Venezuela. *Biotropica* 33 : 435–446.
- Perrier N. (2005) Bio-géodiversité fonctionnelle des sols latéritiques miniers: application à la restauration écologique (Massif du Koniambo, Nouvelle-Calédonie). Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Perrier N., Ambrosi J.P., Colin F., Gilkes R.J. (2006) Biogeochemistry of a regolith: the New Caledonian Koniambo ultramafic massif. *Journal of Geochemical Exploration*, 88 : 54–58.
- Petersen S.O., Henriksen K., Mortensen G.K., Krogh P.H., Brandt K.K., et al. (2003). Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil and Tillage Research*, 72 : 139–152.
- Phillips C.P. (1993) Utilisation of sewage sludge for minesite rehabilitation. The Rixs Creek mine trial 1992–1993 – An Australian experience. Minor thesis, Masters of Environmental Studies, University of Newcastle, Newcastle, NSW.
- Ponder F., & Tadros M. (2002). Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. *Applied Soil Ecology*, 19 : 173–182.
- Preston S., Wirth S., Ritz K., Griffiths B.S., Young I.M. (2001) 'The role played by microorganisms in the biogenesis of soil cracks: importance of substrate quantity and quality'. *Soil Biology & Biochemistry*, 33 : 1851–1858.
- Prin Y., Ducouso M., Tassin J., Béna G., Jourand P., et al. (2012) Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ultramafic forest ecosystems of New Caledonia. *New York : Nova Science*, 2012, p. 25–48. (Environmental Science, Engineering and Technology).
- Püschel D., Rydlová J., Vosátka M. (2008) Does the sequence of plant dominants affect mycorrhiza development in simulated succession on spoil banks? *Plant and Soil*, 302 : 273–282.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41 : 590–600.
- Rajkumar M., Ae N., Freitas H. (2009) Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77 : 153–160.

- Rajkumar M., Vara Prasad M.N., Freitas H., Ae N. (2009) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Critical reviews in biotechnology*, 29 : 120–130.
- Richardson P.J., MacDougall A.S., Larson D.W. (2012) Fine-scale spatial heterogeneity and incoming seed diversity additively determine plant establishment. *Journal of Ecology*, 100 : 939–949.
- Rico-Gray V., & García-Franco J.G. (1992) Vegetation and soil seed bank of successional stages in tropical lowland deciduous forest. *Journal of Vegetation Science*, 3 : 617–624.
- Rio (1992) Déclaration de Rio sur l'Environnement et le Développement. Consulté le 17 octobre 2012. Tiré de [http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/sites/odyssee-developpement-durable/files/9/Declaration\\_de\\_Rio\\_1992\\_fr.pdf](http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/sites/odyssee-developpement-durable/files/9/Declaration_de_Rio_1992_fr.pdf)
- Rivera D., Jáuregui B.M., Peco B. (2012) The fate of herbaceous seeds during topsoil stockpiling: Restoration potential of seed banks. *Ecological Engineering*, 44 : 94–101.
- Rivera D., Mejías V., Jáuregui B.M., Costa-Tenorio M., López-Archilla A.I., et al. (2014) Spreading Topsoil Encourages Ecological Restoration on Embankments: Soil Fertility, Microbial Activity and Vegetation Cover. *PLoS ONE*, 9 : e101413.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26 : 139–140.
- Rocha L., Rodrigues S.M., Lopes I., Soares A.M.V.M., Duarte A.C., et al. (2011) The water-soluble fraction of potentially toxic elements in contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity. *Chemosphere*, 84 : 1495–1505.
- Rokich D.P., Dixon K.W., Sivasithamparam K., Meney K.A. (2000) Topsoil Handling and Storage Effects on Woodland Restoration in Western Australia. *Restoration Ecology*, 8 : 196–208.
- Romani A.M., Fischer H., Mille-Lindblom C., Tranvik L.J. (2006) Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, 87 : 2559–2669.
- Rothschild L.J., & Mancinelli R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, 409 : 1092–1101.
- Rousk J., Bååth E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, 4 : 1340–1351.
- Ruiz O. (2006) Etude de top-soils des terrains miniers en Nouvelle-Calédonie: Premiers résultats sur leur potentiel germinatif. Mémoire de Master de l'Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Ryckeboer J., Cops S., Coosemans J. (2002) The fate of plant pathogens and seeds during anaerobic digestion and aerobic composting of source separated household wastes. *Compost Science & Utilization*, 10 : 204–216.
- Sadler R.A., Smith S.A., Whitaker A., Bauer A.M. (2009) A New Live-Bearing Species of Scincid Lizard (Reptilia: Scincidae) from New Caledonia, Southwest Pacific. *Pacific Science*, 63 : 123–136.
- Salazar A., Goldstein G., Franco A.C., Miralles-Wilhelm F. (2011) Timing of seed dispersal and dormancy, rather than persistent soil seed-banks, control seedling recruitment of woody plants in Neotropical savannas. *Seed Science Research*, 21 : 103–116.
- Sanon A., Martin P., Thioulouse J., Planchette C., Spichiger R., et al. (2006). Displacement of an herbaceous plant species community by Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Gmelina arborea*, an exotic tree, grown in a microcosm experiment. *Mycorrhiza*, 16 : 125–132.
- Schafer W.M. (1982) Changes in land capability class resulting from mining in the Northern Great Plains. pp.C-I(1)-C-I(10) in: *Proceedings; Symposium on Surface Coal Mining and Reclamation in the Northern Great Plains*, Billings, MT.
- Schechter S.P., & Bruns T.D. (2012) Edaphic sorting drives arbuscular mycorrhizal fungal community assembly in a serpentine/non-serpentine mosaic landscape. *Ecosphere*, 3, art42.
- Schladweiler B.K., Vance G.E., Legg D.E., Munn L.C., Haroian R. (2005) Topsoil depth effects on reclaimed coal mine and native area vegetation in northeastern Wyoming. *Rangeland Ecology & Management*, 58 : 167–176.

- Scoles-Sciulla S.J., & DeFalco L.A. (2009) Seed reserves diluted during surface soil reclamation in eastern Mojave Desert. *Arid Land Research and Management*, 23 : 1–13.
- Selosse M.A., Baudoin E., Vandenkoornhuysse P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, 327 : 639-648.
- SER – Society for Ecological Restoration (2004) The SER International Primer on ecological restoration, Version 2. Society for Ecological Restoration Sciences and Policy Working Group, (en ligne). Consultée le 14 avril 2015. Tiré de <http://www.ser.org/resources/resources-detail-view/ser-international-primer-on-ecological-restoration>
- Sere G., Schwartz C., Ouvrard S., Sauvage C. Renat J.R., et al. (2008) Soil construction: A step for ecological reclamation of derelict lands. *Journal of Soils and Sediments*, 8 : 130–136.
- Shen Y., Liu W., Cao M., Li Y. (2007) Seasonal variation in density and species richness of soil seed-banks in karst forests and degraded vegetation in central Yunnan, SW China. *Seed Science Research*, 17 : 99-107.
- Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. (2009) Phytomining: A review. *Minerals Engineering* 22 : 1007–1019.
- Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation : A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3 : 1–21.
- Sidhoum W. (2011) Diversité des mycorhizes arbusculaires chez la variété « Sigoise » d'oliviers (*olea europea* L.) : étude de leurs efficacités sur la croissance des plants. Mémoire de magister en biotechnologie, université d'Oran, Algérie.
- Sierra J., & Renault P. (1996) Respiratory activity and oxygen distribution in natural aggregates in relation to anaerobiosis. *Soil Science Society of America Journal* 60 : 1428-1438.
- Simard S.W., & Durall D.M. (2004) Mycorrhizal networks : a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82 : 1140-1165.
- Singh A.N., & Singh J.S. (2006) Experiments on ecological restoration of coal mine spoil using native trees in a dry tropical environment, India: a synthesis. *New Forests*, 31 : 25-39.
- Singh B.K., Bardgett R.D., Smith P., Reay D.S. (2010) Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature reviews. Microbiology*, 8 : 779–790.
- Singh B.K., Dawson L.A., Macdonald C.A., Buckland S.M. (2009) Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Applied Soil Ecology*, 41 : 239–248.
- Smith D.P., & Peay K.G. (2014) Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing. *PLoS ONE*, 9, e90234.
- Smith S.E., & Read D. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, 156 : 1050–1057.
- Soltner D. (2005) Les bases de la production végétale. Tome I : Le sol. Coll. Sciences et Techniques agricoles, Ste-Gemmes-sur-Loire, France.
- Sort X., & Alcañiz J.M. (1999) Modification of soil porosity after application of sewage sludge. *Soil and Tillage Research*, 49 : 337-345.
- Sourkova M., Frouz J., Fettweis U., Bens O., Hutl R.F., et al. (2005) Soil development and properties of microbial biomass succession in reclaimed post mining sites near Sokolov (Czech Republic) and near Cottbus (Germany). *Geoderma* 129 : 73-80.
- Stahl P.D., Perryman B.L., Sharmasarkar S., Munn L.C. (2002) Topsoil Stockpiling Versus Exposure to Traffic: A Case Study on In situ Uranium Wellfields. *Restoration Ecology*, 10 : 129–137.
- Stark N.M., & Redente E.F. (1987) Production potential of stockpiled topsoil. *Soil Science*, 144: 72-76.

- Strullu D.G., Frenot Y., Maurice D., Gloaguen J.C., Christian Plenchette C., et al. (1999) Première contribution à l'étude des mycorhizes des îles Kerguelen. *Compte rendu académie des sciences*, 322 : 771–777.
- Suprin B. (2011a) Florilège des plantes en Nouvelle-Calédonie, tome 1. Editions photosynthèse, Arles, France.
- Suprin B. (2011b) Florilège des plantes en Nouvelle-Calédonie, tome 2. Editions photosynthèse, Arles, France.
- Swanton C.J., Shrestha A., Knezevic S.Z., Roy R.C., Bli-Coelho B.R. (2000) Influence of tillage type on vertical weed seedbank distribution in a sandy soil. *Canadian Journal of Plant Science* 80 : 455–457.
- Sydnor M.E.W., & Redente E.F. (2002) Reclamation of high-elevation, acidic mine waste with organic amendments and topsoil. *Journal of Environmental Quality*, 31 : 1528-1537.
- Ter Heerdt G.N.J., Verweij G.L., Bekker R.M., Bakker J.P. (1996) An improved method for seed-Bank analysis: seedling emergence after removing the Soil by sieving. *Functional Ecology*, 10 : 144-151.
- Tessema Z.K., de Boer W.F., Baars R. M.T., Prins H.H.T. (2012) Influence of grazing on soil seed banks determines the restoration potential of aboveground vegetation in a semi-arid savanna of Ethiopia. *Biotropica*, 44 : 211–219.
- Thompson K. (1993) Persistence in soil. Pages 199–202 in G. A. F. Hendry and J. P. Grime, editors. *Methods in comparative plant ecology: a laboratory manual*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Thomsen I.K., Schjøning P., Olesen J.E., Christensen B.T. (2003) C and N turnover in structurally intact soils of different texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 : 765–774.
- Tordoff G.M., Baker A.J.M., Willis A. J. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere*, 41 : 219–228.
- Tozer M.G., Mackenzie B.D.E., Simpson C.C. (2012) An application of plant functional types for predicting restoration outcomes. *Restoration Ecology*, 20 : 730-739.
- UICN France (2012) Panorama des services écologiques fournis par les milieux naturels en France – volume 1: contexte et enjeux. Paris, France.
- UN-Habitat (2008). *Global atlas of excreta, wastewater sludge and biosolids management : moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource*. UN-HABITAT, p. 632
- Uroz S., Buée M., Murat C., Frey-Klett P., Martin F. (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental microbiology reports*, 2 : 281–288.
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4, art.356.
- Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel R., et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396 : 69-72.
- Van Etten E.J., Neasham B., Dalgleish S. (2014) Soil seed banks of fringing salt lake vegetation in arid Western Australia - density, composition and implications for postmine restoration using topsoil. *Ecological Management & Restoration*, 15 : 239–242.
- Velayoudon P., Pagand P., Winterton P., Guirresse M. (2014) Sewage sludge application for spontaneous plant restoration of a New Caledonian Ferralsol. *Soil Research*, 52 : 76-86.
- Vian J.F. (2009) Comparaison de différentes techniques de travail du sol en agriculture biologique: Effet de la structure et de la localisation des résidus sur les microorganismes du sol et leurs activités de minéralisation du carbone et de l'azote. Thèse de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, France.
- Vicklund K. (2004) Hallands tidiga odling. *Landskap i förändring*, 6 : 56–67.

- Vieira D.L.M., & Scariot A. (2006) Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. *Restoration Ecology*, 14 : 11-20.
- Vieira R.F., Maia A.H.N., Teixeira M.A. (2005). Inorganic nitrogen in a tropical soil with frequent amendments of sewage sludge. *Biology and Fertility of Soils*, 41 : 273-279.
- Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. (2005) Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133 : 233–242.
- Vogel-Mikus K., Pongrac P., Kump P., Necemer M., Regvar M. (2006) Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987), 139 : 362–371.
- Von Wettberg E.J., & Wright J. (2011) Genomic approaches to understanding adaptation. Pages 139–154. in *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. Harrison S, Rajakaruna N (eds). University of California Press, Berkeley, CA, USA.
- Wade G.L., & Thompson R.L. (1990) Establishment of native plant species from forest topsoil seedbanks on a borrow area in Kentucky. Pages 451–460 In: Skousen J, Sencindiver J, Samuel D (eds) *Proceedings of the 1990 Mining and Reclamation Conference and Exhibition*, Vol. 2. West Virginia University, Morgantown, USA
- Wagner M., & Mitschunas N. (2008) Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: a review. *Basic and Applied Ecology*, 9 : 191–203.
- Walck J.L., Baskin J.M., Baskin C.C., Hidayti S.N. (2005) Defining transient and persistent seed banks in species with pronounced seasonal dormancy and germination patterns. *Seed Science Research*, 15 : 189–196.
- Waldrop M.P., Zak D.R., Blackwood C.B., Curtis C.D., Tilman D. (2006) Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. *Ecology Letters*, 9 : 1127–1135.
- Wali M.K. (1999). Ecological succession and the rehabilitation of disturbed terrestrial ecosystems. *Plant Soil*, 213: 195–220.
- Walker L.R. (2005) Restoring soil and ecosystem processes. In: Mansourian S, Valluari D, Dudley N (eds) *Forest restoration in landscapes*. Springer Science, New York, 192–196.
- Wang B., & Qiu Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16 : 299-363.
- Ward S.C., Slessar G.C., Glenister D.J., Coffey P.S. (1996) Environmental resource management practices of Alcoa in southwest Western Australia. Pages 383–402 in D. Mulligan, editor. *Environmental management in the Australian minerals and energy industries— principles and practices*. UNSW Press, Sydney, Australia.
- Weng L.P., Wolthoorn A., Lexmond T.M., Temminghoff E.J.M., Van Riemsdijk W.H. (2004) Understanding the Effects of Soil Characteristics on Phytotoxicity and Bioavailability of Nickel Using Speciation Models, *Environmental Science & Technology*, 38 : 156-162.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). New York: Academic Press : 315–322.
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., et al. (2004) Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restoration Ecology*, 12 : 106–116.
- Williamson J.C., & Johnson D.B. (1990) Determination of the activity of soil microbial populations in stored and restored soils at opencast coal sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 22 : 671–675.
- Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Review*, 51: 221-271.
- Wright B.R., & Clarke P.J. (2009) Fire, aridity and seed banks. What does seed bank composition reveal about community processes in fire-prone desert? *Journal of Vegetation Science*, 20 :

- 663–674.
- Wulff A. (2012) Le micro-endemisme dans un hotspot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevola*. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Yan Q.L., Zhu J.J., Yu L.Z. (2012) Seed Regeneration Potential of Canopy Gaps at Early Formation Stage in Temperate Secondary Forests, Northeast China. *PLoS ONE* 7 : e39502.
- Yergeau E., Bezemer T.M., Hedlund K., Mortimer S.R., Kowalchuk G.A., et al. (2010) Influences of space, soil, nematodes and plants on microbial community composition of chalk grassland soils. *Environmental Microbiology*, 12 : 2096–2106.
- Yu L., Nicolaisen M., Larsen J., Ravnskov S. (2012) Molecular characterization of root-associated fungal communities in relation to health status of *Pisum sativum* using barcoded pyrosequencing. *Plant and Soil*, 357 : 395–405.
- Yu Y., Wang H., Liu J., Wang Q., Shen T., Guo W., Wang R. (2011) Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary. *European Journal of Soil Biology*, 49 : 12-21.
- Zeng F., Ali F., Zhang H., Ouyang Y., Qiu B., et al. (2011) The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental Pollution*, 159 : 84-91.
- Zhao S., Chenghong Feng C., Wang D., Liu Y., Shen Z. (2013) Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: Relative role of sediments' properties and metal speciation. *Chemosphere*, 91 : 977–984.
- Zinger L., Lejon D.P.H., Baptist F., Bouasria A., Aubert S., et al. (2011) Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an alpine landscape. *PloS ONE*, 6, e19950.
- Zipper C.E., Burger J.A., Skousen J.G., Angel P.N, Barton C.D., et al. (2011) Restoring forests and associated ecosystem services on Appalachian coal surface mines. *Environmental Management*, 47 : 751–765.
- Zongo C. (2010). Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramafiqes néocalédoniens. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.





---

**STRATEGIES DE REVEGETALISATION**  
**DES MAQUIS MINIERES NICKELIFERES DE NOUVELLE-CALEDONIE :**  
**ETUDE SUR LES POTENTIELS BIOLOGIQUES DES TOPSOILS ET LEUR GESTION EN VUE DE**  
**LEUR UTILISATION POUR LA RESTAURATION ECOLOGIQUE DES MILIEUX DEGRADEES.**

---

En Nouvelle-Calédonie, archipel de l'océan Pacifique Sud-Ouest, la présence de milieux ultramafiques (1/3 de la surface du pays) revêt une importance particulière. Ces substrats abritent une biodiversité végétale reconnue comme un des principaux « hotspot » mondiaux des flores métallobytophytes, mais également selon les estimations, 1/4 des ressources en nickel mondiales connues. Le « topsoil » comme outil de restauration écologique des terrains miniers dégradés, consiste à récupérer la couche de sol naturellement riche en matières organiques, semences et micro-organismes (qui définissent le potentiel biologique de restauration), lors d'une opération qui précède l'exploitation minière, puis à l'épandre sur les sites à restaurer. Au cœur des problématiques de restauration écologique, les topsoils apparaissent à travers la littérature comme une technique efficace et leur utilisation abondamment préconisée. Toutefois celle-ci ne date, sur le territoire, que de quelques années 2000. Les connaissances actuelles locales liées à cet outil sont encore fragmentaires, et les caractéristiques des topsoils, tout comme les résultats obtenus sont hétérogènes. Ce travail de thèse a ainsi pour objectif de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les topsoils néo-calédoniens, notamment par la caractérisation de leurs potentialités biologiques (fertilité physico-chimique, banque de graines, micro-organismes).

Dans un premier temps, une étude typologique de 6 topsoils répartis le long d'un gradient de succession végétale a permis de montrer que les communautés microbiennes des milieux ultramafiques néo-calédoniens figurent parmi les systèmes terrestres les plus complexes et les plus riches. Les résultats ont également permis de mettre en évidence que la distribution des communautés microbiennes et de la banque de graines des topsoils, à l'échelle du paysage, sont plus structurées par le couvert végétal que par les propriétés édaphiques, bien que ces dernières interviennent également de façon notable. De plus, la banque de graines des topsoils comportent d'abondantes semences d'espèces « pionnières » Cypéracées, pouvant avoir de nombreux effets positifs pour la réinstallation rapide d'un couvert végétal, ainsi que sept espèces ne faisant pas partie des espèces dont la production ou la récolte sont à ce jour maîtrisées.

Dans un second temps, un suivi de l'évolution des potentialités biologiques de deux topsoils stockés en verse sur une hauteur de 10m pendant 18 mois a été réalisé. Les résultats tendent à démontrer la capacité de maintien du potentiel microbien des topsoils pendant stockage, sans perte de la richesse spécifique. Une évolution dans le rapport des taxons dominants a toutefois été identifiée. Les résultats ont également montré une dégradation du potentiel de fertilité chimique, alors que peu de changements ont été observés dans les teneurs en éléments métalliques potentiellement phytotoxiques. Le potentiel germinatif a montré de fortes baisses des densités de germinations, et de la richesse spécifique de la banque de graines des topsoils pendant stockage, augmentant avec le temps et la profondeur de stockage. Enfin, la comparaison de deux types de topsoils issus de deux formations végétales différentes nous a permis de mettre en évidence un effet origine (selon le couvert végétal qui leur était associé avant récupération) sur la vitesse de dégradation et les qualités de conservation des potentialités biologiques des topsoils dans le temps.

Dans un troisième temps, des techniques visant à revitaliser un topsoil dégradé après stockage ont été testées sur le terrain. Dix modalités ont ainsi été comparées. Les résultats ont mis en évidence un effet significatif des techniques de plantation sur la remise en place de conditions de fertilité. Ils ont également mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'amendements organiques, favorisant une augmentation des teneurs en éléments nutritifs, des capacités d'échanges cationiques, des teneurs en bases échangeables et une amélioration du pH des sols. Enfin, l'utilisation de plants mycorhizés a montré une diminution significative des taux de mortalité, ainsi qu'une amélioration de l'activité phosphatase.

Ce travail de recherche a permis d'améliorer notre compréhension des interactions entre les composantes biologiques des topsoils et les phénomènes intervenant dans leur évolution. Les résultats obtenus ont montré que l'utilisation des topsoils en restauration écologique peut favoriser la restauration des écosystèmes ultramafiques néo-calédoniens, et pourraient trouver une application dans la conception de nouvelles stratégies de restauration écologiques des terrains miniers dégradés du territoire. Néanmoins, il est également apparu que les topsoils ne peuvent à eux seuls restaurer la totalité de la diversité végétale qui caractérise les substrats ultramafiques du territoire, et doivent donc être associés à d'autres techniques de restauration.