HAL open science

Un premier pas vers la compréhension des données biologiques.

Karine Laval, Christian Mougin, Marthe Akpa, Sylvie Barray, J.-C. Thoisy-Dur, Christophe Gangneux, Jérémie D. Lebrun, Marc Legras, Patrice Lepelletier, Pierre Plassart, et al.

To cite this version:

Karine Laval, Christian Mougin, Marthe Akpa, Sylvie Barray, J.-C. Thoisy-Dur, et al.. Un premier pas vers la compréhension des données biologiques.. Étude et Gestion des Sols, 2009, 16 (3/4), pp.275-287. hal-02660817v2

HAL Id: hal-02660817

https://hal.inrae.fr/hal-02660817v2

Submitted on 26 Feb 2023

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

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

Nouvelles avancées vers la compréhension des données biologiques

K. Laval(1), C. Mougin(2), M. Akpa(3), S. Barray(4), J-C. Dur(2), C. Gangneux(1), J. Lebrun(1)(2), M. Legras(1), P. Lepelletier(5)(6), P. Plassart(1)(4), S. Taibi(5)(6) et I. Trinsoutrot-Gattin(1)

1) Laboratoire BioSol, Esitpa, 3, rue du Tronquet, 76134 Mont-Saint-Aignan cedex, France
2) Laboratoire PESSAC, INRA route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France
3) Laboratoire ECODIV, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France
4) Laboratoire M2C, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France
5) Laboratoire LAMSAD, Esitpa, 3, rue du Tronquet, 76134 Mont-Saint-Aignan cedex, France
6) Laboratoire Raphaël Salem, Université de Rouen, 76801 Saint-Etienne-du-Rouvray, France

RÉSUMÉ

S'il est indispensable de maîtriser la qualité des sols, les connaissances sur son fonctionnement demeurent lacunaires, notamment parce que la composante biologique à l'origine de l'ensemble des processus de transformation de la matière organique reste à décrire. Dans cet essai, l'objectif est de montrer l'intérêt d'une approche multiparamétrique pour envisager d'utiliser les microorganismes comme indicateurs de l'état des sols. Des marqueurs cellulaires, moléculaires et membranaires des communautés microbiennes (bactéries et champignons) ont été proposés afin de déterminer les abondances de ces organismes sous différentes contraintes naturelles (incluant le climat, le cycle cultural...) et anthropiques (prairie / grande culture). La mesure de ces marqueurs structurels a été complétée par la mesure des activités enzymatiques dans l'objectif d'appréhender d'éventuels liens entre structure et fonction. Des analyses de la variance à plusieurs facteurs ont permis de quantifier l'impact des facteurs environnementaux étudiés sur les marqueurs mesurés. Couplé aux analyses des corrélations entre les différents marqueurs, ce travail permet de proposer des éléments de réflexion pour le choix d'indicateurs pertinents de l'état des sols.

Mots clés

Sol, bactérie, champignon, activité enzymatique, indice de qualité.

Reçu : avril 2009 ; Accepté : septembre 2009

SUMMARY
NEW BREAKTHROUGHS TO UNDERSTANDING BIOLOGICAL DATA

Although the quality of soils has to be managed, knowledge about soil functioning remains incomplete particularly because the biological components at the center of the whole transformation process of the organic matter remains to be described. The objective of this essay is to demonstrate the interest of a multi-parameter approach in order to utilise the micro-organisms as indicators of the state of soils. Cellular, molecular and membrane markers of the microbial communities (bacteria and fungi) have been proposed in order to determine the abundance of these organisms under different natural (climate, soil status) and anthropogenic (grassland, cultivated land) constraints. The measurement of these structural markers was completed by measuring the enzymatic activities with the aim of understanding the eventual links between structure and function. Multiway analysis of variance (ANOVA) has allowed the quantification of the impact of environmental factors studied on the measured markers. Coupled with correlation analysis between the different markers, this work proposes elements for reflection concerning the choice of pertinent indicators of the state of the soil.

Key-words

Soil, bacteria, fungi, enzymatic activity, quality indicator.

RESUMEN
UN PRIMER PASÓ HACIA LA COMPRENSIÓN DE LOS DATOS BIOLÓGICOS

Si está indispensable controlar la calidad de los suelos, los conocimientos sobre su funcionamiento quedan lacunarios en particular puesto que el componente biológico que está al origen del conjunto de los procesos de transformación de la materia orgánica queda describir. En este ensayo, el objetivo esta mostrar el interés del enfoque multiparamétrico para prever el uso de los microorganismos como indicadores del estado de los suelos. Se propusieron marcadores celulares, moleculares y membranarios de las comunidades microbianas (bacterias y hongos) para determinar las abundancias de estos organismos bajo diferentes limitantes naturales (abril, junio, octubre) y antrópicos (pradera / grandes cultivos ; aporte de contaminante - el cobre 200 ppm -). Se completo la medida de estos marcadores estructurales por la medida de las actividades enzimáticas con el objetivo de aprehender eventuales vínculos entre estructura y función. Análisis multivariados (ANOVA) permitieron cuantificar el impacto de factores ambientales estudiados sobre los marcadores medidos. Acoplados a análisis de correlaciones entre los diferentes marcadores, este trabajo permite proponer elementos de reflexión para la elección de indicadores pertinentes del estado de los suelos.

Palabras clave

Suelos, bacterias, hongos, actividades enzimáticas, índice de calidad.

Si le concept de qualité des sols est encore sujet à controverses, il est de nos jours certain, qu'après l'air et l'eau, les sociétés sont confrontées à la nécessité de maintenir l'état de leurs sols, non seulement au regard de leur performance agronomique, mais également dans une perspective environnementale. Afin de permettre aux pouvoirs publics une gestion durable de ce patrimoine que constitue le sol, il est nécessaire d'élaborer des outils d'évaluation de son état qui permettent notamment de mesurer l'impact des perturbations liées aux activités humaines.

A l'heure actuelle, pour évaluer la qualité de l'eau ou de l'air, la législation se base sur la présence à un temps t de contaminants, dont les valeurs seuils ont été définies par rapport à des objectifs de santé publique. Il ne s'agit donc pas de définir un état « idéal » de ces ressources, et ces notions de qualité ne sont donc pas assujetties à la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes. En revanche, l'évaluation de l'état d'un sol implique de considérer son fonctionnement au regard de l'ensemble des services écosystémiques qu'il accomplit et nécessite une observation dynamique de cette ressource (Bastida *et al*., 2008).

Si connaissances et bon nombre de consensus existent autour des variables physicochimiques des sols (méthodes de détermination, rôles dans les propriétés structurales et dans les fonctions, impact sur la croissance des plantes…), les caractéristiques biologiques, quant à elles, demeurent mal connues. Ainsi, il n'existe pas ou peu de valeurs de référence pour ces variables biologiques qui puissent permettre la comparaison de sols soumis à différents usages, à l'exception éventuellement de certains indicateurs de la macrofaune. Ce constat provient notamment de la diversité des bioindicateurs proposés, de la diversité des contextes pédoclimatiques, de la distribution spatiale et de l'évolution temporelle des variables mesurées, mais également de l'absence de protocoles normalisés (Mele et Crowley, 2008).

Parmi les organismes vivants dans les sols, les communautés microbiennes assurent une grande partie des fonctions biologiques. La connaissance de leur structure (diversité et abondance des espèces) mais également de leurs fonctions (synthèse et sécrétion de protéines, lipides et autres polysaccharides...) semble donc être un moyen d'accéder à l'état biologique du sol et aux propriétés résultantes (fertilité, stabilité de la structure, dynamique des éléments). Or, sur la base des travaux relatés dans la littérature, il reste difficile de comprendre le déterminisme de l'ensemble de ces propriétés.

A l'heure actuelle, il est relativement courant de mettre en évidence des évolutions significatives des caractéristiques microbiologiques des sols qui soient consécutives aux changements de pratiques culturales (Anderson *et al*., 2003 ; Calbrix *et al*., 2007 ; Plassart *et al*., 2008) ou à l'apport de polluants (Avidano *et al*., 2005 ; Mikanova, 2006 ; Ranjard *et al*., 2006). Pourtant, la diversité des contextes dans lesquels ont été réalisées les études d'impact sur les sols, ajoutée à la diversité des méthodes utilisées rendent difficile l'interprétation des résultats et altèrent plus encore la signification de ces derniers (Kennedy et Gewin, 1997).

La mise au point de bioindicateurs microbiens nécessite tout particulièrement une démarche méthodologique pluridisciplinaire et l'établissement de référentiels permettant de valider ces outils à des fins prédictives et/ou rétrospectives. En effet, la problématique de développement de bioindicateurs est confrontée à deux niveaux de régulation liés à (1) la variabilité, la sensibilité et la robustesse du bioindicateur lui-même (organisme ou communautés d'organismes), mais aussi à (2) la validité de la variable descriptive de cet indicateur (protocole et méthodologie). S'il existe une multitude d'outils d'analyse de la biomasse microbienne, il semble que seule une approche pluridisciplinaire puisse permettre de pallier les biais méthodologiques inhérents à chacune des méthodes.

Dans ce contexte, notre étude a pour objectifs (1) de valider de nouveaux descripteurs des propriétés biologiques des sols, (2) de modéliser leur évolution spatio-temporelle, (3) d'évaluer l'impact de stress environnementaux (pesticides, éléments trace, pratiques agricoles, occupation des sols, valorisation de déchets…), sur l'état des sols sans interférence avec l'évolution propre des communautés microbiennes consécutives aux variations saisonnières, au travail du sol, à l'itinéraire technique… et enfin (4) de construire un (ou des) indice(s) d'état des sols dans des contextes pédoclimatiques différents.

Le projet se décline en trois volets successifs. Le premier volet (2005) a permis l'acquisition des valeurs de références de variables biologiques en sols agricoles limoneux non contaminés. Le second a consisté en l'étude des effets d'un polluant, le cuivre, en microcosmes (2006, 2007). Enfin, le travail se poursuit actuellement par l'étude *in situ* de l'impact de différents niveaux d'anthropisation (de l'impact du mode de gestion à l'impact de contaminants) sur les variables biologiques discriminantes étudiées dans les volets 1 et 2.

Cet article a pour ambition de révéler l'intérêt, mais également les limites, des approches à variables multiples dans la compréhension des données biologiques (signification des résultats) en vue de l'élaboration de modèles mathématiques. Pour tendre vers cet objectif, l'analyse proposée repose sur les résultats acquis dans le volet 1 de l'étude et se base sur l'étude des corrélations entre variables descriptives des communautés microbiennes.

UNE STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE À L'ÉCHELLE DE LA PARCELLE

L'étude a été réalisée en Haute Normandie sur deux sites distincts, Yvetot et Saint-Georges sur Fontaine (76).

Sites expérimentaux

Le site du lycée agricole d'Yvetot

Ce site dispose de plusieurs parcelles gérées en prairie temporaire, en prairie permanente et en grande culture. L'historique cultural de ces parcelles est bien maîtrisé sur une durée de 20 ans. 2 parcelles de référence ont été sélectionnées :
- 1 parcelle cultivée de manière intensive (parcelle de grandes cultures, labourée de façon conventionnelle, sans alternance de prairies) ;
- 1 parcelle en prairie permanente (parcelle implantée en 1968, pâturées la nuit par des vaches laitières ; cette parcelle n'a pas subi de mise en culture depuis son implantation et constitue donc une parcelle de référence non labourée et à couverture permanente).

Le site de Saint-Georges sur Fontaine

Ce site dispose de prairies permanentes et de parcelles de cultures avec un historique cultural maîtrisé sur une durée de 10 ans.

Deux parcelles de référence ont été sélectionnées :
- 1 parcelle cultivée de manière intensive (parcelle de grandes cultures, labourée de façon conventionnelle, sans alternance de prairies) ;
- 1 parcelle en prairie permanente (parcelle implantée avant guerre, pâturée en continu pendant 6 mois par des génisses ; cette parcelle n'a pas subi de mise en culture depuis son implantation et constitue donc une parcelle de référence non labourée et à couverture permanente).

Le travail repose donc sur l'analyse des résultats issus de ces 4 parcelles représentées par 20 échantillons géoréférencés et prélevés en avril, juin et octobre 2005 (200 échantillons - Saint-Georges n'a pas été échantillonné en octobre).

Stratégie d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage répond aux objectifs suivant : (1) déterminer des valeurs de références pour les sols limoneux de grande culture et prairie (2) estimer, à l'échelle de la parcelle, la variabilité spatiotemporelle des variables mesurées (3) déterminer, pour chaque variable biologique, une valeur moyenne caractéristique de la modalité étudiée.

L'horizon prospecté est l'horizon superficiel (0-10 cm). Trois prélèvements annuels (avril, juin et octobre) ont été effectués afin de déterminer la variabilité temporelle à l'échelle de la saison de chacune des variables. Chaque prélèvement terrain a été réalisé en triple exemplaire (chacune des répétitions terrain correspondant à un point homogène).

UN GRAND NOMBRE DE VARIABLES POUR DÉCRIRE UNE COMMUNAUTÉ MICROBIENNE

La biomasse microbienne, incluant les algues, les protozoaires, les champignons et les bactéries, présente une importante diversité et s'il a été montré que la part respective des bactéries et des champignons dans cette biomasse varie de façon importante selon les sols (De Ruiter *et al*., 1994), l'équilibre entre ces deux communautés est également conditionné par le mode de culture (Haynes, 1999 ; Plassart *et al*., 2008) et le niveau d'anthropisation. Ainsi, au-delà de la simple évaluation de la biomasse microbienne totale, l'analyse différentielle de ces deux communautés peut constituer un élément clef à la compréhension des systèmes.

Aussi dans ce travail, la biomasse microbienne totale, la biomasse fongique et la biomasse bactérienne ont été caractérisées indépendamment au travers de la mesure de variables quantitatives. L'ensemble de ces variables doit intégrer une base de données, pouvant permettre à plus ou moins long terme, le développement de modèles mathématiques. Cette analyse a été complétée par la mesure d'activités enzymatiques, représentatives des fonctions de recyclage des principaux bioéléments des sols.

Variables descriptives de la biomasse microbienne totale

L'estimation de la biomasse totale est rendue difficile par la diversité des organismes qui la constituent et par la sensibilité des différentes méthodes d'extraction de leurs constituants. Dans la littérature, deux approches sont communément utilisées, la quantification du carbone microbien et la quantification de l'ADN microbien. Dans le cas des sols cultivés, les résultats révèlent généralement des corrélations significatives entre ces deux variables (Marstop *et al*., 2000 ; Gangneux *et al*., sous presse). Dans ce travail, la quantification du carbone microbien a été réalisée selon les techniques classiques de fumigation-extraction (Jenkinson et Powlson, 1976 ; Vance *et al*., 1987). Cette méthode permet de quantifier en routine (Wu *et al*., 1990) la fraction vivante de la matière organique et permet également d'accéder au taux de renouvellement de la biomasse du sol (Chaussod *et al*., 1988). La quantification de l'ADN microbien, quant à elle, consiste en une extraction de l'ADN selon une procédure commercialisée (Fast DNA Spin Kit for soil, BIO 101) dite « bead-beating » suivie d'un dosage par spectrofluorimétrie (picogreen-molecular probes ; Hoechst 33258-Biorad). Cette méthode permet d'estimer la biomasse microbienne totale vivante et morte.

Variables descriptives de la biomasse fongique

Les champignons sont parmi les composants majeurs de la communauté microbienne du sol et représentent un pool dynamique de nutriments sous leur forme vivante et morte (Eash *et al*., 1996). Au contraire de celles des bactéries, l'écologie des champignons est surtout conditionnée par les caractéristiques globales du sol et moins par celles de leur micro-environnement (Cooke et Whipps, 1993). Par leur structure ramifiée, les mycéliums augmentent la cohésion des particules et contribuent ainsi à la stabilité structurale (Chantigny *et al*., 1997). Enfin, de nombreux travaux ont mis en évidence que la biomasse fongique répond rapidement aux changements de pratiques (Jordan *et al*., 1995 ; Bossio *et al*., 1998). A l'heure actuelle, bien qu'il n'existe aucune méthode normalisée de quantification de la biomasse fongique dans les sols, une grande variété d'approches existe pour évaluer ce compartiment. La plus répandue, historiquement, consistait en la mesure de la longueur ou du nombre des hyphes par microscopie. Fastidieuse, subjective et tendant à surestimer la biomasse fongique, cette technique a laissé place à d'autres approches. Des marqueurs biochimiques ont alors été proposés, comme la N-acétylglucosamine (monomère constitutif de la chitine pariétale), l'ergostérol (Grant et West, 1986), ou encore les phospholipides membranaires (Frostegard et Baath, 1996).

Au cours de cette étude la biomasse fongique a été estimée par :

Le dosage de l'ergostérol

Cette molécule spécifique de la membrane des Eumycètes est souvent choisie comme indicateur de la biomasse fongique métaboliquement active. En effet, il est communément admis qu'elle est rapidement minéralisée après la mort cellulaire et diverses sont les approches analytiques permettant sa mesure (Anderson *et al*., 1994 ; Ekblad *et al.,* 1998 ; Montgomery *et al.,* 2000 ; Larsen *et al.,* 2004 ; Mille-Lindblom *et al*., 2004 ; Butenschoen *et al*., 2007). Cependant nombreuses sont les controverses à ce sujet (Zhao *et al*., 2005). Aussi, dans ce travail, l'hypothèse posée est qu'en fonction de la méthode d'extraction, nous n'avons pas accès au même type d'ergostérol. L'ergostérol « libre », obtenu par simple agitation orbitale selon Gong *et al*., 2001 serait l'image de la biomasse fongique en cours de dégradation. L'autre obtenu par saponification selon Montgomery *et al*. (2000) modifié serait caractéristique de l'ergostérol total. L'ergostérol « lié » (ergostérol total - ergostérol libre) serait alors représentatif de la biomasse « viable ».

Le dosage des PLFA

Présents dans la membrane cytoplasmique de tous les microorganismes, tels que les bactéries ou les champignons, les acides gras phospholipidiques diffèrent non seulement par leur groupement attaché au phosphate, mais aussi par la nature de leurs acides gras. Ainsi, le profil de PLFAs permet d'accéder à une certaine image de la diversité microbienne. Cependant, certains PLFAs contenus dans les hyphes seraient spécifiques des champignons. C'est le cas du C18 : 2ω6,9, appelé acide linoléique, spécifique des ectomycorhizes (Olsson *et al*., 1999, Frostegard et Baath, 1996 ; Kandeler *et al*., 2000 ; Baath, 2003 ; Ruess *et al*., 2002) et du C16 : 1 ω 5 spécifique des endomycorhizes, mesurés dans cette étude. D'autre part, de même que l'ergostérol, les PLFAs seraient représentatifs de la biomasse vivante dans la mesure où ils seraient rapidement dégradés après la mort cellulaire (Drenovsky *et al.,* 2004).

La quantification des ADN fongiques totaux par PCR en temps réel

Avec le développement des méthodes de biologie moléculaire, il est enfin envisageable d'accéder à l'ensemble des champignons présents dans un sol en exploitant les similarités de séquences de gènes ubiquitaires des ARN ribosomaux 18S. La conception d'amorces universelles (White *et al*., 1990 ; Borneman et Hartin, 2000), conjointement au développement des méthodes de PCR quantitative, permet maintenant d'envisager ces ADNr18S comme cible privilégiée pour accéder à l'abondance des populations fongiques. L'analyse des séquences nucléotidiques de ces gènes a permis de dessiner un couple d'amorces spécifiques de ces ADNr18 S (dérivées de Borneman et Hartin, 2000 ; Anderson *et al*., 2003) et de développer une méthode fiable et reproductible d'estimation de la biomasse fongique dans sa globalité (Plassart *et al*., 2008 ; Gangneux *et al*., sous presse). Toutefois, la grande variabilité du nombre d'opérons ADNr au sein des génomes fongiques ne permet pas de disposer d'une méthode de quantification absolue de ces microorganismes mais plutôt d'une estimation de ces populations basée sur une répartition homogène des espèces fongiques inféodées à un type de sol (Sugiyama *et al*., 1996 ; Kirk *et al*., 2004).

Variables descriptives de la biomasse bactérienne

A l'instar des méthodes d'estimation de la biomasse fongique et malgré une abondante littérature, la biomasse bactérienne n'a été appréhendée que de façon très partielle jusqu'alors, et l'estimation quantitative de ce compartiment reste délicate. En effet le dénombrement des bactéries cultivables ne donne accès qu'à un faible pourcentage de la population (1 à 10 %, Torsvick *et al*., 1998) et les méthodes moléculaires basées sur l'extraction de l'ADN sont soumises également à de nombreux biais et ne permettent pas toujours de détecter les modifications de la diversité en raison de la similarité des populations majoritaires (Martin-Laurent *et al*., 2001). Aussi, dans ce travail deux approches ont permis d'appréhender les abondances bactériennes :

(1) Une approche globale des communautés, par le dénombrement des bactéries mésophiles sur milieu R2A, basée sur la cultivabilité des microorganismes qui, malgré les biais reconnus, apporte des informations sur la qualité des sols (Cohen *et al.*, 2005), mais également par amplification génique des ADNr 16S ciblés par l'utilisation d'un jeu d'amorces « universelles » des ARN ribosomaux bactériens (Marchesi *et al*., 1998 ; Muyzer *et al.,* 1993). Cette approche possède ses propres limites, liées à l'efficacité d'extraction de l'ADN du sol, à l'efficacité d'amplification des séquences cibles, et à « l'universalité » des amorces employées, mais offre cependant un accès à une plus grande part de la microflore du sol (Tiedje *et al.,* 1999 ; Ranjard *et al.,* 2000).

(2) Une approche spécifique basée sur la quantification des *Pseudomonas*, qui s'appuie sur le fait que ces bactéries sont un des genres majoritaires dans les sols, en particulier dans les sols pollués (Kozdroj et Van Elsas, 2001 ; Chao *et al*., 2004 ; Viti, 2006). Elles font d'ailleurs partie des populations les plus étudiées notamment au niveau de la rhizosphère où elles semblent jouer un rôle clé (Weller *et al.,* 2002 ; Costa *et al.,* 2007). Son caractère ubiquiste et sa grande capacité d'adaptation peuvent en faire un genre dont la nature et la structure des espèces peuvent refléter le comportement du milieu (Ramos et al., 1997). En 2006, Brandt *et al*. ont montré que les *Pseudomonas* forment un bioindicateur sensible et pertinent pour l'étude de l'impact du cuivre. L'abondance de ces bactéries a été obtenue par dénombrement sur milieu de culture sélectif CFC associée à une analyse par PCR en temps réel à partir d'amorces optimisées ciblant le gène oprF monocopie et spécifique des *Pseudomonas* (Bodilis *et al*., 2004).

UN GRAND NOMBRE DE VARIABLES POUR APPRÉHENDER UN FONCTIONNEMENT DU SOL

Les plantes, les microorganismes et la pédofaune produisent une grande diversité d'enzymes qui jouent un rôle essentiel dans les fonctions du sol. Elles proviennent d'une part de la sécrétion d'enzymes exocellulaires et d'autre part de la libération d'enzymes intracellulaires lors de la lyse des cellules végétales, animales ou microbiennes. Impliquées dans les étapes clés des cycles biogéochimiques des éléments nutritifs tels que C, N, P, S, elles constituent en ce sens des indicateurs du fonctionnement du sol (Nannipieri et al., 2003). La diversité fonctionnelle microbienne inclut de nombreux processus métaboliques. Aussi, pour l'évaluer, une large gamme d'activités enzymatiques doivent être prises en considération. Dans cette étude, ont été mesurées les activités hydrolases les plus couramment étudiées (déshydrogénase (DH), β-glucosidase (GLU), N-acétyl glucosaminidase (NAG), phosphatase acide (PAC), phosphatase alcaline (PAL), arylsulfatase (ARYL), uréase (URE). De nombreux auteurs ont montré que ces activités étaient sensibles aux pratiques culturales (Dodor et Tabatabai, 2003 ; Bandick et Dick, 1999), aux contaminants (Ekenler et Tabatabai, 2002) aux pesticides (Tu, 1981, 1993 ; Antonious, 2003), aux éléments traces métalliques (Renella *et al*., 2003 ; Casucci *et al*., 2003), à l'apport de matières organiques (Bol *et al*., 2003). Les changements observés correspondent à la fois à des variations de l'expression des gènes et aux facteurs environnementaux qui interviennent sur l'expression des activités enzymatiques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des analyses statistiques (corrélations et ANOVA) ont été effectuées entre les variables descriptives des compartiments étudiés en considérant l'ensemble des 200 échantillons de terrain récoltés au cours de la première année. Tandis que les corrélations renseignent sur les relations entre variables descriptives, les ANOVA imbriquées permettent d'affiner la signification des variables et illustrent alors le déterminisme de la structure des communautés dans la mesure où elles permettent une hiérarchisation des impacts des différents facteurs étudiés.

Pour l'ensemble des analyses, les corrélations selon Spearman et selon Pearson ont été effectuées dans la mesure où le jeu de données le permet. Les résultats indiquant des tendances semblables, seuls sont rapportés dans ce travail les coefficients de corrélation linéaires selon Pearson.

Analyse des variables descriptives du compartiment bactérien : Relation avec la biomasse totale

Dans le *tableau 1,* sont reportés les coefficients de corrélation linéaire entre les variables descriptives de la biomasse totale (C-microbien et ADN-microbien) et les variables descriptives des communautés bactériennes.

Le *tableau 2* consigne les analyses de variance avec facteurs imbriqués réalisées dans l'objectif de quantifier l'effet de chacun des facteurs étudiés (1) la pratique : prairie, grande culture (2) le site : Yvetot, Saint-Georges sur fontaine, (3) la date de prélèvement : avril, juin, octobre (incluant l'effet saison, l'état de la rhizosphère sous dépendance du cycle cultural).

Dans le cas des sols agricoles et des pratiques culturales très contrastées qui font l'objet de cette étude, la biomasse totale est essentiellement déterminée par les modes de culture *(tableau 2)* comme le révèlent les deux variables mesurées. La date de prélèvement expliquant moins de 20 % de la variance, ces variables semblent de pertinents candidats à l'évaluation des systèmes de culture. Cependant, la question demeure de leur sensibilité respective. En effet, si à l'instar de Marstop *et al.* (2000), on constate une corrélation significative entre C-mi-

Tableau 1 : Matrice de corrélation entre les variables descriptives du compartiment bactérien - Coefficient de corrélation de Pearson ; n = 200. En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha = 0,050 (Test bilatéral).

Table 1 : *Correlation matrix between the different bacterial descriptors.*

	C-microbien	ADN microbien	ADNr 16S	Cultivables R2A	*Pseudomonas* cultivables CFC	*Pseudomonas* totaux opr F
C-microbien	1,00	**0,59**	**0,58**	**0,40**	**-0,43**	**-0,44**
ADN-microbien	**0,59**	1,00	**0,78**	**0,19**	**-0,48**	**-0,57**
ADNr16S	**0,58**	**0,78**	1,00	0,08	**-0,44**	**-0,67**
Cultivables R2A	**0,40**	**0,19**	0,08	1,00	0,07	0,10
Pseudomonas cultivables CFC	**-0,43**	**-0,48**	**-0,44**	0,07	1,00	**0,28**
Pseudomonas totaux oprF	**-0,44**	**-0,57**	**-0,67**	0,10	0,28	1,00

Tableau 2 : Effet de la pratique, du site et de la date sur les variables descriptives du compartiment bactérien - Pourcentage explicatif de la variance, année 2005, n = 200. X : l'importance des résidus ne permet pas d'expliquer la variance par les modalités testées.

Table 2 : *Impact of (i) agricultural practices, (ii) study site, and (iii) sampling date on the bacterial compartment.*

Variables descriptives	Pratique	Site	Date	Résidus
C- microbien	**69 %**	6 %	14 %	
ADN- microbien	**58 %**	7 %	20 %	
ADNr16S	**75,63 %**	0 %	8,51 %	
Cultivables R2A	0 %	19,16 %	**38,58 %**	
Pseudomonas cultivables CFC	20,50 %	**53,25 %**	6,93 %	**X**
Pseudomonas totaux PCRq oprF	**41,23 %**	18,51 %	22,91 %	

crobien et ADN-microbien *(tableau 1)*, la valeur du coefficient de corrélation (0,59) n'est pas très élevée notamment dans la mesure où cette étude ne porte que sur un seul type de sol. Ce constat rappelle que ces deux variables n'intègrent pas les mêmes organismes (Gangneux *et al*., sous presse). Elles reposent sur des extractions différentes dont les rendements sont fonction, entre autre, du type de sol et de la nature des cellules.

Concernant la description des communautés bactériennes dans leur ensemble on peut distinguer deux types de variables : celles qui reposent sur la cultivabilité des micro-organismes et celles fondées sur la quantification des génomes. Ces deux variables ne sont pas corrélées *(tableau 1),* suggérant que la fraction cultivable des bactéries ne peut être considérée comme le reflet de la communauté bactérienne globale. De plus, ces deux variables répondent différemment aux modalités testées *(tableau 2)*. Ainsi, la date de prélèvement est un facteur explicatif prépondérant pour l'abondance des bactéries cultivables. La date de prélèvement inclut différents facteurs environnementaux dont le climat, l'état de la rhizosphère, la date du dernier labour. Tous ces facteurs sont susceptibles de modifier les caractéristiques de l'habitat des microorganismes, tels que la nature et la quantité des sources en carbone disponibles, le pH, la température, etc. Or tous ces paramètres sont des déterminants de la croissance bactérienne. Ainsi la composition relative de la communauté peut varier rapidement en fonction de ces conditions environnementales.

Les variables fondées sur les méthodes moléculaires sont, quant à elles, essentiellement dépendantes de la pratique culturale. Si l'on exclut, entre autre, l'hypothèse selon laquelle ce constat traduirait une efficacité d'amplification (rendement d'extraction de l'ADN et PCR) moindre en grande culture on pourrait alors émettre l'hypothèse que ces variables descriptives reflètent la structure de la communauté déterminée par les pressions de sélection liées à l'histoire de la parcelle et représentent, *in fine*, une autre échelle temporelle de réponse.

De façon particulièrement intéressante, l'indicateur spécifique que constitue le genre *Pseudomonas* est inversement corrélé aux descripteurs globaux quelle que soit la variable proposée. Ceci peut s'expliquer entre autres par un enrichissement reconnu en *Pseudomonas* dans les sols de culture tandis que la biomasse microbienne dans ces sols est moindre. Cependant, tandis que l'abondance des *Pseudomonas* est conditionnée par la pratique culturale, l'effet site observé rappelle l'importance de la niche écologique pour ce genre bactérien (Bodilis *et al.*, 2004).

Tableau 3: Matrice de corrélation entre les variables descriptives du compartiment fongique. Coefficient de corrélation de Pearson; n = 200. En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha = 0.050 (Test bilatéral).
Table 3: *Correlation matrix between the different fungal descriptors.*

	C16	C18	Ergostérol Total	Ergostérol Libre	ADNr 18S
PLFA C16	1,00	**0,82**	**0,34**	**0,34**	**0,32**
PLFA C18	**0,82**	1,00	**0,11**	**0,14**	**0,17**
Ergostérol total	**0,34**	**0,11**	1,00	**0,68**	**0,50**
Ergostérol Libre	**0,34**	**0,14**	**0,68**	1,00	**0,69**
ADNr 18S	**0,32**	**0,17**	**0,50**	**0,69**	1,00

Tableau 4 : Effet de la pratique, du site et de la date sur les variables descriptives du compartiment fongique. Pourcentage explicatif de la variance, année 2005; n = 200. X: l'importance des résidus ne permet pas d'expliquer la variance par les modalités testées.
Table 4: *Impact of (i) agricultural practices, (ii) study site, and (iii) sampling date on the fungal compartment.*

Variables descriptives	Pratique	Site	Date	Résidus
PLFA C16	**44,9 %**	0 %	12,3 %	
PLFA C18	14,41 %	0 %	31,08 %	**X**
Ergostérol total	**60,87 %**	7,29 %	9,20 %	
Ergostérol libre	13,12 %	0 %	**77,06 %**	
ADNr 18S	18,33 %	28,07 %	29,64 %	

Analyse des variables descriptives du compartiment fongique

Dans le *tableau 3* sont reportés les coefficients de corrélation linéaire entre les variables descriptives de la biomasse fongique

Le *tableau 4* reporte les analyses de variance avec facteurs imbriqués effectués avec l'ensemble des variables descriptives du compartiment fongique.

Pourcentage explicatif de la variance, année 2005; n = 200. X: l'importance des résidus ne permet pas d'expliquer la variance par les modalités testées.

Bien que les différentes variables mesurées ne décrivent pas les mêmes populations, on constate des corrélations significatives entre les deux types de PLFAs C16 et C18 suggérant une évolution commune entre ectomycorhizes et endomycorhizes. Cependant, l'analyse des ANOVA met en évidence des résidus importants pour les valeurs de PLFA C18 ce qui pourrait traduire des problèmes expérimentaux ou encore un déterminisme autre que les facteurs analysés.

Par ailleurs, ces marqueurs membranaires spécifiques sont, dans une moindre mesure, corrélés aux marqueurs généraux constitués par l'ergostérol (total ou libre) et l'ADNr 18S également corrélés entre eux *(tableau 3).* Cependant, toutes ces variables, bien que corrélées entre elles, répondent différemment aux modalités testées dans l'étude. Ainsi d'après les analyses de la variance, les marqueurs membranaires PLFA C16 et l'ergostérol total sont affectés par la pratique tandis que l'ergostérol libre est sensible à la date de prélèvement et l'ADNr 18S serait une variable non seulement sensible à la date mais également au site *(tableau 4).* Ces résultats pourraient s'expliquer par l'importance des paramètres physicochimiques des sols dans la décomposition des cellules (température, humidité...) ainsi l'ergostérol libre dont l'hypothèse est qu'il représente la biomasse fongique en cours de dégradation serait particulièrement sensible à la date de prélèvement. De même, il existerait une proportion d'ADN fongique acellulaire dans le sol, hypothèse reliée à la corrélation observée avec l'ergostérol libre (0,69). En d'autres termes, l'ADN subsisterait dans le sol après la mort cellulaire. Cette question, traitée précédemment dans la littérature, a conduit à des conclusions contradictoires. Ainsi, les acides nucléiques nus semblent pouvoir s'adsorber aux particules d'argile rendant l'ADN particulièrement résistant à toute dégradation chimique ou enzymatique à moyen terme (6 mois à 1 an) (Levy-Booth *et al.,* 2007). Inversement, Herdina *et al.* (2004) ont montré que l'introduction d'ADN fongique nu dans un sol conduisait à une dégradation de 92 % après 4 jours. D'après nos résultats, il semble que les paramètres physicochimiques du sol puissent conditionner le turn-over de ces composés.

Analyse des variables descriptives de l'état fonctionnel

L'origine des enzymes du sol peut être multiple, végétale, animale, microbienne. Le *tableau 5* reporte les corrélations linéaires

Tableau 5: Matrice de corrélation entre la biomasse microbienne et les activités enzymatiques dosées *in situ*. Coefficient de corrélation de Pearson; n = 380, années 2005, 2006, 2007.

Table 5: *Correlation matrix between microbial biomass and in situ soil enzymatic activities.*

	ADN -microbien	PAC	PAL	GLU	NAG	DH	URE	ARYL
ADN-microbien	1,00	**0,31**	**0,15**	**0,25**	**0,35**	**0,30**	-0,05	**0,26**
PAC	**0,31**	1,00	**0,15**	**0,58**	**0,31**	**0,32**	**0,11**	-0,03
PAL	**0,15**	**0,15**	1,00	**0,18**	-0,02	**0,38**	**-0,13**	0,07
GLU	**0,25**	**0,58**	**0,18**	1,00	**0,17**	**0,26**	-0,05	-0,08
NAG	**0,35**	**0,31**	-0,02	**0,17**	1,00	**0,22**	-0,01	**0,29**
DH	**0,30**	**0,32**	**0,38**	**0,26**	**0,22**	1,00	0,01	0,07
URE	-0,05	**0,11**	**0,13**	0,05	0,01	0,01	1,00	**-0,25**
ARYL	**0,26**	-0,03	0,07	-0,08	**0,29**	0,07	**-0,25**	1,00

DH: Déshydrogénase; GLU: β-glucosidase; NAG: N-acétyl glucosaminidase; PAC: Phosphatase acide
PAL: Phosphatase alcaline; ARYL: Arylsulfatase; URE: Uréase

Tableau 6: Effet de la pratique, du site et de la date sur les activités enzymatiques dosées *in situ*. Pourcentage explicatif de la variance; n = 200, année 2005.

X: L'importance des résidus ne permet pas d'expliquer la variance par les modalités testées.

Table 6: *Impact of (i) agricultural practices, (ii) study site, and (iii) sampling date on in situ enzymatic activities.*

Activités enzymatiques	Pratique	Site	Date	Résidus
PAC	**65,6 %**	0 %	14,7 %	
PAL	0 %	0 %	**43,4 %**	**X**
GLU	**21,6 %**	**31,7 %**	**36,7 %**	
NAG	**41,8 %**	0 %	**28,3 %**	
DH	14,7 %	3,2 %	26,5 %	**X**
URE	0 %	0 %	**93,7 %**	
ARYL	0 %	22,8 %	**40,2 %**	X

DH: Déshydrogénase; GLU: β-glucosidase; NAG: N-acétyl glucosaminidase; PAC: Phosphatase acide
PAL: Phosphatase alcaline; ARYL: Arylsulfatase; URE: Uréase
X: L'importance des résidus ne permet pas d'expliquer la variance par les modalités testées.

entre les différentes activités enzymatiques mesurées *in situ* dans cette étude. Si l'intérêt de ces corrélations peut être sujet à controverses, elles permettent néanmoins de vérifier l'existence d'un lien étroit entre l'abondance de la biomasse microbienne et la majorité des activités ciblées (à l'exception de l'activité uréasique) et mettent en exergue des corrélations significatives entre les différentes activités. Ce constat n'est pas surprenant compte tenu des modalités de choix de ces activités. Elles sont toutes impliquées dans les grands cycles biogéochimiques, connus pour être dépendants de la biomasse microbienne, et souvent intimement liés les uns aux autres jusqu'à être parfois interdépendants.

Le tableau 6 consigne les résultats de l'ANOVA imbriquée réalisée afin de déterminer l'impact des différents facteurs étudiés sur ces activités.

La variance des différentes activités enzymatiques n'est pas expliquée par les mêmes facteurs. C'est ainsi que la phosphatase acide et, dans une moindre mesure la NAG, sont majoritairement liées à la pratique culturale tandis que l'activité uréase, indépendante de l'abondance de la biomasse, serait fonction de la date de prélèvement. Cette activité peut être régulée par de très nombreux facteurs parmi lesquels la teneur en ammonium du sol (Krajewska, 2009). Or dans les systèmes cultivés, la teneur en ammonium est soumise aux variations saisonnières

liées à la fois à des phénomènes biologiques, tel que la variabilité du taux de minéralisation basal du sol, ou encore à des interventions anthropiques comme l'apport de fertilisants chimiques ou organiques. Si, au regard des corrélations entre les activités enzymatiques, il n'y a qu'un pas à faire pour proposer de s'intéresser à un panel plus restreint, ce serait sans compter sur les conditions spécifiques de régulation de ces activités. En effet, la présence des activités enzymatiques *in situ* relève non seulement de la structure des communautés, des mécanismes d'expression cellulaire de ces enzymes variable selon les espèces, mais également des systèmes de régulation induits par les contraintes environnementales. Ainsi, par exemple, les phosphatases microbiennes sont répressibles par la teneur en phosphore du sol (Hollander, 1971). Bien que corrélées entre elles, les activités enzymatiques répondent différemment aux impacts d'origine naturelle ou anthropique, et représentent ainsi différents états du sol. Ainsi, il semble primordial dans le cadre de l'étude de la diversité fonctionnelle des sols de maintenir encore l'analyse d'un panel d'activités enzymatiques comme le soulignaient Nannipieri *et al*., en 2002.

Dans la suite de ce travail, nous avons tenté d'établir des liens entre structure des communautés et fonctions enzymatiques mesurées dans les sols.

Relations entre structure et fonctions

Une approche de ces relations peut résider dans l'analyse des corrélations entre variables descriptives des différents compartiments (structurel et fonctionnel). Ainsi ont été calculés les coefficients de corrélation entre deux marqueurs moléculaires des compartiments bactérien et fongique et toutes les activités enzymatiques. Le *tableau 7* reporte les liens entre l'expression des différentes activités enzymatiques et la présence de bactéries et champignons dans les systèmes étudiés.

Au regard des corrélations, parmi les activités enzymatiques mesurées, il est possible de distinguer trois groupes. Les activités phosphatases acide et N-acétyl-glucosaminidase sont corrélées au compartiment microbien dans son ensemble (bactéries ou champignons). Elles sont d'ailleurs fortement impactées par la pratique. Les activités uréasique et phosphatase alcaline, sont toutes deux indépendantes de l'abondance en bactéries comme en champignons, et liées à la date de prélèvement (*tableau 6)*. Enfin, les activités β-glucosidases et déshydrogénases semblent dépendre de la présence de bactéries ; les facteurs pratiques culturales et date de prélèvement influent également sur leur présence. Pourraient-elles être considérées comme une signature préférentielle du compartiment bactérien ?

Ainsi, malgré la diversité des organismes qui les produisent (notion de redondance), les systèmes de régulations de leur expression (constitutives, régulées…), la complexité de leur mesure (biais expérimentaux) et sans même intégrer les notions de variabilité spatiotemporelle à l'échelle parcellaire, toutes ces activités semblent répondre à un facteur dominant le déterminisme de leur présence.

CONCLUSION

Cette analyse a confirmé qu'au-delà de leur variabilité spatiotemporelle, les communautés microbiennes peuvent être envisagées comme indicateurs de l'état des sols. Toutes les observations, de la communauté dans son ensemble à l'espèce, renseignent sur cet état et reflètent les impacts des activités humaines. Cependant chaque organisme, ou communauté d'organismes, répond à un facteur naturel ou anthropique selon un modèle dont le déterminisme repose à la fois sur les caractéristiques physiologiques du (ou des) individus mais également sur les interactions avec le milieu. C'est pourquoi de nombreux travaux reposent sur l'analyse de la diversité des communautés sous différentes contraintes mais ces données restent souvent qualitatives. La difficulté réside dans le passage de l'observation qualitative d'une modification, à la « quantification » d'un impact.

D'autre part, selon la nature de la variable descriptive choisie, l'observation peut révéler différents états des communautés en fonction du type d'impact, de la cinétique de réponse de l'écosystème et de la vitesse de turn-over de la variable elle-même. A titre d'exemple, les marqueurs moléculaires des communautés bactériennes sont l'image de la structure des communautés résultant de l'historique de la parcelle. Ils ne sont que peu sensibles à la date de prélèvement dans la mesure où l'écologie de ces organismes est essentiellement conditionnée par

Tableau 7 : Matrice de corrélation entre les marqueurs moléculaires des compartiments bactérien et fongique et les activités enzymatiques résultantes. Coefficient de corrélation de Pearson ; n = 200, année 2005. En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha = 0.050 (Test bilatéral).

Table 7: *Correlation matrix between molecular bacterial and fungal markers and in situ enzymatic activities.*

Activités enzymatiques	Marqueurs moléculaires	
	Compartiment bactérien (ADNr16S)	Compartiment fongique (ADNr18S)
PAC	**0,46**	**0,41**
PAL	0,09	-0,12
GLU	**0,48**	0,14
NAG	**0,61**	**0,56**
DH	**0,47**	0,13
URE	-0,02	0,03

leur micro-environnement. Dans le cas des champignons dont l'écologie est plus sensible aux caractéristiques globales du sol, ces marqueurs moléculaires sont dépendants de la date de prélèvement. L'ADN, libéré lors de la lyse des cellules, est plus ou moins rapidement dégradé selon les conditions physicochimiques du sol qui sont elles-mêmes fonctions des conditions climatiques, d'où une variable très sensible soumise à nombre de paramètres externes. Les marqueurs membranaires tels que les PLFAs fongiques et l'ergostérol total sont des variables robustes essentiellement dépendantes de la pratique culturale tandis que l'ergostérol libre en représentant la fraction de la biomasse en décomposition est également sensible aux nombreux paramètres externes. Au-delà de ces marqueurs de structure existent des marqueurs fonctionnels. Ces derniers sont particulièrement d'intérêt dans la mesure où leur présence résulte de la structure et de l'expression des communautés. Ils intègrent les différents facteurs du déterminisme de l'état des communautés (présence et statut métabolique).

Malgré l'existence d'une variabilité spatiotemporelle et analytique importante (20 % < Cv < 100 %) observée pour l'ensemble des variables descriptives sur lesquelles repose ce travail, et malgré le fait que toutes ces données ne sont issues que d'un seul type de sol, les résultats valident l'hypothèse selon laquelle les données biologiques peuvent être envisagées comme indicateurs de l'état des sols.

Enfin, l'analyse des variables descriptives a également permis de hiérarchiser les facteurs déterminant la structure des communautés microbiennes dans nos conditions expérimentales (1) effet pratique, (2) effet site, (3) effet date. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour l'élaboration d'indice de « qualité des sols ».

Mais le chemin est encore long pour établir un indice qui intègre non seulement la compréhension des lois de réponse des organismes indicateurs, mais demande également de définir la ou les notions de qualité au-delà d'un état idéal. Il ne faut pas oublier que l'un des déterminants essentiels de la composition des communautés microbiennes est le type de sol (Girvan *et al.*, 2003). Or, chaque étude, relayée dans la littérature, porte sur un sol différent.

Si l'on recherche le terme « qualité des sols » sur la base de données « ISI Web of Knowledge » on accède à plus de 9000 références, ce qui démontre l'étendue du sujet. Cependant, si l'on attache à ces premiers termes celui d'« indice », on obtient seulement 934 résultats et très peu parmi les références offrent un indice susceptible objectivement de mesurer la qualité d'un sol (Bastida *et al.*, 2008).

Ceci souligne le fait qu'il est difficile de rendre objective une ère de la science « subjective par nature » et encore difficile à quantifier (Sojka et Upchurch, 1999 ; Lee *et al.*, 2006).

Actuellement, il est difficile d'envisager l'élaboration « d'indices de qualité des sols » du fait du manque de connaissances sur le fonctionnement des sols compte tenu de l'absence de référentiel, de la complexité des phénomènes analysés et de la difficulté à les appréhender et à les quantifier. Un monde obscur à l'homme qui ne peut se résoudre, ni même se conceptualiser, par une équation.

La part de l'inconnu est encore trop importante pour faire de la microbiologie des sols une science exacte pouvant prétendre à être outil d'aide à la décision.

Ainsi donc l'intérêt de ces recherches réside simplement dans les pierres qu'elles apportent à l'édifice pour permettre à cette ère de la science de quitter le subjectif.

REMERCIEMENTS

Ce travail a nécessité une quantité considérable de campagnes de prélèvement et d'analyses. Nos remerciements vont à Caroline Bailleul, Agathe Brault, Sylvie Desaire, Isabelle Touton et Mehdi Belkacem.

Pour l'acquisition des données expérimentales *in situ*, merci au GAEC Valleran et au Lycée Agricole d'Yvetôt.

Merci également à Daniel Tessier et Eliane Huard pour leur collaboration.

Enfin de tels projets ne voient le jour que grâce au soutien de partenaires sensibles aux préoccupations environnementales. Merci à L'**ADEME,** à **l'INRA** et à la **Région Haute Normandie**.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson P., Davidson C.M., Littlejohn D., Ure A.M., Shand C.A., Cheshire M.V., 1994 - Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography. Talenta 41, 711-720.

Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I., 2003 - Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environ. Microbiol. 5, 36-47.

Antonious G.F., 2003 - Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity. Journal of environmental science and health. Part B. Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes 38, 479-488.

Bååth E., 2003 - The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. Microb. Ecol. 45, 373-383.

Bandick A.K., et Dick R.P., 1999 - Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biol. Biochem. 31, 1471-1479.

Bastida F., Zsolnay A., Hernández T., García C., 2008 - Past, present and future of soil quality indices : a biological perspective Geoderma 147,159-171.

Bodilis J., Calbrix R., Guérillon J., Mérieau A., Pawlak B., Orange N., Barray S., 2004 - Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of Pseudomonas fluorescens and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. System. Appl. Microbiol. 27, 93-108.

Bol R., Kandeler E., Amelung W., Glaser B., Marx M.C., Preedy N., Lorenz K., 2003 - Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme activities in a temperate grassland. Soil Biol. Biochem. 35, 1411-1421.

Borneman J., Hartin R.J., 2000 - PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4356-4360.

Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J., 1998 - Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. Microb. Ecol. 36, 1-12.

Butenschoen O., Poll C., Langel R., Kandeler E., Marhan S., Scheu S., 2007 - Endogeic earthworms alter carbon translocation by fungi at the soil-litter interface. Soil Biol. Biochem. 39, 2854-2864.

Calbrix R., Barray S., Chabrerie O., Fourrie L., Laval K., 2007 - Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. Appl. Soil Ecol. 35, 511-522.

Casucci C., Okeke B.C., Frankenberger W.T., 2003 - Effects of mercury on microbial biomass and enzyme activities in soil. Biol. Trace Elem. Res. 94, 179-191.

Chantigny M.H., Angers D.A., Prévost D., Vézina L-P., Chalifour F.P., 1997 - Soil aggregation and fungal and bacterial biomass under annual and perennial cropping systems. Soil Sci. Soc. Am. J. 61, 262-266.

Chao W.L., Hsu S.F., 2004 - Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. Soil Biol. Biochem. 36, 479-487.

Chaussod R., Houot S., Guiraud G., Hétier J.M., 1988 - Nitrogen in agricultural soils, Elsevier, London pp. 312-326.

Cohen M. F., Yamasaki H., Mazzola M., 2005 - Brassica napus seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. Soil Biol. Biochem. 37, 1215-1227.

Cooke et Whipps., 1993 - Ecophysiology of fungi, Blackwood Oxford ed.

Costa R., Gomes N.C.M., Krögerrecklenfort E., Opelt K., Berg G., Smalla K., 2007 - Pseudomonas community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. Environ. Microbiol. 9, 2260-2273.

D-MOSTRA 2001-2004, "Restauration de fonctions et propriétés des sols de grande culture intensive. Effets de systèmes de culture alternatifs alternatifs sur les matières organiques et la structure des sols limoneux, et approche du rôle fonctionnel de la diversité biologique des sols.", Rapport intermédiaire, Coordination: May Balabane, Février 2004.

De Ruiter P.C., Neutel A.M., Moore J.C., 1994 - Modelling food webs and nutrient cycling in agro-ecosystems. Trends Ecol. Evol. 9, 378-383.

Dodor D.E. et Tabatabai M.A., 2003 - Effect of cropping systems on phosphatases in soils. J. Plant Nutr. Soil Sci. 166, 7-13.

Drenovsky R.E., Elliott G.N., Graham K.J., Scow K.M., 2004 - Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 36, 1793-1800.

Eash N.S., Stahl P.D., Parkin T.B., Karlen D.L. (1996) A simplified method for extraction of ergosterol from soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 60, 468-471.

Ekblad A., Wallander H., Nasholm T., 1998 - Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. New Phytol. 138, 143-149.

Ekenler M. et Tabatabaï M.A., 2002 - Effects of trace elements on β-glucosaminidase activity in soils. Soil Biol. Biochem. 34, 1829-1832.

Frostegard A., Baath E., 1996 - The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol. Fertil. Soils 22, 59-65.

Gangneux C., Akpa-Vinceslas M., Sauvage H., Desaire S., Houot S., and Laval K., sous presse - Fungal bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from agricultural silty soils: Relationships with chloroform labile carbon. Soil Biol. Biochem., sous presse

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. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1800-1809.

Gong P., Guan X., Witter E., 2001 - A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. Appl. Soil Ecol. 17, 285-289.

Grant W.D., et West A.W., 1986 - Measurement of ergosterol, as indicators of microbial biomass. J. Microbiol. Methods 6, 47-53.

Haynes R.J., 1999 - Labile organic matter fractions and aggregate stability under short-term, grass-based leys. Soil Biol. Biochem. 31, 1821-1830.

Haynes R.J., 1999 - Labile organic matter fractions and aggregate stability under short-term, grass-based leys. Soil Biol. Biochem. 31, 1821-1830.

Herdina N.S., Jabaji-Hare S., Ophel-Keller K., 2004 - Persistence of DNA of Gaeumannomyces graminis var. tritici in soil as measured by a DNA-based assay. FEMS Microbiol. Ecol. 47, 143-152.

Hollander V.P., 1971 - Acid phosphatases. In: Boyer P.D. (ed) The enzyme. Academic Press, New York, pp 449-498.

Jenkinson D.S., Powlson D.S., 1976 - The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. Soil Biology et Biochemistry 8, 203-208. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. Soil Biol. Biochem. 8, 209-13.

Jordan D., Kremer R.J., Bergfield W.A., 1995 - Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. Biol. Fertil. Soils 19, 297-302.

Kandeler E., Tscherko D., Bruce K.D., Stemmer M., Hobbs P.J., Bardgett R.D., Amelung W., 2000 - Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biology and Fertility of Soils 32, 390-400.

Kennedy, A.C., Gewin, V.L., 1997 - Soil microbial diversity: present and future considerations. Soil Sci. 162, 607-617.

Kirk, J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T., 2004- Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods 58: 169-188.

Kozdroj J., Van Elsas J.D., 2001 - Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. J. Microbiol. Met. 43, 197-212.

Krajewska B., 2009 - Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. J. Mol. Catal. B Enz. 59, 9-21.

Larsen T., Axelsen J., Ravn H.W., 2004 - Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 1026, 301-304.

Lee C.H., Wu M.Y., AsioV.B., Zueng-Sang C., 2006-Using a soil quality indexto assess the effects of applying swine manure compost on soil quality under a crop rotation system in Taïwan. Soil. Sci. 171, 210-222

Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R., Klironomos J.N., Paul K.P., Swanton C.J., Trevors J. T, Dunfield K.E., 2007 - Cycling of extracellular DNA in the soil environment. Soil Biol. Biochem. 39, 2977-2991

Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G., 1998 - Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol.64, 795-799.

Marstorp H., Xin G., Ping G., 2000 - Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. Soil Biol. Biochem. 32, 879-882.

Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C. 2001 - DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2354-2359.

Mele P.M., Crowley D.E., 2008 - Application of self-organizing maps for assessing soil biological quality. Agric. Ecosyst. Environ. 126, 139-152.

Mille-Lindblom C., Von Wachenfeldt E., Tranvik L.J., 2004 - Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. J. Microbiol. Met. 59, 253-262.

Montgomery H.J., Monreal C.M., Young J.C., Seifert K.A., 2000 - Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biol. Biochem. 32, 1207-1217.

Muyzer G., Dewaal E.C., Uitterlinden A…G., 1993 - Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.

Nannipieri P., Kandeler E., et Ruggerio P., 2002 - Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soils. In: R.G. Burns and R.P. Dick (eds.), Enzymes in the environment, Marcel Dekker, Inc., NY, pp. 1-33.

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M. T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003 - Microbial diversity and soil functions. Eur. J. Soil Sci. 54, 655-670.

Olsson S., Alstrom S., Persson P., 1999 - Barley rhizobacterial population characterised by fatty acid profiling. Applied Soil Ecology 12, 197-204.

Plassart P., Akpa Vinceslas M., Gangneux C., Mercier A., Barray S., Laval K., 2008 - Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. Agric. Ecosyst. Environ. 127, 286-293.

Ramos J.L., Marques S., Timmis K.N., 1997 - Transcriptional control of the Pseudomonas Tol plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. Annu. Rev. Microbiol. 51, 341-373.

Ranjard L., Poly F., Nazareth S., 2000 - Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. Res. microbiol.151, 167-177.

Ranjard L., Echairi A., Nowak V., Lejon D.P.H., Nouaïm R., Chaussod R., 2006 - Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. FEMS Microbiol. Ecol. 58, 303-315.

Renella G., Ortigoza A.L.R., Landi L., Nannipieri P., 2003 - Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). Soil Biol. Biochem. 35, 1203-1210.

Ruess L., Häggblomb M.M., García Zapatac E.J., Dighton J., 2002 - Fatty acids of fungi and nematodes—possible biomarkers in the soil food chain? Soil Biol. Biochem. 34, 745-756.

Sojka R.E., Upchurch D.R., 1999 - Reservations regarding the soil quality concept. Soil Sci. Soc. Am. Jour. 63, 1039-1054.

Sugiyama J., Nagahama T., Nishida H., 1996 - Fungal Diversity and Phylogeny with Emphasis on 18S Ribosomal DNA Sequence Divergence. In: R.R. Colwell, Usio Simidu and Kouichi Ohwada, editors. Microbial Diversity in Time and Space 41-51. Springer US.

Tiedje, J.M., Assuming-Brempong K., Nusslein K., Marsh T. L., Flynn S. J., 1999 - Opening the black box of soil microbial diversity. Appl. Soil Ecol. 13, 09-122.

Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R., Ovreas L., 1998 - Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology 64, 53-62.

Tu C.M., 1981 - Effects of some pesticides on enzyme activities in an organic soil. Environ. Contam. Toxicol. 27, 109-114.

Tu C.M., 1993 - Effect of fungicides, captafol and chlorothalonil, on microbial and enzymatic activities in mineral soil. J. Environ. Sci. Health, Pt. A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control 28, 67-80.

Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S., 1987 - An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol. Biochem. 19, 703-707.

Viti C., Mini A., Ranalli G., Lustrato G., Giovannetti L., 2006 - Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms. Appl. Soil Ecol. 34, 125-139.

Weller D.M., Raaijmakers J.M., McSpadden Gardener B.B., Thomashow L.S., 2002 - Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 309-348.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W., 1990 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York

Wu J., Joergensen R.G., Pommereining B., Chaussod R., Brookes P.C., 1990 - Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction - an automated procedure. Soil Biol. Biochem. 22, 1167-1169.

Zhao X.R., Lin Q., Brookes P.C., 2005 - Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? Soil Biol. Biochem. 37, 311-317.