



HAL
open science

Restauration écologique dans un système estuarien fortement anthropisé: applications au compartiment sol des écotones rivulaires et aux marais alluvionnaires de la Basse Vallée de Seine

Chokri Mchergui

► **To cite this version:**

Chokri Mchergui. Restauration écologique dans un système estuarien fortement anthropisé: applications au compartiment sol des écotones rivulaires et aux marais alluvionnaires de la Basse Vallée de Seine. Biodiversité et Ecologie. Université de Rouen, 2014. Français. NNT: . tel-01144901

HAL Id: tel-01144901

<https://theses.hal.science/tel-01144901>

Submitted on 23 Apr 2015

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

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

THESE

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université des sciences et techniques de Rouen

Spécialité : Ecologie, fonctionnement des Ecosystèmes
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative, Santé (EDNBISE)

**Restauration écologique dans un système estuarien fortement
anthropisé : applications au compartiment sol des écotones
rivulaires et aux marais alluvionnaires de la
Basse Vallée de Seine**

Présentée et soutenue publiquement par

Chokri MCHERGUI

Le 4 Avril 2014

Membres du jury

Jérôme Cortet , Maître des conférences, Université Montpellier III	Rapporteur
Geneviève Barnaud , Professeur, MNHN Paris	Rapporteur
Thierry Dutoit , Directeur de recherche, CNRS d'Avignon	Examineur
Anniét Laverman , Chargée de recherche, CNRS Paris	Examineur
Michael Aubert , Professeur, Université de Rouen	Directeur de thèse
Fabrice Bureau , Maître de conférences, Université de Rouen	Co-encadrant
Sandrine Sanson , Chef de service Port de Rouen	Invitée

Thèse préparée au sein du Groupe de Recherche ECODIV
(ECODIV, Université de Rouen)

- إلى الغالية منية -

**“ La Patience est un arbre dont les racines sont amères et
les fruits savoureux ”**

Avant-propos

Ce manuscrit, déposé à l'école doctorale Bise de l'Université de Rouen, a été rédigé sous la forme d'une thèse sur articles. Il contient une introduction en français suivi de cinq articles dont quatre en anglais répartis sous forme de chapitre. Un des articles a été accepté dans une revue internationale, un est en cours de publication et trois autres sont encore en préparation. Une synthèse de l'ensemble des travaux réalisés et des résultats acquis est proposée dans la dernière partie du document. La thèse est rédigée en interligne 1.5 ligne pour l'ensemble du document, et en interligne double pour les articles.

Mon allocation de recherche a été financée par le Grand Port Maritime de Rouen (GPMR) et le GIP Seine Aval (50% ; 50%) pour une période de trois ans. L'encadrement scientifique et le support logistique ont été assurés par le laboratoire d'Ecologie à l'université de Rouen (EA 1293 ECODIV).

Résumé

Depuis le milieu du 19^{ème} siècle, l'estuaire de la Seine a fait l'objet de lourds aménagements pour autoriser la navigation de bateau à fort tirant d'eau jusqu'à Rouen (chenalisation, endiguements, dragage) impactant les écosystèmes rivulaires en les déconnectant souvent du fleuve. Dans le même temps, la plaine alluviale de l'estuaire de Seine a également fait l'objet d'aménagements pour permettre (1) l'utilisation agricole des sols (drainage) et (2) l'exploitation des matériaux alluvionnaires (extraction de granulats). L'étude présentée ici a pour objectifs (i) de déterminer si l'état actuel des écosystèmes rivulaires anthropisées de la basse vallée de Seine nécessite et autorise, la restauration d'un état et d'un fonctionnement considérés comme écologiquement acceptables pour un écotone rivulaire, et (ii) de suivre le fonctionnement d'un sol reconstitué suite au comblement d'une ballastière à l'aide de sédiments de dragages au sein de la plaine alluviale de l'estuaire de la Seine.

La première partie de la thèse est consacrée à diagnostiquer l'état actuel (morphologie et fonctionnement) des sols des écosystèmes rivulaires et de suivre leurs potentialités en terme de capacités épuratrices vis-à-vis de l'N lors d'expérimentations en microcosmes. Les résultats sur la morphologie et le fonctionnement (in situ et ex situ) montrent que les sols des écosystèmes rivulaires ne peuvent pas être regroupés selon leurs degrés de connectivité. Les mesures fonctionnelles ont montré que les sites moins connectés au fleuve restent favorables à l'expression de la fonction de stockage de carbone et à la dénitrification. J'ai ensuite testé expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation attribuable aux variations journalières de niveaux d'eau *versus* les crues du fleuve sur la fonction épuratrice vis-à-vis de l'azote des sols d'écosystèmes rivulaires par voie bactérienne, à travers deux études expérimentales. La première a mis en évidence que les inondations journalières de niveau d'eau a un effet significatif sur l'amélioration de pouvoir épurateur des sols. La seconde étude a montré que les sols actuellement déconnectés retrouvent leurs fonctions normales après une modification de régime hydrique. De plus elle suggère que le temps nécessaire pour qu'un sol déconnecté retrouve un niveau significatif de dénitrification est de 3 à 7 jours d'engorgement en eau.

La seconde partie de la thèse s'est principalement intéressée à l'évaluation du succès d'une expérience de restauration suite au comblement d'une ballastière avec de sédiments de dragages. L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie montrent que (1) l'approche pédologique et écologique employée n'a pas été suffisante pour évaluer le succès de la restauration sur une courte durée de suivi et que (2) l'approche fonctionnelle (in situ et ex situ) relative à la respiration du sol, à la minéralisation du C et de l'N et à la dénitrification semble être pertinente pour l'évaluation.

Mots clés : écosystèmes rivulaires, estuaire de la Seine, restauration, sol reconstitué, expérimentations en microcosmes, approche morphologie, approche fonctionnelle, capacité épuratrice, stockage de carbone, régime hydrique, respiration, minéralisation C et N, dénitrification.

Abstract

Since the mid 19th century, Seine Estuary has been subject of heavy human interference to facilitate the deep draft navigation (channelization, embankments, and dredging) affecting the natural flooding regime of riparian ecosystems. The same time, floodplain has also been the subject of management in order to allow (1) agriculture land use and (2) the exploitation of alluvial materials (extraction aggregates). The present study aims (i) to determine whether the current state of anthropized riparian ecosystems of the lower Seine valley requires and authorizes the restoration of a functioning considered as acceptable for riparian ecosystems, and (ii) to monitor the functioning of reconstituted soil following the filling of gravel-pit using dredged sediments in the floodplains of the Seine Estuary.

The first part of the thesis is devoted to diagnose the current state (morphology and functioning) of soils in riparian ecosystems and follow their potential capacity to remove nitrogen during experiments microcosms. The main results of morphology and functional measurements (*in situ* and *ex situ*) show that soils in riparian ecosystems cannot be grouped according to their degree of connectivity. Functional measurements showed that low connected sites remains favorable to the sink of carbon and nitrogen removal. Then, I assessed the effect of flood duration due to the daily water fluctuation *versus* river floods on N removal in riparian soils, a microbially-mediated soil process, through two experiments studies. The first of two studies showed that the daily water fluctuation has a significant effect on the improvement of purifying capacity of soils. The second study showed that disconnected soils have found their normal functions after a change of water regime. Also, it suggests that between 3- and 7-day long waterlogging is needed in the disconnected soils for it to exhibit a significant denitrification level.

The second part of the thesis focused in the evaluation of success of the restoration experience following the filling of gravel-pit using dredged sediments. Overall, the results obtained in this part show that (1) the diachronic monitoring of soil characteristics is not efficient to assess if typical wetland soil characteristics are reached in reconstituted soils in a short duration of follow and (2) the functional approach (*in situ* and *ex situ*) relative to soil respiration, mineralization of C and N and denitrification appear to be a good tool for evaluating.

Keywords : riparian ecosystems, Seine Estuary, restoration, reconstituted soil, expérimentations en cosmes, morphology, function, capacité épuratrice, stockage de carbone, régime hydrique, respiration, minéralisation C et N, dénitrification.

Remerciements

Voilà, voilà, voilà C'est presque terminé. J'en arrive au dernier exercice de ce long travail, le plus agréable puisqu'il s'agit de remercier tous ceux grâce à qui cette thèse s'est déroulée dans les meilleures conditions.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Fabrice Bureau et Michael Aubert.

Merci Fabrice, de m'avoir encadré durant toute la durée de cette thèse. Merci également pour la qualité de tes conseils, ton exigence professionnelle et ta capacité d'avoir une vision positive dans tous les domaines. Tu m'as transmis ta passion de la recherche et ne me quitte plus depuis.

Merci Michael pour tout le temps que tu as passé à suivre mon projet et l'aide incommensurable que tu m'as apporté. Tu as été plus qu'un directeur de thèse pour moi, tu m'as apporté réconfort et soutien dans les moments difficiles tout autant que réflexion et proposition d'idées lors de la réalisation des expériences et la rédaction. Ton côté humain n'a jamais été mis à défaut et rien que pour ça, je te remercie pleinement.

Je remercie Jérôme Cortet et Geneviève Barnaud d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir consacré du temps pour juger ce travail. Je remercie également les autres membres de jury : Anniet Laverman et Thierry Dutoit.

A tous les collègues, stagiaires et amis travaillant ou ayant travaillé sur les mêmes thématiques que moi, Julia Clause, David Porco, Benoit Richard, Gabriel Perez mais également Audrey Boigny, Michael le Gall et Ludovic Henneron pour leur aide, leur présence, leur amitié et la richesse de nos discussions.

Je tiens à remercier Philippe Delporte.... Phil, ma reconnaissance ne sera jamais à la hauteur du travail que tu as fourni pour ma thèse. Je souhaite à tous les thésards d'avoir un technicien aussi compétent et impliqué que toi pour les aider. J'espère que tu accepteras mes excuses pour toutes ces journées de terrain hivernales... Et enfin à tous les autres membres de l'équipe ECODIV, pour leur soutien et leurs avis critiques particulièrement Marthe.

Merci aux collègues de Montpellier Bruno Buatois et Nathalie Fromin de m'avoir accueilli avec Marthe Akpa afin de mettre au point le protocole PLFA à ECODIV. Un grand merci pour votre formation et votre aide. Merci aux collègues du Laboratoire de

Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Laurent Quillet et Ludovic Busaury, de m'avoir accueilli dans votre laboratoire afin de réaliser mes analyses PCR.

Chokran à tous les amis, Zied, Dhiaa, Montassar, Seif, Salem, Hattem, Majid, Ahmed, Abderahim, Emna, Harthi, Abdallah, Mohamed, Imen, Tefa, Firas, Majed, Yorick, Kanfar, Kuder, Zina, Sourayya, Driss, Mokhtar, Heidi, Rajboun, Lotfi, Samir, Oula, Kheder, Saïd, Karim, Mhanna, Othman et tant d'autres. Merci à tous ceux avec qui j'ai parlé d'Ecologie, de fonctionnement des écosystèmes et de statistiques, Karim, Marc, Nicolas, Thomas et tant d'autres. Merci à l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à cette thèse. Sans vous tout ceci n'aurait pas été possible.

Merci à tous ceux que j'aime. Merci Mounia d'avoir toujours été là pour moi au travers de toutes les difficultés. Sans toi, cette thèse n'aurait jamais pu aller à son terme. Merci à toute ma famille sans vous rien de tout ça n'aurait pas été possible, ma très chère sœur Soumaya, mon Cousin Yassin, mon cher Slouma et ma chère Waswas.

Mont Saint Aignan le 3 Février 2014

SOMMAIRE

Avant-propos	iv
Remerciements	v
Introduction générale	1
1. Contexte scientifique et cadre de la thèse	2
2. Problématique de la thèse	3
3. Objectifs et hypothèses	4
4. Organisation du manuscrit	8

Chapitre 1 - Etat de connaissance et présentation des sites d'étude

I. Etat de connaissance	
I.1. Les zones humides	
I.2. Les communautés microbiennes	
I.3. Le contexte géographique : l'estuaire de la Seine	
I.4. Ecologie de la restauration	
I.5. Restauration écologique du compartiment sol	
II. Sites d'étude	

Partie 1 45

Chapitre 2 – Influence du degré de connectivité et de l'éloignement au fleuve sur le fonctionnement des sols alluviaux de l'estuaire de Seine : incidence sur la restauration des fonctions écologiques associées à ces sols.

2.1. Introduction	46
2.2. Material and Methods	47
2.3. Results and Discussion	49
2.4. Conclusions	50

Chapitre 3 – A comparison of permanent and fluctuating flooding on microbial properties in an ex-situ estuarine riparian system.

3.1. Introduction	60
3.2. Material and Methods	64
3.3. Results and Discussion	70

Chapitre 4 – Effects of flood duration on floodplain soils characterized by a gradient of hydrological connectivity to the river: implications for the restoration of soil functions microbially-mediated in the Seine fluvial estuary.

4.1. Introduction

4.2. Material and Methods

3.3. Results and Discussion

3.4. Conclusions

Conclusion partielle

Partie 2

Chapitre 5 – Use of dredged material for the soil creation in the Estuary of the Seine River (France), an alternative to classical gravel-pit rehabilitation: pedological and ecological values of a reconstituted soil in human-impacted floodplain.

5.1. Introduction

5.2. Material and Methods

5.3. Results and Discussion

5.4. Conclusions

Chapitre 6 – Use of dredged material for the soil creation in the Estuary of the Seine River (France): Importance of soil functioning survey to evaluate the success of wetlands restoration in human-impacted floodplains.

6.1. Introduction

6.2. Material and Methods

6.3. Results and Discussion

6.4. Conclusions

Conclusion partielle

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Bibliographie

Listes des figures et tableaux

Liste des annexes

ANNEXES

Introduction

I. Contexte de la thèse

Les estuaires abritent une grande diversité de zones humides (vasières, prés salés, marais et lagunes côtières, marais alluvionnaires, prairies humides, tourbières, etc ...) et représentent des systèmes écologiques de première importance pour la biodiversité à l'échelle mondiale (Mitsch and Gosselink, 2007). En effet, bien que les zones humides ne représentent que 6% des terres émergées, elles constituent des écosystèmes parmi les plus diversifiées et les plus richement structurées (Miller, 1998). Elles possèdent donc une haute valeur patrimoniale mais également, des fonctions écologiques aujourd'hui largement reconnues (Moore and Hunt, 2012; Trémolières and Schnitzler, 2007) : forte production primaire (Alard, 2002; Chabrierie et al., 2001; Dennis, 1999), rôle dans le cycle de l'eau (Anbumozhi et al., 2005; B-M.Vought et al., 1995; Moreno et al., 2007) et dans les cycles de matières (Curie, 2006; Groffman et al., 1992). En particulier, on sait aujourd'hui qu'elles sont capables d'assurer un rôle important dans la régulation des crues (Vought, *et al.*, 1995), le contrôle de la qualité des eaux (Haycock and Muscutt, 1995; Mitsch and Gosselink, 2000) et le stockage de carbone (Coletti et al., 2013). Ces caractéristiques s'expliquent notamment par le positionnement de ces écosystèmes à l'interface (écotone) entre les environnements aquatiques et les environnements terrestres (Mitsch and Gosselink, 2007). Selon le Millennium Ecosystem Assessment (2005), ces caractéristiques constituent également les services écosystémiques parmi les plus emblématiques des zones humides.

Les estuaires sont aussi connus pour leur intérêt économique avec la présence de grands ports maritimes et de nombreuses industries (Even et al., 2007; Jorgensen, 1982). Ces activités industrialo-portuaires ont transformé la morphologie de la plupart des grands estuaires en s'installant dans la zone intertidale, forçant les autres activités à se redistribuer dans les espaces restants (Even et al., 2007; Jorgensen, 1982). Cette vocation industrialo-portuaire a largement altéré la biodiversité et les fonctions écologiques des zones humides constitutives de ces systèmes estuariens. L'endiguement, le maintien de la navigabilité (chenalisation et dragages d'entretien), l'extraction de sédiments alluvionnaires mais aussi l'extension des terres agricoles et l'urbanisation ont considérablement réduit la surface des zones humides et impactés leur fonctionnement hydrologique. Selon le Millennium Ecosystem Assessment (2005), nombre d'entre elles ont été dégradées et corrélativement, 60% des services écologiques qu'elles assurent sont menacés.

Devant ce constat, le besoin de restaurer les zones humides dégradées s'est fait sentir dès les années 1990, tant en Europe qu'en Australie ou aux Etats-Unis (Mitsch and Gosselink, 2007). Divers projets de restauration ont été réalisés dont le but d'aider ces zones humides dégradées à retrouver leurs fonctions écologiques qui ont été perdues. Plusieurs méthodologies ont été développées pour la restauration de ces zones : reconnexion au cours d'eau par destruction des digues (Theriot et al., 2013) ou par apport d'eau (Mitsch, 2005; Theriot et al., 2013; Waletzko and Mitsch, 2013) et revégétalisation (Brown and Bedford, 1997). Plusieurs études décrivent l'importance de restauration du régime hydrique sur la communautés végétales (Stefanik and Mitsch, 2012), sur la qualité d'eau (Mitsch, 2005; White et al., 2004) et sur le stockage de C (Waletzko and Mitsch, 2013). Par exemple, les travaux de reconnexion dans la plaine alluviale du Mississippi (Etats-Unis) par la destruction des digues construites depuis 50 ans en ramenant un régime de perturbation à permis aux sols de retrouver leurs fonctions épuratrices vis-à-vis de l'N et du P (Theriot et al., 2013). Un autre exemple de restauration de régime hydrique est celui de "Wilma H. Schiermeier Olentangy River Wetland Research Park" à l'état d'Ohio (Etats-Unis). Ce projet, réalisé en 1994, avait pour objectif de tester l'effet de remise en eau d'une zone humide drainée (par pompage d'eau) sur les habitats (Korfel et al., 2010), la qualité des eaux (Huang et al., 2011; Huang et al., 2010; Mitsch, 2005) et sur le stockage de carbone (Waletzko and Mitsch, 2013). Certains projets se sont focalisés sur la restauration de végétation pour accueillir une faune bien spécifique, *e.g.* avifaune (Brown and Bedford, 1997). D'autres projets appelés «constructed ou created wetlands» visent à favoriser certaines fonctions en particulier comme l'épuration des eaux vis à vis de l'N (Kovacic et al., 2006) ou vis-à-vis de P (Drizo et al., 1999). Cependant, très peu d'études s'intéressent au fonctionnement du compartiment sol susceptible de fournir des indicateurs de réussite dans le cadre de projet de restauration.

II. Cadre et problématique de la thèse

L'estuaire de Seine (Haute-Normandie, France) ne fait pas exception à la disparition de ses zones humides et constitue de ce fait, un bon modèle d'étude pour mesurer les possibilités de restauration écologique dans un contexte de forte anthropisation. En effet, depuis le milieu du 19^{ème} siècle, l'estuaire de la Seine a fait l'objet d'aménagements lourds pour autoriser la navigation de bateau à fort tirant d'eau jusqu'à Rouen

(chenalisation, endiguements, dragage) impactant les écosystèmes rivulaires en les déconnectant souvent du fleuve. Dans le même temps, la plaine alluviale de l'estuaire de Seine a également fait l'objet d'aménagements pour permettre (1) l'utilisation agricole des sols (drainage) et (2) l'exploitation des matériaux alluvionnaires (extraction de granulats). Actuellement, il y a une volonté de protéger et de restaurer ces écosystèmes afin de maintenir la biodiversité qu'ils renferment mais également pour continuer à bénéficier des fonctions écologiques qu'ils rendent. Deux de ces services, le stockage du carbone (C) et l'épuration de l'eau vis-à-vis de l'azote (N), sont des fonctions notamment réalisées au sein du compartiment sol des zones humides. Elles sont directement en rapport avec leur régime d'engorgement en eau, allant d'engorgement plus ou moins temporaire à permanent en fonction de la position des sols au sein de l'estuaire.

Ce travail de thèse se rattache aux recherches relatives à l'analyse des relations entre biodiversité et fonctionnement du sol des zones humides. Il **s'intéresse plus particulièrement aux possibilités de restauration écologique du compartiment sol de ce type d'écosystèmes dans un estuaire fortement anthropisé**. Il s'inscrit ainsi dans le cadre des actions du Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval (GIP Seine-Aval ou GIP SA) relatives à la restauration des paysages de la Basse Vallée de Seine et à la reconquête de l'estuaire. Il est axé plus spécifiquement sur l'étude du fonctionnement des sols des marais alluvionnaires et des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale de l'estuaire de Seine. Pour la partie consacrée aux marais alluvionnaires, ce travail a été réalisé principalement dans le cadre des *Suivis écologiques du réaménagement de la ballastière d'Yville-sur-Seine* financé par le Grand Port Maritime Rouen GPMR (projet Yville) et, dans une moindre mesure, dans le cadre du projet de « *REStauratiOn des Sédiments et des SOLs Vulnérables* » financé par la région Haute-Normandie via le Grand Réseau de Recherches en Sciences de l'Environnement et des Risques (GRR SER - réseau SCALE _ projet RESSOLV). Pour la partie consacrée aux écosystèmes rivulaires, les travaux ont été portés par le projet « *Restauration Ecologique des BERges de la BASse Vallée de Seine* » financé par le GIP SA (projet REBEBAS).

III. Objectifs et hypothèses

Adossée à des projets de recherche localisés dans un même contexte géographique et pédologique, l'objectif de cette thèse est double. Dans un premier temps, il s'agira de (i) **diagnostiquer l'état actuel (morphologie et fonctionnement) des sols des écosystèmes rivulaires de la basse vallée de la Seine en fonction de leur degré de connectivité au fleuve** et (ii) de **suivre leurs potentialités en terme de capacités épuratrices vis-à-vis de l'azote lors d'une expérimentation en cosmes visant à restaurer un régime de perturbation et de contraintes liés aux crues**. Dans ce second cas, la restauration du sol passe par la manipulation du régime de perturbation et de contrainte lié aux crues.

Dans un second temps, il s'agira **de suivre le fonctionnement d'un sol reconstitué suite au comblement d'une ballastière à l'aide de sédiments de dragages au sein de la plaine alluviale de la Seine**. Dans ce cas, la restauration du compartiment sol correspond à une réaffectation puisqu'il y a reconstitution d'un nouveau profil pédologique après destruction du profil existant initialement.

Les deux hypothèses sous-jacentes à ce travail sont les suivantes :

- Hypothèse 1 (écosystèmes rivulaires - projet REBEBAS) :

Compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, l'état écologique des sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale est fortement dégradé et, corrélativement, leurs fonctions écologiques (régulation de cycle de l'azote et stockage de carbone) sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve. Dans un tel cas, on pose l'hypothèse que la meilleure possibilité de restaurer les fonctions écologiques portées par le compartiment sol serait de ramener un régime de perturbation et de contraintes lié aux variations de niveau d'eau en cohérence avec le régime hydrologique actuel de la Seine.

- Hypothèse 2 (marais alluvionnaire - projets Yville et RESSOLV) :

Le cas extrême de dégradation du sol dans les marais alluvionnaires de l'estuaire de Seine est sa disparition totale dans le cas de l'exploitation de matériaux alluvionnaires par les carriers. Dans un tel cas, on pose l'hypothèse que l'utilisation de sédiments de dragage comme matériaux de comblements peut permettre la recréation d'un profil pédologique

possédant des fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides.

IV. Organisation du manuscrit

Le manuscrit comprend une introduction générale, un état de l'art une première partie consacrée aux possibilités de restauration du compartiment sol des écosystèmes rivulaires actuels de l'estuaire fluvial de la Seine en fonction de leur degré de connectivité au fleuve et une deuxième partie de résultats consacrée à un cas original de restauration du compartiment sol par réaffectation au sein de la plaine alluviale de l'estuaire fluvial de la Seine.

L'état de l'art sera constitué par une analyse bibliographique synthétisant l'état actuel des connaissances sur l'écologie et le fonctionnement des sols des zones humides, sur leur niveau de dégradation et sur leur restauration écologique. Une attention particulière sera portée aux possibilités de restauration du compartiment sol. Cette étude bibliographique permettra de bien situer les sols de l'estuaire de Seine, estuaire fortement anthropisé, parmi les sols d'autres systèmes estuariens.

<p>1^{ère} partie : Restauration du compartiment sol par recréation du régime de perturbation et de contrainte liée aux crues : cas des écosystèmes rivulaires de l'estuaire fluvial de la Seine.</p>
--

Le premier article est consacré aux sols des écosystèmes rivulaires de l'estuaire fluvial de la Seine. Il analyse l'intérêt et la pertinence de combiner des descripteurs morphologiques et fonctionnels pour définir l'état actuel de ces sols. En effet, si la morphologie (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) est indicatrice de l'histoire de mise en place du sol, les critères fonctionnels permettent d'appréhender le fonctionnement actuel du sol. Il s'agira donc de déterminer si ces sols remplissent actuellement leurs fonctions de stockage de C et d'épuration de l'N et si oui, quelle est l'efficacité et le niveau de ces fonctions écologiques. Cet article est en préparation pour *Soil Biology and Biochemistry*.

Article 1: C. Mchergui, E. Langlois, M. Aubert, L. Henneron, M. Akpa-Vinceslas, M. Chauvat, F. Bureau.

Influence du degré de connectivité et de l'éloignement au fleuve sur le fonctionnement des sols alluviaux de l'estuaire de Seine : incidence sur la restauration des fonctions écologiques associées à ces sols.

Etant donné qu'aucun cas de restauration *in situ* du compartiment sol n'a encore été réalisé dans les écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine, nous avons choisi de simuler expérimentalement l'effet des variations de niveau d'eau liées au régime d'inondations dans les articles 2 et 3.

Le deuxième article est consacré à la présentation, à l'analyse et à l'interprétation des résultats d'une expérimentation *ex situ* ayant pour objectif de caractériser l'effet de la durée d'inondation liée aux crues du fleuve (perturbations) et des variations journalières de niveau d'eau liées aux marées (contraintes) sur la fonction épuratrice vis-à-vis de l'azote des sols d'écosystèmes rivulaires encore en connexion avec la Seine. Cet article est accepté à *Applied Soil Ecology*.

Article 2: C. Mchergui, L. Besaury, E. Langlois, M. Aubert, M. Akpa-Vinceslas, B. Buatois, L. Quillet, F. Bureau.

A comparison of permanent and fluctuating flooding on microbial properties in an *ex-situ* estuarine system.

Le troisième article est consacré à la présentation, à l'analyse et à l'interprétation des résultats d'une seconde expérimentation *ex-situ* ayant pour double objectif (i) de tester l'effet de la durée d'inondation sur la fonction épuratrice des sols d'écosystèmes rivulaires vis-à-vis de l'azote et sur les communautés bactériennes (dénitrifiante et sulfato-réductrice) et (ii) de discuter son implication dans les travaux de restauration des écosystèmes rivulaires dégradés. Cet article est en préparation pour *Applied Soil Ecology*.

Article 3: C. Mchergui, L. Besaury, E. Langlois, M. Aubert, M. Akpa-Vinceslas, B. Buatois, L. Quillet, F. Bureau.

Effects of flood duration on floodplain soils characterized by a gradient of hydrological connectivity to the river: implications for the restoration of soil functions microbially-mediated in the Seine fluvial estuary.

2ème partie : Restauration du compartiment sol par réaffectation : création d'un nouveau profil pédologique après destruction du profil existant. Cas du comblement de la ballastière d'Yville-sur-Seine par des sédiments de dragages.

Le **quatrième article** est consacré à l'expérience de réaffectation écologique suite au comblement de la ballastière d'Yville sur Seine par des sédiments de dragages. L'objectif était d'évaluer le succès de l'expérience de réaffectation écologique du compartiment sol en employant une démarche qui consiste à combiner des descripteurs pédologiques (i.e. caractéristiques physico-chimiques courantes) et biologiques multi-taxons (i.e. Vers de terre, Collemboles et microorganismes). Cet article est en préparation pour *Restoration Ecology*.

Article 4: C. Mchergui, M. Chauvat, P. Margerie, A. Husté, E. Langlois, M. Aubert, M. Akpa-Vinceslas, R. Lafite, S. Samson, F. Bureau.

Use of dredged material for the soil creation in the Estuary of the Seine River (France), an alternative to classical gravel-pit rehabilitation: pedological and ecological values of a reconstructed soil in human-impacted floodplain.

Le **cinquième article** est consacré au suivi de fonctionnement de sol reconstitué suite au comblement de la ballastière d'Yville sur Seine qui est susceptible de fournir des indicateurs précoces pour diagnostiquer si ce compartiment de l'écosystème restauré acquière un fonctionnement typique de milieu humide tourbeux dès ses premières années de mise en place. Cet article est soumis à *Ecological Engineering*.

Article 5: C. Mchergui, M. Aubert, B. Buatois, M. Akpa-Vinceslas, E. Langlois, R. Lafite, S. Samson, F. Bureau.

Use of dredged material for soil creation in the Estuary of the Seine River (France): importance of soil functioning survey to evaluate the success of wetlands restoration in human-impacted floodplains.

L'ensemble des résultats est synthétisé et discuté au sein de la Discussion Générale.

CHAPITRE 1

Etat des connaissances et présentation des sites d'étude

Plan d'eau : site de Grande Vase / Petite Vase (Avril 2011)



Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des recherches relatives à l'analyse des relations entre biodiversité et fonctionnement des zones humides et s'intéresse aux possibilités de restauration écologique du compartiment sol de ce type d'écosystèmes dans un estuaire fortement anthropisé. Il s'appuie sur des notions relevant de la science de sol (dynamique et stockage de C, cycle de l'N dans le sol) et de l'écologie fonctionnelle (relations entre les communautés microbiennes et le fonctionnement du sol). Ce chapitre est une analyse bibliographique synthétisant l'état actuel des connaissances sur l'écologie et le fonctionnement des sols des zones humides (I.1), les communautés microbienne (I.2), les caractéristiques de l'estuaire de la Seine (I.3), l'écologie de la restauration (I.4), et la restauration écologique du compartiment sol (I.5). Il se termine sur la présentation des sites d'études sur lesquels ce travail de thèse a été réalisé (II).

I. Etat des connaissances

I.1 Les zones humides

I.1.1 Définitions et diversité des zones humides

Les zones humides sont parmi les écosystèmes les plus riches et les plus importants du monde (Zhang et al., 2011). Selon Mitsch and Gosselink (2007) elles couvrent une superficie totale de 570 millions d'hectares, soit seulement 6% des terres émergées. Leur importance n'est donc pas liée à leur superficie mais à leur positionnement à l'interface entre les environnements terrestres et aquatiques rendant les processus écologiques qui s'y manifestent importants vis à vis de la ressource en eau et de la biodiversité. De nombreuses définitions ont été élaborées pour cerner ces milieux particuliers. Dugan (1990) estime à plus de 50 le nombre de définitions générales élaborées dans le monde. En France, la législation comporte deux définitions des zones humides. La première a une portée internationale et a été proposée lors de la convention de Ramsar en 1971. (Définition selon l'article 1.1 et l'article 2.1)

Art 1: «... areas of marsh, fen, peatland or water, whether natural or artificial, permanent or temporary, with water that is static or flowing, fresh, brackish or salt, including areas of marine water the depth of which at low tide does not exceed six metres...» (Ramsar, 1971)

Il y est précisé dans l'article 2.1 que ces zones pourront :

«...incorporate riparian and coastal zones adjacent to the wetlands, and islands or bodies of marine water deeper than six metres at low tide lying within the wetlands, especially where these have importance as waterfowl habitat» (Ramsar, 1971)

La plupart des spécialistes s'accordent sur l'existence de trois principaux critères d'identification : la présence d'eau douce ou salée (Neue et al., 1997), de types de sols particuliers dits « hydromorphes » (Mitsch and Gosselink, 2002), et d'une végétation apte à se développer dans des sols engorgés ou submergés durant une période plus ou moins longue (Piégay et al., 2003; Van Roon, 2012). Alard (2002) regroupe les zones humides en quatre catégories: littorales, de plaines intérieures, de vallées alluviales et les tourbières. À partir de ces définitions, on peut conclure que l'un des critères permettant de reconnaître une zone humide est la présence d'eau dans le sol avec un régime d'engorgement temporaire à quasi-permanent.

D'autres définitions estiment que ce seul critère n'est pas suffisant et y ajoutent la présence d'une végétation hygrophile. Cette première définition a été complétée par une loi nationale, la loi sur l'eau du 3 janvier 1992, visant la protection, la mise en valeur et le développement de la ressource en eau (Curie, 2006) *«On entend par zone humide les terrains exploités ou non, habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire ; la végétation, quand elle existe, y est dominée par des plantes hygrophiles pendant au moins une partie de l'année»*. En France, il faut attendre l'arrêté du 24 juin 2008 modifié par l'arrêté du 1er octobre 2009 pour voir la prise en compte des critères qui sont relatifs à la morphologie des sols liée à la présence prolongée d'eau d'origine naturelle et à présence éventuelle de plantes hydrophiles.

I.1.2 Etude de cas : Les zones estuariennes

Ces zones sont caractérisées par un régime hydraulique bien particulier. La circulation de l'eau salée et de l'eau douce suit un trajet complexe qui dépend du cycle des marées. La marée montante refoule l'eau douce en amont sur une distance qui peut être importante: c'est le mascaret. La vitesse du courant fluvial diminue et les matériaux en suspension se sédimentent; les argiles s'agglomèrent sous l'action des ions de l'eau de mer (floculation) et forment un "bouchon vaseux". Le sédiment caractéristique est la vase qui est formée de particules fines, de sulfures et d'hydroxydes de fer et de colloïdes organiques. Habituellement, un estuaire peut être découpé en trois secteurs : l'estuaire **amont** (ou fluvial), l'estuaire **intermédiaire** (mélange d'eau douce et eau salée) et l'estuaire **aval** (ou marin). Dans la présente thèse les sites d'étude se situent sur 2 des 3 secteurs de l'estuaire ; **le secteur intermédiaire** et **le secteur amont**

I.1.3 Fonctions et caractéristiques des zones humides

Les zones humides sont capables d'assurer de nombreuses fonctions souvent regroupées en quatre grandes catégories : fonctions hydrologiques, fonctions biogéochimiques, fonctions biologiques et fonctions récréatives (Guézennec, 1999). Fustec and Frochot (1996) distinguent ainsi 10 fonctions (**Tableau 1.1**).

Tableau 1.1. Fonctions des zones humides dénombrées par Fustec and Frochot (1996)

Fonctions dénombrées au sein des zones humides	Ensemble de fonctions
Recharge des eaux souterraines	Fonctions hydrologiques
Décharge des eaux souterraines	
Stockage des crues et désynchronisation	
Stabilisations des rivages et dissipations des forces érosives	
Rétention des sédiments	Fonctions biogéochimiques
Rétention et éliminations des nutriments	
Soutien de chaînes trophiques	Fonctions biologiques
Habitat pour les poissons	
Récréation active	Fonctions récréatives
Récréation passive et valeur patrimoniale	

- Maîtrise des crues et des inondations

Les zones humides des grandes plaines alluviales, de par leur positionnement, ont la capacité de réguler le régime hydrologique des cours d'eau (Mitsch and Gosselink, 2002). Elles retiennent les fortes pluies et stockent cette eau pour la restituer en période de

sécheresse (Alard, 2002; Mitsch and Gosselink, 2007). Les zones humides sont des champs d'expansion des crues naturels dont la capacité est énorme. Ces propriétés dépendent de différentes caractéristiques telles que la perméabilité de substrat, la géologie, la position de la zone dans le système hydrographique, l'occupation des sols ou encore le niveau d'anthropisation (Curie, 2006).

- Recharge des nappes phréatiques

Les zones humides jouent un rôle important dans la recharge et la décharge des nappes. Selon Piégay et al. (2003) en période de sécheresse et d'étiage, la présence d'une nappe est un élément primordial, nourricier et salvateur qui met la végétation à l'abri de certaines formes de dépérissement. L'introduction d'eau permet donc d'alimenter la nappe, alors qu'en période estivale c'est cette dernière qui maintient l'humidité (Fustec and Frochot, 1996; Mitsch and Gosselink, 2002).

- Fonctions biogéochimiques

Les zones humides contribuent à améliorer la qualité des eaux, non seulement en interceptant les particules et leur charge polluante véhiculées par les eaux superficielles, mais aussi en intervenant sur les composés dissous, en particulier sur ceux qui sont transportés vers les rivières par les eaux souterraines. Leur pouvoir de rétention et d'élimination des polluants azotés (nitrate), responsables majeurs de l'eutrophisation des milieux aquatiques, est aujourd'hui largement reconnu (Alard, 2002; Hernandez and Mitsch, 2007; Hoffmann and Baattrup-Pedersen, 2007; Pinay et al., 2002; Pinay and Tremolieres, 2000). Ce processus d'épuration est lié à deux phénomènes : le premier, appelé « effet filtre », est utilisé pour limiter la pollution agricole *via* des bandes enherbées aussi appelées « zones tampons » (Tan et al., 2013; van Oorschot et al., 2000); Le second est lié à la réaction de dénitrification qui apparaît dans des conditions anaérobies et est réalisé par des microorganismes et notamment les bactéries dénitrifiantes qui utilisent l'oxygène des nitrates comme accepteur final d'électrons (Bachand and Horne, 1999; Lu et al., 2009; Vymazal and Kröpfelová, 2009). Cette réaction consiste à transformer nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) en azote gazeux dit diazote N_2 . Il est intéressant de noter que les formes gazeuses de l'azote (NO et N_2O) relarguées dans l'atmosphère lors de la dénitrification sont de puissants gaz à effet de serre (Groffman et al., 1992; Jenkins et al., 2010; Wylynko, 1999).

- Stockage de carbone

Les zones humides stockent jusqu'à 40% du carbone terrestre mondiale (Bernal and Mitsch, 2008; Coletti et al., 2013; Zhang et al., 2011). Ces écosystèmes sont donc de véritables « puits » de carbone (Chen et al., 2009; Coletti et al., 2013; Hopkinson et al., 2012; Zhang et al., 2011). Leur destruction serait responsable d'au moins à 60% de l'effet serre par l'émission d'énormes quantités de dioxyde de carbone (Davidson and Janssens, 2006; Mitsch and Gosselink, 2002). La réduction de l'engorgement en eau et, corrélativement, l'augmentation de la décomposition des matières organiques des zones humides drainées risquent de leur faire perdre leur titre d'écosystèmes parmi les plus efficaces en tant que puits de carbone (Coletti et al., 2013; Davidson and Janssens, 2006; Mitsch and Gosselink, 2002).

- Réservoir de biodiversité

Les zones humides abritent une grande biodiversité. Selon un rapport fait par l'observatoire de zones humides méditerranéennes (OZHM) (Observatoire des Zones Humides Méditerranéennes, 2012) la diversité biologique de ces milieux est pourtant plus riche que celle des autres écosystèmes ; alors que les zones humides couvrent moins de 1% de la surface du globe, plus de 25% des vertébrés y trouvent refuge, et plus globalement, ce sont 126 000 espèces qui y ont été répertoriées à ce jour.

Cette biodiversité est liée à la combinaison de conditions terrestres et aquatiques ainsi qu'aux inondations liées à l'intensité et à la périodicité des crues du fleuve (régimes de perturbations) et aux marées générant une grande diversité des types de zones humides (Alard, 2002; Chabrierie et al., 2001; HALLS, 1997; Mitsch and Gosselink, 2002; Tabacchi et al., 1996).

I.1.3. Les sols des zones humides

A. Morphologie et fonctionnement

- Des sols alluviaux faiblement influencés par le régime hydrologique c'est-à-dire dont la morphologie et le fonctionnement ne sont pas sous la dépendance principale de régime d'engorgement en eau (FLUVIOSOLS réductiques ou redoxiques selon le Référentiel Pédologique, (AFES, 2009b),
- Des sols minéraux à caractère hydromorphe dont la morphologie et le fonctionnement sont liés à un engorgement en eau plus ou moins long

(REDUCTISOLS et REDOXISOLS fluviatiques selon le Référentiel Pédologique, (AFES, 2009b)) (Guenat et al., 2003),

- Des sols organiques dont la morphologie et le fonctionnement sont liés à un engorgement permanent ou quasi permanent (HISTOSOLS selon le Référentiel Pédologique, (AFES, 2009b)) (Guenat et al., 2003).

La genèse et le fonctionnement actuel de ces sols sont sous la dépendance du niveau d'eau (Alard, 2002; Piégay et al., 2003). Ils sont caractérisés par le lien qu'ils entretiennent avec le régime hydrologique (régimes de crues et fluctuations de la nappe alluviale), l'hydrodynamisme du fleuve (processus d'érosion et/ou de sédimentation) (Amoros and Bornette, 2002; Amoros and Petts, 1993) et les marées en zone estuarienne.

Les REDUCTISOLS ont des caractéristiques d'avantage marquées par un excès d'eau plus ou moins permanent (Guenat et al., 2003). Dans ce cas, le déficit en oxygène est à l'origine du processus d'oxydoréduction qui se traduit par une redistribution des éléments dans le sol. L'anaérobiose provoque également une modification de l'activité biologique des sols qui entraîne un ralentissement de la décomposition de la matière organique conduisant à une accumulation de cette dernière dans le sol (Alard, 2002). D'un point de vue morphologique, les REDUCTISOLS, présentant des traits d'hydromorphie rédoxique ou réductique débutant à moins de 50 cm de la surface du sol (Guenat et al., 2003). Ils subissent des fluctuations de nappe et sont caractérisés par la présence d'horizons marqués par la redistribution du fer :

- des **horizons rédoxiques Go** (zone de battement de la nappe) où la saturation en eau est interrompue périodiquement et la nappe ennoyant les horizons sous-jacents. Des tâches de teintes rouille, souvent pâles, sont observables pendant les périodes de non-saturation. Cette ségrégation de couleur est fugace, elle disparaît quand l'horizon est de nouveau saturé en eau.
- des **horizons réductiques Gr** (zone constamment engorgée) qui sont caractérisés par leur couleur qui peut être soit uniformément bleuâtre à verdâtre (sur plus de 90% de la surface), soit uniformément blanche ou noire à grisâtre (AFES, 2009b).

Les HISTOSOLS sont marqués par un engorgement permanent ou quasi permanent provoquant l'accumulation de matières organiques peu ou pas décomposées. Ils sont caractérisés par la présence en surface d'horizons histiques tourbeux (H) issus du

ralentissement de la décomposition de la matière organique (AFES, 2009; Alard, 2002). On distingue deux types de tourbe : tourbe acide et tourbe basique (alcaline).

B. Le cycle du carbone

Le carbone est un des éléments essentiels de la planète, à la fois sous forme minérale et organique (Coletti et al., 2013; Hopkinson et al., 2012; Rich and King, 1999). Il existe trois grands réservoirs : l'atmosphère, les océans et la biosphère continentale (Hopkinson et al., 2012; Mitsch and Gosselink, 2002). Le dioxyde de carbone est un élément clé dans la mesure où il constitue la forme d'échange entre ces réservoirs. Les océans contiennent un pool stable de carbone piégé dans les sédiments de 30 Pt, et un pool labile de carbone en solution et dans la matière organique (Fontaine et al., 2007).

Dans le cycle du carbone, la photosynthèse et la respiration sont des processus clés. L'activité photosynthétique des plantes permet l'entrée de C organique dans le sol *via* la litière et les racines de la plante. La respiration des racines des plantes, la minéralisation du C organique par la microflore et la respiration de la méso- et macro- faune du sol sont les causes majeures des émissions de C du sol sous forme de CO₂ vers l'atmosphère (Coletti et al., 2013).

Dans un écosystème tempéré, selon Goulden et al. (1996), la respiration du sol (racines et microorganismes), représente environ 60% de la respiration totale. Le stock de C organique du sol résulte d'un régime établi entre les entrées, via la production végétale et les apports exogènes éventuels, et les sorties par minéralisation (Hopkinson et al., 2012; Zhang et al., 2011) (**Fig. 1.1.A**). Ces stocks sont deux fois plus importants dans les régions tempérées que dans les régions tropicales; 17.6 kg C m⁻² dans les régions tempérées contre 9.7 kg C m⁻² dans les régions tropicales (Bernal and Mitsch, 2008).

La minéralisation du C correspond à la transformation des formes organiques en formes minérales. La dynamique de la matière organique est généralement caractérisée par un renouvellement rapide, signe d'une bonne activité biologique (Coletti et al., 2013). Son évolution est à l'origine de la remise à disposition rapide d'éléments minéraux pour la végétation (Guenat et al., 2003). La minéralisation est principalement due aux microorganismes décomposeurs tels que les bactéries et les champignons (Edwards et al., 2006; Girard et al., 2005). Parmi les déterminants mis en jeu, les facteurs physiques (texture, profondeur, agrégation du sol) et biologiques du milieu (plantes, vers de terre et microorganismes) sont probablement très importants. La texture du sol influence la

minéralisation en rendant la MO plus ou moins accessible. La minéralisation du C est favorisée par une texture grossière alors qu'une texture fine et la présence d'agrégats la diminuent en « protégeant » la MO (Pinay et al., 1995; Scott Bechtold and Naiman, 2006; Thomsen et al., 2003). La minéralisation de la MO dépend aussi de sa qualité qui est généralement estimée par son ratio C/N : plus celui-ci est élevé, plus la décomposition est faible (Kampel et al., 2007) ; une vitesse de décomposition rapide quand le ratio est < 15 et faible pour les sols ayant un $C/N > 20$.

La présence d'eau stagnante et la forte productivité, en plus des conditions anaérobies, sont deux facteurs favorisant l'accumulation de carbone dans les sols des zones humides (Bernal and Mitsch, 2008; Coletti et al., 2013; Hopkinson et al., 2012; Mitsch and Gosselink, 2002). Les conditions anaérobies sont dues à l'oxygène des sols inondés qui est rapidement épuisé par la respiration des micro-organismes du sol et des racines. L'oxydation des matières organiques cesse et, les populations de micro-organismes commencent à modifier la composition ionique au niveau des racines (Hargrave, 1972; Reddy and Patrick, 1975; Reddy and Patrick, 1984). Le taux de stockage de C peut cependant être perturbé par les activités humaines (Mitsch and Gosselink, 2007). Le drainage des zones humides peut augmenter les taux de décomposition de la matière organique et ainsi augmenter la quantité de carbone relâchée dans l'atmosphère et accélérer les changements climatiques (Andersen, 2008; Coletti et al., 2013; Hoffmann et al., 2009).

C. Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote dans les sols des zones humides est caractérisé principalement par son absorption par les végétaux (Hernandez and Mitsch, 2007) et par la dénitrification (Groffman and Crawford, 2003; Mitsch et al., 2005). L'azote possède de multiples formes lui permettant de participer à de nombreuses réactions chimiques et biologiques (Groffman et al., 1998; Keffala and Ghrabi, 2005; Mitsch and Gosselink, 2002). Le cycle de l'azote (**Fig. 1.1.B**) est cependant principalement régi par des réactions microbiennes (*eubactéries*, *archaebactéries* et *champignons*) (Curie, 2006; Faulwetter et al., 2009). La plupart des auteurs (Groffman et al., 1998; Mitsch and Gosselink, 2002; Pinay and Tremolieres, 2000) s'accordent sur un schéma conceptuel du cycle de l'azote en zones humides en distinguant une zone anaérobie surmontée d'une zone aérobie (**Fig. 1.1.B**). La fixation biologique du N est un processus réalisé exclusivement par les procaryotes

(eubactéries et archaeobactéries) possédant le complexe enzymatique de la nitrogénase (Bougon, 2007). Ce dernier réduit le N_2 en ammoniac (NH_3) (ou ammonium, NH_4^+), l'azote inorganique dissout est la forme la plus bioassimilable. La réaction est contrôlée par plusieurs facteurs (**Tableau 1.2**), principalement les concentrations en oxygène (O_2) (Hernandez and Mitsch, 2007; Pinay et al., 1995; Reddy and Patrick, 1975; Reddy and Patrick, 1984). L'engorgement plus ou moins prolongé du compartiment sol des zones humides va entraîner des variations des conditions d'oxydo-réduction (liées entre autres à l'oxygénation) qui vont significativement influencer le cycle de l'azote (Pinay and Tremolieres, 2000; Reddy and Patrick, 1975). En effet, l'azote est présent sous forme organique dans les sols et les êtres vivants. Il est en effet un composant essentiel de la matière organique végétale et animale entrant dans la composition de protéines (acides aminés), d'acides nucléiques ainsi que de différents pigments (Mitsch and Gosselink, 2002). On le rencontre également sous forme minérale (gazeuse et dissoute) dont les principales sont regroupées dans le **Tableau 1.2**.

Tableau 1.2 : Principales formes de l'azote inorganique intervenant dans le cycle de l'azote

Formes de l'azote inorganique	Noms communs	Degré d'oxydation
NO_3^-	Nitrate	5
NO_2^-	Nitrite	3
NO	Oxyde nitrique	2
N_2O	Oxyde nitreux	1
N_2	Diazote	0
NH_3/NH_4^+	Ammoniaque /Ammonium	-3

La microflore de sol constitue l'acteur principal de la minéralisation de la matière organique du sol et de la dénitrification (Paul, 1989). C'est pourquoi les variations de minéralisation et de dénitrification sont généralement liées à des changements dans les communautés microbiennes (Andersen et al., 2006; Harris, 2003; Paul, 1989). Selon Andersen et al. (2006) l'absence de dénitrification observée dans la tourbière à sphaines restaurée est reliée à l'absence de populations dénitrifiantes. Les variations des paramètres physico-chimiques du sol, en modifiant les communautés microbiennes, influencent ces processus (Andersen et al., 2006; Baldwin and Mitchell, 2000). De nombreux facteurs influencent l'activité des microorganismes: température (Paul, 1989), teneur en oxygène (Matthew et al., 2006; Ratering and Conrad, 1998; Reddy and Patrick, 1975), la quantité et la qualité de la matière organique (Germon and Couton, 1999; Hefting et al., 2005; Lu

et al., 2009), la structure de sol (De-Campos et al., 2009; Paul, 1989; Sutton-Grier et al., 2010) et l'humidité (Groffman et al., 1998).

En conditions aérobies, c'est à dire en présence d'oxygène libre dans les sols, l'azote organique peut être minéralisé sous forme de nitrate via l'ammonification et la nitrification (**Fig. 1.1.B**). Les bactéries autotrophes du groupe *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* sont responsables des réactions de nitrification (Bougon, 2007; Curie, 2006). Ce sont des bactéries aérobies strictes, elles ne sont actives qu'en présence d'oxygène libre dans les sols. En conditions anaérobies, engendrées par l'effet combiné de la demande biologique en oxygène supérieure à l'offre et de sa limitation par l'engorgement des sols qui ralentit la diffusion de l'oxygène (Reddy and Patrick, 1975), seule l'ammonification est possible car les bactéries nitrifiantes sont des aérobies strictes (Curie, 2006).

D. Le cycle de soufre

Dans la plupart des sols, le soufre est un élément rare qui provient de la décomposition de la roche mère contenant des minéraux soufrés (pyrites par exemple). De nombreuses réactions biologiques ont lieu entre les sulfures, les sulfates et les formes intermédiaires d'oxydo-réductions qui participent au cycle du soufre (**Fig. 1.2**). Les bactéries et les végétaux interviennent activement dans ce cycle, ils sont capables d'assimiler le soufre minéral sous forme de sulfate et de sulfure pour synthétiser des acides aminés soufrés (réduction assimilatrice du sulfate). De plus, les bactéries sulfo-oxydantes oxydent les composés soufrés à l'état réduit (oxydation biologique), et les bactéries sulfato-réductrices réduisent les sulfates (réduction dissimilatrice du sulfate) et les formes partiellement oxydées du soufre. L'hydrogène sulfuré (H_2S) est le produit généralement excrété lors du métabolisme du soufre élémentaire et des sulfates, par les bactéries sulfo/sulfato-réductrices. Il est aussi le produit de la minéralisation des composés organiques soufrés (Peu, 2011).

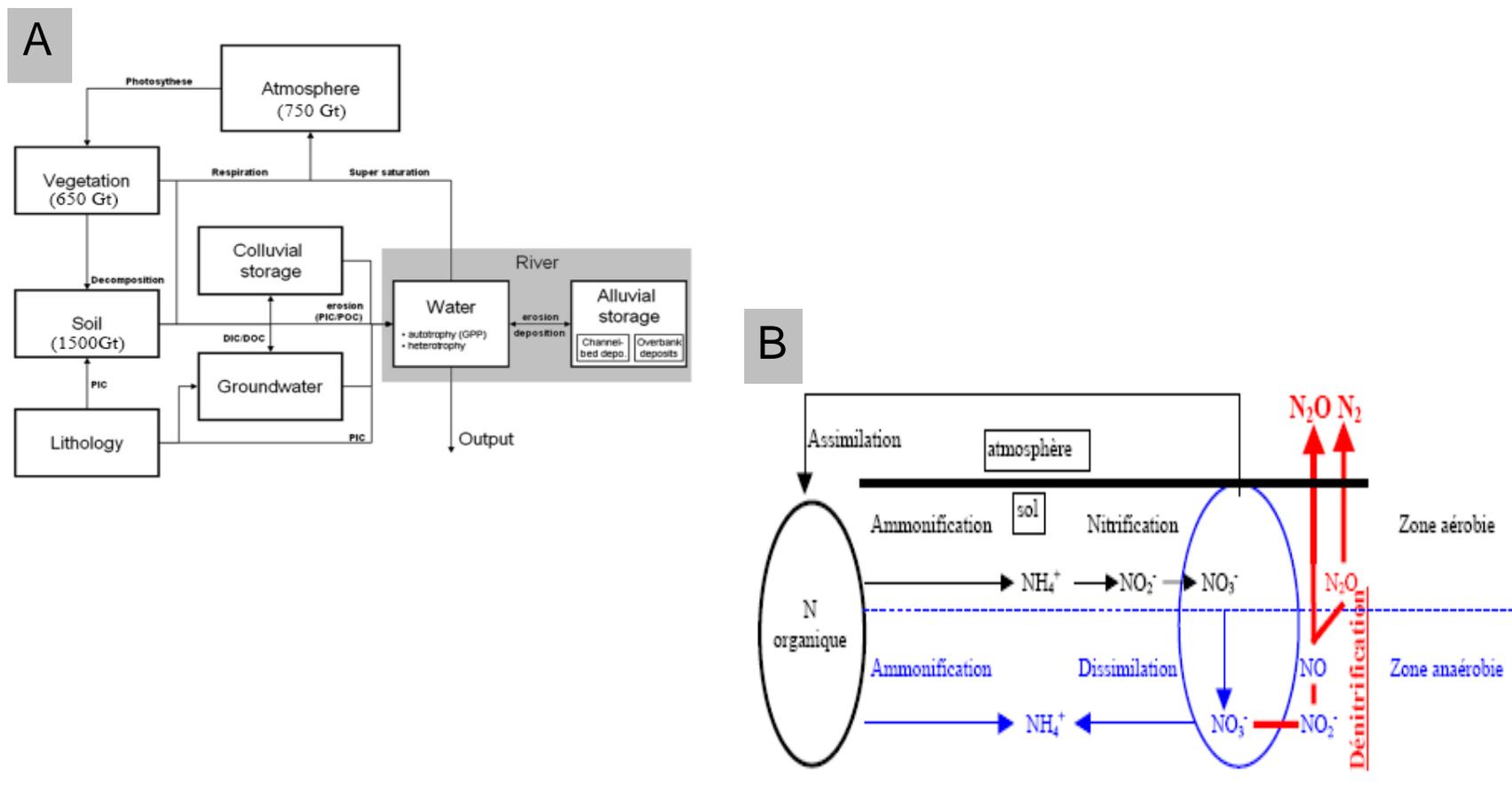


Figure 1.1. (A) Cycle du carbone avec un focus sur les transferts de sédiments dans les systèmes fluviaux (d’après Hoffmann et al. (2009) avec : PIC=Particulate Inorganic Carbon, POC=Particulate Organic Carbon, DIC=Dissolved Inorganic Carbon, DOC=Dissolved Organic Carbon, GPP=Gross Primary Production) (B) Cycle de l’azote dans un sol de zone humide présentant des conditions aérobies et anaérobies (Groffman et al., 1998; Pinay et al., 2002; Pinay and Tremolieres, 2000).

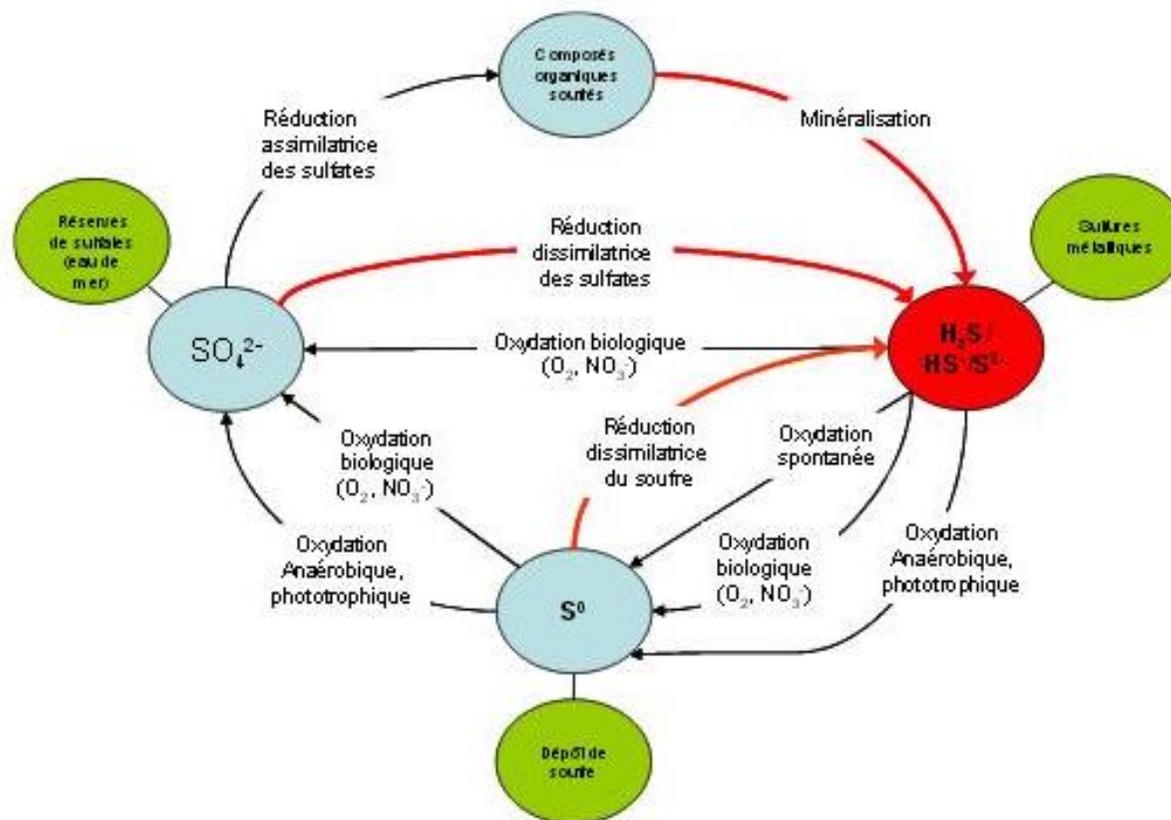


Figure 1.2. Le cycle du soufre et les voies de transformations (Peu, 2011).

I.2. Les communautés microbiennes

Les sols inondés sont caractérisés par des gradients de stratification ou géochimiques qui peuvent être considérés comme un avantage énergétique par les microorganismes affiliés aux *Bacteria* ou aux *Archaea*. La dégradation de la matière organique est ainsi liée aux différentes conditions redox présentes dans cette stratification mais aussi à la présence d'accepteurs d'électrons dans le cadre des respirations. L'oxydation de la matière organique est réalisée en partie par les micro-organismes affiliés aux domaines *Bacteria* et *Archaea*. Celle-ci peut être réalisée par des processus de respiration et des processus de fermentation dans une moindre mesure. Les processus de respiration sont ainsi dépendants de la présence d'accepteurs d'électrons : O_2 , N_2O , NO_3^- , MnO_2 , $Fe(OH)_3$, SO_4^{2-} , et CO_2 (**Fig. 1.3**). L'oxygène libre est tout d'abord utilisé par les micro-organismes lors de la respiration aérobie. Les nitrates sont réduits en second lors de la dénitrification, viennent ensuite la réduction des oxydes de manganèse, des oxydes de fer, des sulfates et enfin du dioxyde de carbone en méthane (Faulwetter et al., 2013; Faulwetter et al., 2009) (**Tableau 1.3**). Cette séquence de réduction est accompagnée d'une chute du potentiel redox (Faulwetter et al., 2009) celui-ci étant plus élevé lorsque le milieu est riche en espèces oxydées. Le **Tableau 1.3** présente les réactions de réduction ainsi que les valeurs de potentiels redox auxquels elles ont lieu. En ce sens, l'approfondissement de la compréhension de la relation entre le potentiel redox et la structure et la fonction des micro-organismes est plus que pertinent. Dans la présente étude nous nous sommes particulièrement intéressés à deux groupes métaboliques ; l'un lié au cycle d'azote (les microorganismes dénitrifiants) et l'autre lié au cycle du soufre (les microorganismes sulfato-réducteurs). Cependant le suivi des bactéries sulfato-réducteurs dans ce travail serait utile pour la compréhension du fonctionnement de sol dans des conditions d'inondation.

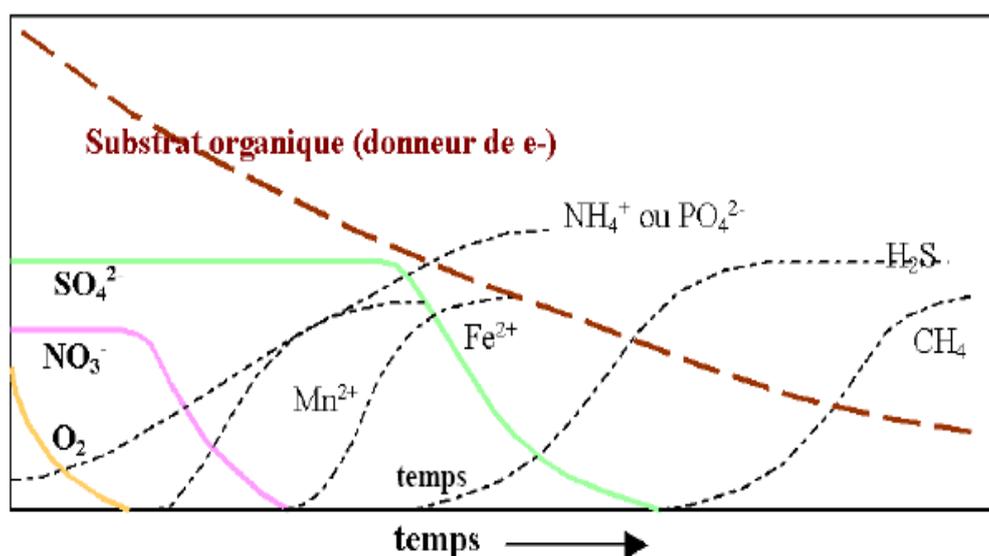


Figure 1.3. Evolution de la concentration relative des différents composés chimiques en fonction du temps.

Tableau 1.3. Séquence de ces réactions (Faulwetter et al., 2009)

Process	Electron acceptor (EA)	Redox potential E_h (mV)
Aerobic respiration	O_2	300 to 700
Nitrate reduction	NO_3^-	100 to 350
Manganese reduction	Mn^{4+}	100 to 350
Iron reduction	Fe^{3+}	100 to 350
Sulfate reduction	SO_4^{2-}	100 to 350
Methanogenesis	CO_2	100 to 350

I.2.1 Les microorganismes dénitrifiants

A. Ecologie des microorganismes dénitrifiants

La dénitrification est une des réactions de réduction réalisées par les microorganismes lors de la dégradation de la matière organique (Hefting et al., 2005; Lu et al., 2009). Cette réaction de réduction s'inscrit dans une séquence de réduction de différentes espèces oxydées allant de la plus énergétique à la moins énergétique (Faulwetter et al., 2009) (**Tableau 1.3**). C'est un processus biologique réalisé par les microorganismes chemoorganotrophes facultativement aérobiques. Ces microorganismes, capables de respirer des nitrates, appartiennent à des groupes taxonomiques très variés et possèdent des caractéristiques physiologiques très diversifiées (Zumft, 1997). Ils

proviennent des trois principales branches de l'arbre du vivant *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* (Zumft, 1997). La majorité des microorganismes dénitrifiants sont des bactéries hétérotrophes utilisant du carbone organique pour la synthèse cellulaire et tirant leur énergie de l'oxydation de ces composés organiques (organotrophes) (Dambreville, 2007). Il est à noter qu'un même micro-organisme ne possède pas nécessairement toutes les enzymes de la dénitrification. De ce fait, les différentes étapes de la dénitrification peuvent avoir lieu indépendamment les unes des autres, spatialement et temporellement (Bougon, 2007; Zumft, 1997). Certaines bactéries dénitrifiantes sont capables d'accomplir le processus de dénitrification entièrement, jusqu'à la formation de N_2 telle que *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus azotoformans* et *Azotpirillum brasilense*, d'autres produisent un mélange de N_2O et N_2 (*Alcaligenes sp.* et *Flavobacterium sp.*) ou uniquement du N_2O (*Aquaspirillum fasciculus*, *Aquaspirillum itersonii* et *Corynebacterium nephridii*) (Dambreville, 2007).

B. Les enzymes impliquées dans la dénitrification

La dénitrification est un processus respiratoire anaérobie au cours duquel les formes oxydées de l'azote (nitrate et nitrite) servent d'accepteurs terminaux d'électrons et sont réduites en azote gazeux (Pinay and Decamps, 1988; Pinay et al., 1995). Cette chaîne de réduction de l'azote requiert 4 étapes enzymatiques catalysées par réductases (**Fig. 1.4.A**). L'enzyme impliquée dans la réduction de NO_3^- en NO_2^- est la **nitrate réductase (Nar)**, la réduction de NO_2^- en NO est la **nitrite réductase (Nir)**, la réduction de NO en N_2O est l'**oxyde nitrique réductase (Nor)** et N_2O en N_2 est réalisée par l'**oxyde nitreux réductase (Nos)** (Bougon, 2007; Braker et al., 2000). Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'**oxyde nitreux réductase (Nos)** qui selon Barrett et al. (2013) peut donner une idée sur le niveau de dénitrification.

I.2.3 Les microorganismes sulfato-réducteurs

A. Ecologie des microorganismes sulfato-réducteurs

La communauté des microorganismes sulfato-réducteurs (MSR) est morphologiquement et physiologiquement diversifiée. En effet, parmi les MSR, on trouve des bactéries mésophiles qui sont aussi bien Gram négatif que Gram positif mais aussi des bactéries thermophiles et, certaines font partie du domaine des *Archaea*. Les microorganismes sulfato-réducteurs, de par leur physiologie diversifiée, sont capables de coloniser des milieux différents (Besaury, 2012; Quillet et al., 2012). Ils sont

responsables d'à peu près 50% de la dégradation de la matière organique dans les sédiments vaseux (Quillet et al., 2012) et sont décrits comme capable d'utiliser le sulfate comme accepteur final d'électrons. Néanmoins, en absence de sulfate comme accepteur d'électrons, ils sont capables d'utiliser d'autres composés soufrés tels le sulfite, le thiosulfate ou le soufre élémentaire. Depuis leur découverte, les MSR sont considérés uniquement comme des microorganismes anaérobies ne supportant pas la présence d'oxygène. Néanmoins certains travaux ont permis d'isoler des MSR dans des interfaces aérobies/anaérobies (Besaury, 2012).

B. Les enzymes impliquées dans la sulfato-réduction

Parmi les différentes enzymes-clés de la sulfato-réduction, 2 ont fait l'objet d'études moléculaires utilisant leur séquences codantes ; il s'agit dans le premier temps de la bisulfite-réductase (Wagner et al., 1998) et de l'adénosine-5-phosphatase réductase (Meyer and Kuever, 2007). Lors de notre travail, nous nous sommes intéressés à la bisulfite-réductase (**DsrAB**). Elle se trouve chez tous les microorganismes sulfato-dissimilatrice. Elle intervient dans le processus de réduction de sulfite en sulfure par la voie dissimilatrice (**Fig. 1.3.B**). La protéine **DsrAB** est une protéine d'environ 200 kDa, constituée au minimum de deux sous-unités de conformation $\alpha_2\beta_2$. Le site catalytique de l'enzyme se situe dans la sous-unité β et est composé d'un centre fer-soufre [4Fe-4S] lié à un cofacteur enzymatique de type sirohème permettant le transfert d'électron lors de la transformation du sulfite en trithionate (Besaury, 2012; Meyer and Kuever, 2007; Muyzer and Stams, 2008). Les gènes *dsr* (dissimilatory sulfite reductase) codant pour cette protéine sont organisés en opéron associant trois à cinq gènes nommés A, B, C, D et N suivant les espèces bactériennes (**Fig. 1.4.B**). Les gènes *dsrA* et *dsrB* codent respectivement pour les sous-unités α et β de la protéine. Le gène *dsrD* code pour une sulfite réductase D qui aurait un rôle dans la régulation de transcription des gènes *dsr*. Le gène *dsrN* code pour une sirohème amidase qui entre en jeu dans la fonctionnalisation de la protéine DsrAB (Zverlov et al., 2005) (**Fig. 1.4.B**). Le gène *dsrC* quant à lui coderait pour une sous-unité γ qui aurait un rôle de donneur d'électron sur le site catalytique de la protéine DsrAB. De plus, les relations phylogénétiques entre les différents MSR basées sur l'ADNr16S sont corrélées à l'analyse des séquences de celles retrouvées pour le gène *dsrAB* (Klein et al., 2001).

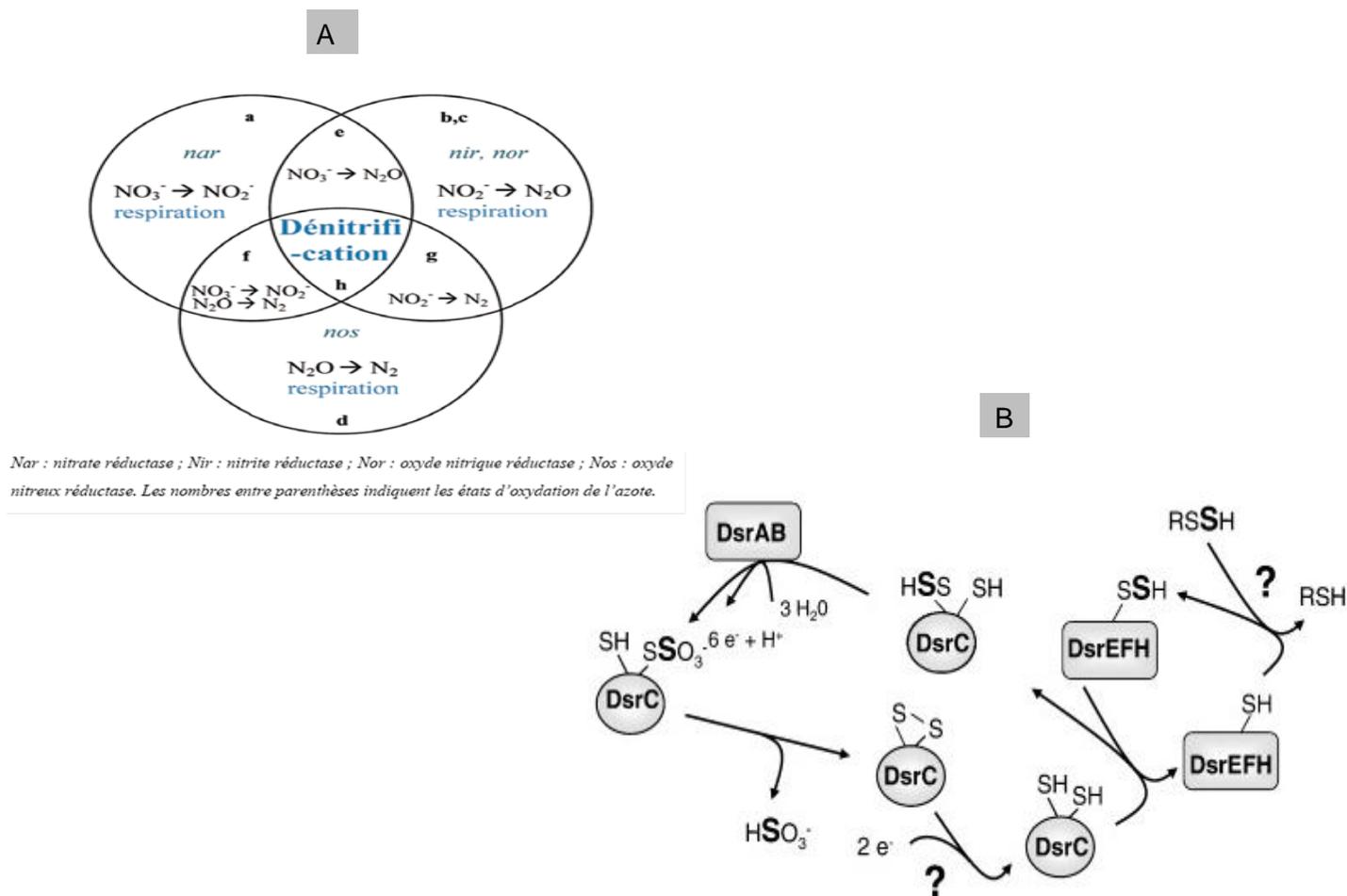


Figure 1.4. (A) Organisation en modulaires de la dénitrification. Et (B) Organisation en modulaires de la sulfato-réduction (Zumft, 1997).

I.3 Le contexte géographique : l'estuaire de la Seine

I.3.1 Présentation générale de l'estuaire de la Seine

Le terme estuaire vient du latin *aestus* qui signifie marée sur le plan morphologique, l'estuaire est définitivement comme une vallée fluviale ouverte sur l'océan. Sur le plan écologique, l'estuaire est un écosystème qui constitue une interface d'échange entre les domaines continentaux et marins. Par ses dimensions, l'estuaire de la Seine (50Km²) est après la Gironde (625Km²) et la Loire (60Km²) le troisième estuaire français.

L'estuaire de la Seine est dit « macrotidal » (Guézennec, 1999). Ce terme signifie que l'estuaire est soumis à de fortes amplitudes de marée, de l'ordre de 7m, qui expliquent que l'influence de cette dernière se fasse sentir très en amont dans le fleuve. Le niveau des eaux varie deux fois par jour. Cette variation de niveau est accompagnée d'un changement de sens de l'écoulement des eaux ; d'amont en aval lorsque la marée est descendante (période de jusant) et d'aval en amont lorsque la marée est montante (période de flot). Fairbridge (1980) Proposa une définition et un découpage des estuaires en plusieurs secteurs : « *Un estuaire est un bras de mer pénétrant une vallée fluviale jusqu'à la limite amont de propagation de la marée, habituellement divisible en 3 secteurs : l'estuaire amont ou estuaire fluviale, l'estuaire moyen et l'estuaire aval ou estuaire marin* ». Dans le cas de l'estuaire de Seine (**Fig. 1.5**), ces différents secteurs sont les suivants :

- L'estuaire amont s'étend de Poses (pK 202) à Vieux-Port (pK 325) et se caractérise par de l'eau douce mais reste sujet aux actions quotidiennes de la marée (estuaire fluviale),
- L'estuaire moyen (intermédiaire) s'étend de Vieux-Port à Honfleur et se caractérise par un mélange entre eau douces et eaux salées,
- L'estuaire aval s'étend de la limite de la baie de Seine et Honfleur et constitue un milieu toujours salé (estuaire marin).

Les limites entre ces trois secteurs sont variables et sujettes aux constantes variations du débit fluvial.

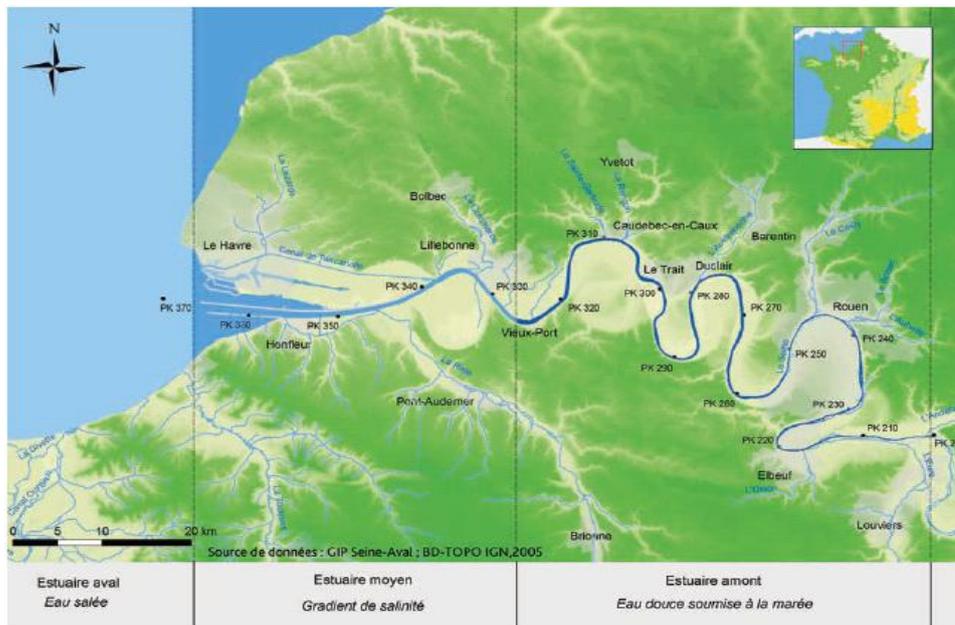


Figure 1.5. Carte de la Seine, du barrage de Poses à la baies de Seine (Guézennec, 1999).

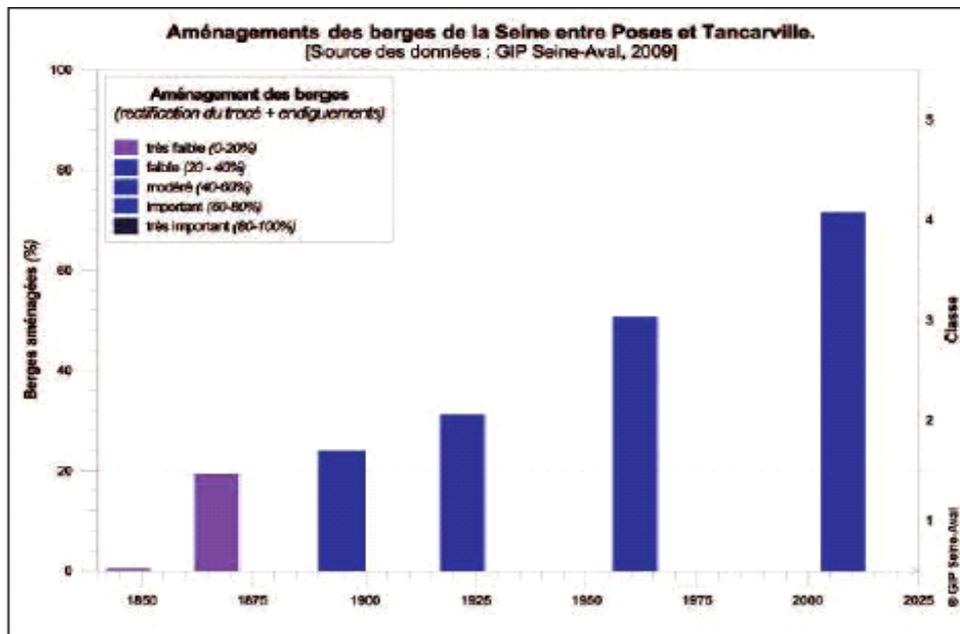


Figure 1.6. Aménagements des berges de la Seine entre Pose et Tancarville (GIP, Seine-Aval 2009).

I.3.2 Impacts des activités humaines sur les zones humides et nécessité d'une restauration écologique

Les milieux estuariens sont en perpétuels changements, que ceux-ci soient d'origine naturelle ou provoqués par les activités humaines. Selon Guézennec (1999), l'estuaire de la Seine est le plus aménagé et le plus industrialisé de France. Son état actuel de dégradation résulte essentiellement de l'interaction de deux phénomènes majeurs liés au développement économique du pays ; (i) son rôle de voie de communication et (ii) l'augmentation des populations (Guézennec, 1999). L'aménagement de l'estuaire n'est pas récent et a commencé il y a plusieurs siècles déjà afin de favoriser le commerce avec l'Angleterre puis, par la suite, avec l'Amérique. Pour ne citer que cet exemple, la ville du Havre a été construite au 16^{ème} siècle dans une zone marécageuse et des aménagements ont été nécessaires pour la stabiliser (**Fig. 1.6**). Durant la deuxième moitié du 19^{ème} et le 20^{ème} siècle, la basse vallée de Seine a connu une forte industrialisation et un accroissement important de sa population. C'est durant cette période que l'aménagement de la Seine a été le plus important, essentiellement afin de favoriser le transport fluvial mais également afin de limiter les crues et ainsi permettre l'exploitation et l'installation des habitants dans la plaine inondable.

La Seine et son estuaire représentent un territoire économique majeur pour la France notamment par ses deux ports maritimes : le Grand Port Maritime de Rouen et le Grand Port Maritime du Havre :

- Le Grand Port Maritime de Rouen (**GPMR**) a été créé en 1966 à la suite de la Loi sur l'autonomie des Ports de 1965. C'est un port d'estuaire comme Hambourg, Montréal et Anvers. La justification économique du GPMR vient de sa position géographique entre l'Île de France (bassin parisien *sensu lato*) i.e. la zone la plus dense de France avec 22 million d'habitants dans un rayon de 200 Km et, la manche i.e. l'artère maritime la plus fréquentée du globe. De 3500 à 4000 navires font escale dans le port de Rouen chaque année. Les vrac industriels comme les produits pétroliers raffinés, produits chimiques ou encore charbon représentent environ la moitié du trafic global. Le GPMR est le premier port européen exportateur de céréales et le premier port exportateur de blé au monde. L'ensemble du trafic céréalier et agroalimentaire totalise maintenant près de la moitié du trafic portuaire (Guézennec, 1999; Samson et al., 2002a).

- Le Grand Port Maritime du Havre (**GPMH**) est au 4^{ème} rang européen après Rotterdam, Anvers et Hambourg. Port maritime en eau profond, le Havre bénéficie des conditions nautiques remarquables, accessibles à tout moment aux navires de 14,50 m de tirant d'eau. Le trafic global représente près de 100 millions de tonnes de marchandises dont 70 Mt pour le Havre et 20 Mt pour Rouen.

Ces ports ont fait, et font toujours, l'objet de l'essentiel des aménagements. Actuellement, le premier endigue, drague et calibre l'intérieur de l'estuaire afin de permettre à des bateaux de plus en plus gros d'atteindre la ville de Rouen tandis que le second aménage l'embouchure et gagne de plus en plus sur la mer. Il en résulte que la partie de l'estuaire en aval de Rouen est complètement endiguée et que seuls quelques sites en amont de Rouen présentent des berges « naturelles ». A partir de 1834, l'estuaire de la Seine fut progressivement aménagé et perdit son « caractère sauvage ». Les travaux d'aménagements du fleuve s'expliquent à la fois par la volonté d'améliorer la navigation, d'augmenter les zones de culture, et de protéger les populations contre les risques d'inondations. La construction et l'entretien (dragage) du chenal de navigation, les endiguements successifs, l'activité d'extraction de sables et de graviers alluvionnaires ainsi que l'extension des terres agricoles ont considérablement réduit la surface de zones humides dans la vallée.

Afin de maintenir leurs activités et de conserver des profondeurs suffisantes pour accueillir les navires, les ports estuariens réalisent des dragages d'entretien réguliers de leurs bassins et de certaines parties du chenal de navigation. Plus de 4,5 millions de m³ de sédiments sont dragués puis immergés annuellement à l'embouchure de l'estuaire de la Seine. Ces dragages permettant de maintenir un tirant d'eau de 10,70m à la remontée de la Seine et de 10,30 m à la descente (Samson et al., 2002a).

Jusqu'à la moitié de 19^{ème} siècle, l'estuaire de la Seine était un système très dynamique aux caractéristiques morphologiques naturelles, qui rendaient la navigation en Seine périlleuse. Ainsi pour des besoins économiques et sécuritaires, la réalisation de nombreux aménagements dès 1848 (endiguement) allait dans le sens d'une stabilisation et d'un approfondissement du chenal de navigation (Guézennec, 1999; Meybeck et al., 1998; Samson et al., 2002a). Les aménagements du fleuve créent un chenal fixé sur-creusé. En arrière des digues, les étendues ainsi séparées du fleuve, ont été peu à peu colmatées par

les apports des hautes eaux et conquises par l'agriculture. La place de l'activité humaine dans ce paysage devient prépondérante et donne une vocation agricole au paysage de la vallée (Alard, 2002). Ces travaux d'aménagements, en empêchant les débordements du fleuve, ont aussi perturbé le fonctionnement hydrologique de ces zones, autrefois liées aux épisodes de crues, maintenant essentiellement dû aux variations de la nappe souterraine. Ces crues constituent le moteur du fonctionnement par pulsation des hydrosystèmes fluviaux (fonctionnement de type « flood pulse » des anglo-saxons) en assurant la connexion périodique du chenal principal avec les écosystèmes avec la plaine alluviale (Amoros and Petts, 1993). L'exploitation des granulats d'un gisement alluvial provoque une mise à découvert locale des eaux souterraines (Guézennec, 1999; Samson et al., 2002a). D'après Meybeck et al. (1998), 84 millions de tonnes par an de granulats sont nécessaires sur le bassin dans les secteurs du bâtiment et des travaux publics, 66 % proviennent des gisements alluvionnaires soit 55 Mt.an⁻¹. Dans l'ensemble du bassin on recense 500 sites actuels d'extraction et plusieurs milliers de plans d'eau.

C'est pourquoi réduire les effets négatifs qui dégradent les zones humides, leur biodiversité et leurs fonctions écologiques est une raison importante de s'intéresser encore plus à leur restauration. En dépit des diverses atteintes au fonctionnement du fleuve et de son estuaire, l'estuaire de la Seine constitue un milieu qui abrite encore des nombreuses zones humides (vasières, prairies humides, tourbière...) et représente un ensemble écologique de première importance pour la biodiversité au niveau international (Alard, 2002; Beaumais and Laroutis, 2007). A l'embouchure de la Seine, les zones humides comprennent : des prairies marécageuses (marais Vernier) (Alard, 2002), des roselières (marais du Hode) (Chabrierie et al., 2001), des prairies humides riveraines du fleuve (marais de la Risle), des vasières intertidales, des tourbières (Heurteauville, Grand-Mare). Elles s'étendent sur environ 14 000 ha (**Tableau 1.4**) et comportent principalement des prairies humides (8790 ha) et des roselières (1280 ha). Lieux d'une très haute biodiversité, elles sont favorables à la migration d'oiseaux et accueillent en hiver plus de 80% des 116 espèces d'oiseaux d'eau hivernant en France. Les caractéristiques des zones humides en font des habitats de reproduction privilégiés pour certains groupes d'oiseaux et constituent des haltes potentielles pour les migrateurs en transit par l'Europe de l'Ouest.

Au cours des dernières décennies, la prise de conscience de la valeur écologique, fonctionnelles et patrimoniale des espaces naturels, ainsi que l'évolution des politiques de protection, avec notamment la mise en œuvre de la directive européenne « Habitat-Faune-Flore » de 1992, ont entraîné la réalisation de nombreuses opérations de restauration écologique.

Tableau 1.4. Tableau qui traduit la surface des zones humides de l'estuaire (Alard, 2002).

Type de zones humides	Nbr d'hectares
Prairies humides	8790
Bois tourbeux	360
Roselières	1280
Vasières fosse nord	1187
Vasière ancienne réserve	877
Mares réserves hors prairies	177
Dunes réserves	56
Espaces préservé	70
Plaine alluviale rive gauche	772
Prairies et littoral Pennepie	55
Zones intertidales rive sud	500
Autres	150
Total	14274

I.4 Ecologie de la restauration

I.4.1 Définitions

Durant les dernières décennies, de nombreux écosystèmes terrestres ont été endommagés ou perturbés de manière extensive voire irréversible par l'homme (Andersen, 2008; Bangirinama et al., 2012; Cristofoli and Mahy, 2010; Mitsch and Gosselink, 2002; Sawtschuk, 2012). La population humaine toujours croissante qui modifie le paysage, la présence de nombreuses espèces invasives et les changements climatiques ajoutent une menace à la survie de ces écosystèmes (Mitsch and Gosselink, 2007; Sawtschuk, 2012). Sans intervention, leur existence pourrait être compromise pour les générations futures (Harris et al., 2006). La restauration écologique est un concept

relativement nouveau, qui s'est fortement développé ces vingt dernières années tant sur le plan théorique qu'au niveau des applications concrètes sur le terrain (Bangirinama et al., 2012; Cristofoli and Mahy, 2010).

La restauration écologique est définie par la Société internationale de restauration écologique (Society for Ecological Restoration) comme « *le processus susceptible d'assister la régénération d'un écosystème présentant un état dégradé, abîmé ou détruit* ». Bien que plusieurs autres définitions légèrement différentes aient été proposées et utilisées, toutes convergent vers le même principe: l'intervention humaine consiste généralement à éliminer ou à modifier les sources de perturbations afin d'assurer la réinitialisation des processus écologiques clés (Andersen, 2006; Gutrich et al., 2009; Harris et al., 2006; Sawtschuk, 2012). Selon Andersen (2008) la restauration écologique peut être aussi définie comme l'ensemble des procédés visant à amener et à maintenir l'état de santé d'un écosystème perturbé à un niveau fonctionnel. Boyer and Piégay (2003) définissent ainsi la restauration écologique comme « *étant une intervention préalable à un programme d'entretien, et qui est destinée à obtenir ou à retrouver un état souhaité, sans chercher systématiquement, pour répondre à des besoins nouveaux, un état historique de référence, qui lui, répondait à des usages qui ont souvent disparu aujourd'hui* ». Selon Cristofoli and Mahy (2010), il s'agit d'un complément essentiel à la conservation. Le type d'intervention nécessaire à la restauration dépend beaucoup du type de dégâts imposés à l'écosystème et de leur étendue. Parfois, il suffit simplement de supprimer la cause des perturbations, dans le cas où elle est modérée (Aronson et al., 1993b). Plus le milieu est dégradé et plus les fonctionnalités fondamentales sont altérées, plus la restauration sera difficile et onéreuse (Hobbs, 2007).

Une représentation schématique de la dynamique temporelle d'un écosystème dégradé, incluant les 6 étapes de la restauration, est proposée à la **figure 1.7**. Quatre voies principales sont identifiées en écologie de la restauration. Les notions de **degré de dégradation** et de **seuil d'irréversibilité** sont essentielles à la détermination de ces voies. Le terme de **restauration** est réservé à des écosystèmes peu dégradés. Dans ce cas, le retour vers l'écosystème préexistant ou presque est possible. En effet, la restauration **au sens strict** tend à retrouver la structure, le fonctionnement, la diversité et la dynamique de l'écosystème historique. La restauration **au sens large** vise à rediriger l'écosystème perturbé vers une trajectoire dynamique présumée ressembler à celle qui prévalait avant le

début des perturbations (Aronson et al., 1993a). Cela sous-entend que l'écosystème ait conservé un niveau de résilience suffisant pour qu'il puisse retrouver son état antérieur. Ceci implique qu'il a la capacité de récupérer les attributs structuraux et fonctionnels ayant subi des dommages causés par un stress ou une perturbation (SER, 2004a).

A partir du moment où le seuil d'irréversibilité est atteint, le retour vers l'écosystème préexistant n'est plus réalisable et les écosystèmes présents sont gravement voire très gravement dégradés. A ce stade de dégradation, trois voies sont possibles. Il y a possibilité de **régénération** lorsqu'il y a retour vers un nouvel écosystème, mais dans le cas où le site a été délaissé un long moment et qu'il a tendu vers cet état par lui-même. Le terme de **réhabilitation** est utilisé quand il y a une création d'un écosystème alternatif écologiquement viable, éventuellement différent en termes de structure, de composition et de fonctionnement de l'écosystème originel, et présentant une certaine valeur d'usage. Enfin, la **réaffectation** est le terme général décrivant ce qui se passe quand une partie (ou la totalité) d'un paysage, quel que soit son état, est transformée et qu'un nouvel usage lui est assigné, Ce nouvel état est éventuellement sans relation de structure et/ou de fonctionnement avec l'écosystème préexistant.

I.4.2 Origines et évolution de la restauration écologique

Les pratiques de restauration écologique se sont développées aux États-Unis dans les années 70, avec la mise en place de réglementations concernant la protection des ressources naturelles et la compensation écologique (Buisson, 2005a). La création, en 1987, de la Société internationale de restauration écologique (*Society for Ecological Restoration*, SER) a permis de réunir et de structurer les praticiens et les scientifiques, ainsi que de définir des principes généraux (SER, 2004a).

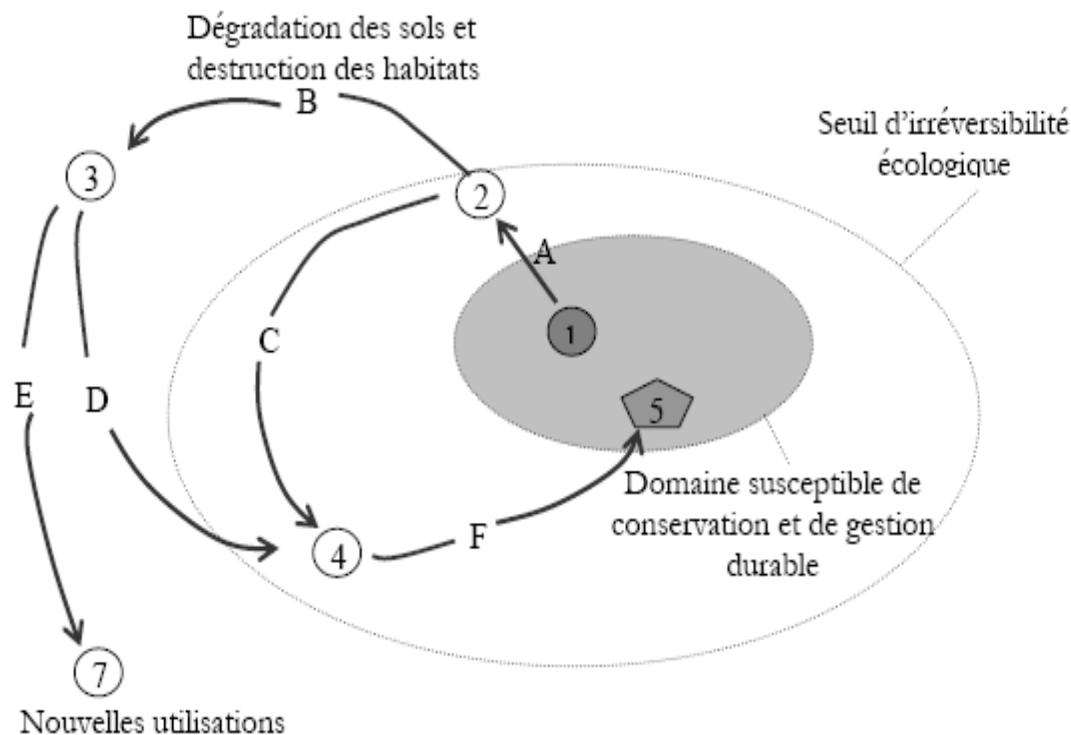


Figure 1.7. Modèle général du processus de dégradation des écosystèmes et les réponses possibles pour leur restauration (**A**) Processus écologique de dégradation (perturbation limitées) ; (**B**) Processus écologique de dégradation (perturbation prolongées et répétitives) ; (**C**, **D**) Phases de réhabilitation ; (**E**) Phase de réaffectation; (**F**) Phase d'accompagnement ou de restauration passive); (1) Stade initial à résilience maximale; (2) Stade modifié sans dépassement du seuil d'irréversibilité; (3) Stade dégradé; (4) Stade réhabilité; (5) Écosystème objectif de la restauration (Bangirinama et al., 2012).

En France, le colloque « Recréer la nature » qui s'est tenu en 1994 à Orx a été le point de départ du Programme national de recherche « Recréer la nature, Réhabilitation, restauration et création d'écosystèmes » mis en place en 1995 par le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement (Sawtschuk, 2012). Ce programme avait pour objectif d'élaborer des méthodologies et des outils performants et opérationnels concernant la réhabilitation, la restauration et la création d'écosystèmes. C'est seulement à la fin de cette dernière décennie que plusieurs réseaux nationaux se structurent : REVER, Réseau d'échanges et de valorisation en écologie de la restauration ; GAIE, Groupe d'application de l'ingénierie des écosystèmes ; AGEBIO, Association française de génie biologique pour le contrôle de l'érosion des sols. Ce dynamisme se traduit également par la tenue d'une conférence internationale sur l'ingénierie écologique à Paris en 2009 et par l'organisation de la 7ème conférence européenne de restauration écologique à Avignon en 2010 (Sawtschuk, 2012).

I.4.3 Démarches d'une opération de restauration écologique

Une étape cruciale d'un projet de restauration est la sélection d'un écosystème de référence. Le choix de cet écosystème adéquat constitue la première étape de la restauration écologique.

A. *Etat de référence*

Celui-ci a été défini par Aronson et al., (1995b) comme une approximation de l'état souhaitable, une norme choisie parmi plusieurs états alternatifs possibles et accessibles par une succession d'étapes appelée trajectoire. Cet écosystème de référence est essentiel pour déterminer les objectifs de restauration et pour évaluer la réussite des opérations de restauration (Andersen, 2008; Bangirinama et al., 2012; Sawtschuk, 2012). D'après Aronson and Galatowitsch (2008), cet état de référence doit être identifié afin de (i) caractériser la cible (écosystème originel ou choisi) pour sa composition, sa structure et son fonctionnement, par rapport à l'existant, (ii) déterminer les facteurs de la dégradation ou transformation, (iii) définir ce qui doit être fait pour restaurer, réhabiliter ou rajeunir l'écosystème et (iv) choisir les critères ou indicateurs à mesurer pour évaluer le succès des opérations de restauration écologique.

B. Les principes essentiels

Les écosystèmes changent dans l'espace et le temps et sont donc dynamiques. Le terme d'écosystème de référence peut apparaître statique, dans ces conditions, le terme de trajectoire dynamique peut être utilisé car plus centré sur le fait que les écosystèmes sont dynamiques (Aronson et al., 1995a; Buisson, 2005b). En effet, une trajectoire écologique est celle qui décrit le chemin évolutif d'un écosystème au cours du temps (SER, 2004a). La trajectoire englobe tous les attributs écologiques - biotiques et abiotiques - d'un écosystème, et en théorie peut être suivie par la mesure séquentielle de suites cohérentes de paramètres écologiques (SER., 2004).

Afin de suivre au mieux la restauration, l'écosystème de référence, l'écosystème à restaurer et l'écosystème environnant ont besoin d'être évalué. Aronson et al. (1995b) définissent comme étant "*vital ecosystem attributes : VEA*" les caractéristiques ou attributs qui sont corrélés et peuvent servir d'indicateurs de la structure et du fonctionnement d'un écosystème. Ils peuvent donc servir dans la formulation d'hypothèses et la conception d'expérimentations relatives à la restauration et à la réaffectation. Selon Aronson et al. (1995b), il est possible de présenter plusieurs classements des attributs que nous avons retenus selon qu'ils qualifient, par exemple, plus particulièrement la structure ou le fonctionnement de l'écosystème. Il paraît cependant préférable de les présenter selon l'ordre logique suivant:

- (1) richesse floristique en espèces pérennes,
- (2) richesse floristique en espèces annuelles,
- (3) spectre biologique,
- (4) diversités alpha et bêta des végétaux et des animaux,
- (5) recouvrement total de la végétation,
- (6) phytomasse aérienne sur pied,
- (7) productivité de la biomasse,
- (8) présence et activité des espèces clés de voûte (végétales et/ou animales),
- (9) stock de graines viables dans le sol,
- (10) état de la surface du sol,
- (11) coefficient d'infiltration des pluies,
- (12) coefficient d'efficacité des pluies,
- (13) réserve maximale en eau disponible,
- (14) durée de disponibilité en eau du sol,

- (15) matière organique du sol,
- (16) capacité d'échange cationique,
- (17) efficacité d'utilisation de l'azote,
- (18) indices des cycles des matériaux,
- (19) abondance relative de mésofaune détritivore,
- (20) infectivité potentielle par les rhizobiums,
- (21) infectivité potentielle par les mycorrhizes.

Quand la trajectoire désirée est réalisée, l'écosystème manipulé ne requiert plus d'assistance extérieure pour assurer son fonctionnement et son intégrité future ; dans ce cas, la restauration peut être considérée comme achevée. Cependant, l'écosystème restauré nécessite souvent une gestion continue (SER, 2004b). Selon l'International Primer on Ecological Restoration (SER, 2004a), un écosystème est restauré (régénéré) lorsqu'il possède les neuf attributs suivants :

- *l'écosystème restauré contient un ensemble caractéristique d'espèces de l'écosystème de référence qui procure une structure communautaire appropriée,*
- *l'écosystème restauré est constitué pour la plupart d'espèces indigènes,*
- *tous les groupes fonctionnels nécessaires à l'évolution continue et/ou à la stabilité de l'écosystème restauré sont représentés ou, s'ils ne le sont pas, les groupes manquants ont la capacité à le coloniser naturellement,*
- *l'environnement physique de l'écosystème restauré est capable de maintenir des populations reproductrices d'espèces nécessaires à sa stabilité ou à son évolution continue le long de la trajectoire désirée,*
- *l'écosystème restauré fonctionne en apparence normalement lors de sa phase écologique de développement et les signes de dysfonctionnement sont absents,*
- *l'écosystème restauré est intégré comme il convient dans une matrice écologique plus large ou un paysage, avec qui il interagit par des flux et des échanges biotiques et abiotiques,*
- *les menaces potentielles du paysage alentour sur la santé et l'intégrité de l'écosystème restauré ont été éliminées ou réduites autant que possible, l'écosystème restauré est suffisamment résilient pour faire face à des événements normaux de stress périodiques de l'environnement local, ce qui sert à maintenir l'intégrité de l'écosystème,*

- *l'écosystème restauré se maintient lui-même au même degré que son écosystème de référence et a la capacité à persister indéfiniment sous les conditions environnementales existantes. »*

Tous ces attributs ne sont cependant pas nécessaires pour décrire la restauration et ne sont pas exhaustifs (SER, 2004b).

C. Evaluation de succès

Quelles méthodes pour le suivi et l'évaluation des opérations de restauration écologique ?

Une fois la restauration terminée, il reste encore une étape primordiale pour l'évaluation du succès : le suivi (Andersen, 2008; Hobbs and Harris, 2001). Différentes stratégies permettent l'évaluation de la réussite d'une restauration :

- L'atteinte des objectifs peut être quantifiée par rapport aux attributs spécifiques de sites de référence (Hobbs and Norton, 1996);
- l'analyse de la trajectoire se base sur des indicateurs relevés périodiquement sur le site restauré et permet de vérifier la bonne trajectoire du site, dans la direction de la référence. Dans tous les cas, un « **bon** » indicateur répond à plusieurs critères. Il doit être facile à mesurer et relativement peu coûteux, ne pas présenter de difficultés taxonomiques ou de difficultés de mesures, être sensible aux mesures de restauration, *i.e.* possibilité d'être inclus directement dans les hypothèses à tester (Keddy et al., 1998). La facilité et le faible coût d'échantillonnage sont particulièrement importants dans les projets de suivi à long terme. En effet, bien que des budgets parfois importants soient alloués à la restauration écologique, ceux-ci concernent bien souvent des projets à durée restreinte. Les budgets attribués aux suivis, quant à eux, sont généralement peu conséquents, voire totalement inexistantes.

I.5 Restauration écologique du compartiment sol

Depuis quelques années diverses expériences de restauration ont été effectuées dans plusieurs pays. On sait aujourd'hui que les sols agricoles sont parmi les premiers écosystèmes à être détériorés, et donc par conséquent ils étaient les premiers à avoir subi des travaux de restauration. Depuis plusieurs siècles, l'homme a cherché à protéger, améliorer et même restaurer la qualité des sols agricole en agissant sur leur utilisation et

leur aménagement ; apport de matière organique (pour améliorer la structure de sol) (Parr et al., 1992), chaulage (pour augmenter le pH des sols acides) (Wong, 2003), et tillage (effet sur la stabilité et la qualité des sols) (Lal, 1993). Donc ces travaux apparaissent comme étant le déclencheur des travaux de restauration de comportement sol dans d'autres écosystèmes.

Les sites des anciennes mines ont eux aussi subi des travaux de restauration. Plusieurs approches techniques ont été utilisées au cours de ces projets de restauration ; remise en place du sol de surface (pour végétaliser les mines présentant une toxicité élevée) (Barnhisel and Hower, 1997), utilisation des plantes comme alternative au sol de couverture (exemple les légumineuses nodulées fixatrices d'azotes; *Acacia*) (Moiroud et al., 1991), revégétalisation des sites des anciennes mines (Izquierdo et al., 2005), chaulage (Wong, 2003), et décompaction du sol (par labour de sol qui permettra la pénétration racinaire et l'infiltration de l'eau) (Barnhisel and Hower, 1997).

On connaît aujourd'hui, que la dégradation des zones humides peut avoir des conséquences sur la qualité d'eau (eutrophisation par excès d'N et de P). Devant la nécessité de réagir face à la destruction cumulée, un nombre important de projets de restauration ou plutôt de construction de zones humides (constructed/created wetland) a été mis en place. Donc le principal objectif de zones humides construites n'est pas réellement la restauration écologique d'un écosystème (habitat) mais plutôt la restauration d'une fonction (par exemple épuration d'eau vis-à-vis de l'N) (Kovacic et al., 2006). Plusieurs approches techniques ont été au cours de ces projets : reconnexion (Mitsch and Day Jr, 2006), inondation avec des marées artificielles (O'Geen et al., 2010) plantation (plantes de phyto-épuration) (Gagnon et al., 2012; Vymazal, 2011).

Plusieurs études de restauration écologique ont été réalisées sur des zones humides, mais peu d'études s'intéressent au compartiment sol. Donc, cette étude vise à apporter des connaissances fondamentales, potentiellement transférables pour des applications de restauration du compartiment sol.

II. Sites d'études

Ce travail s'inscrit dans le cadre des actions du Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval (GIP Seine-Aval ou GIPSA) relatives à la restauration des paysages de la Basse Vallée de Seine et à la reconquête de l'estuaire. Il a été réalisé à la fois (1), pour la partie consacrée aux marais alluvionnaires, dans le cadre du **projet Yville** (*Suivis écologiques*

du réaménagement de la ballastière d'Yville-sur-Seine) financé par le GPMR (convention avec l'Université de Rouen) et du **projet RESSOLV** (*REStauratiOn des Sédiments et des SOLs Vulnérables*) financé par la région Haute-Normandie via le Grand Réseau de Recherches en Sciences de l'Environnement et des Risques (GRR SER - réseau SCALE) et (2), pour la partie consacrée aux écosystèmes rivulaires, du **projet REBEBAS** (*RestauratiOn Ecologique des BERges de la BASse Vallée de Seine*) financé par le GIPSA. Nous avons étudié le fonctionnement des sols dans un marais alluvionnaires et des écotones rivulaires de 2 secteurs (**intermédiaire** et **amont**) de la Seine.

II.1 Choix des sites d'étude

A. Marais alluvionnaire (Projets **Yville** et **RESSOLV**)

Le premier site d'étude est localisé sur une carrière d'extraction de granulats à Yville-sur-Seine (boucle d'Anneville - Ambourville) exploitée par les Carrières et Ballastières de Normandie (CBN) et dans laquelle le Grand Port Maritime de Rouen mène une expérimentation de comblement d'une ballastière à l'aide de sédiments de dragage. Ce site constitue un exemple de restauration écologique de prairie humide sur sol tourbeux reconstitué (Normandie, France). Il s'agit plus précisément d'une expérience de réaffectation puisque cette ballastière (point d'eau) est transformée en autre système (un sol reconstitué). Cette ballastière a été comblée par voie hydraulique avec du matériel tourbeux sur 70 cm d'épaisseur déposé sur ~7 m de sédiments de dragage (matériel sédimentaire vaseux limono-argileux à sablo-limoneux). Le comblement de la ballastière a été réalisé grâce à la mise en œuvre de moyens techniques spécifiques et a nécessité une adaptation des équipements et des techniques traditionnellement utilisés pour les chambres de dépôt. Il a fallu, entre autres, remplacer l'engin de dragage mécanique (drague à godets) associé à des chalands porteurs (qui assurent le transfert des sédiments vers les chambres de dépôt), et un engin nautique de refoulement hydraulique qui permet, via une conduite, de rejoindre la chambre disposée en bord de fleuve par une drague aspiratrice en marche auto porteuse et une conduite hydraulique entre la drague et le site de l'expérimentation.

Il a aussi fallu dimensionner correctement les dispositifs de pompage et de transport des sédiments. Les sédiments ont été transportés sous forme d'une mixture constituée d'environ 90% d'eau, l'excédent d'eau étant restitué à la Seine via des pompes. Avant le refoulement, le plan d'eau était mis en dépression par rapport à la nappe environnante

pour éviter les risques de transferts éventuels vers la nappe (Samson et al., 2002b). Les refoulements de sédiments dans la ballastière ont été initiés au printemps 2000 et se sont terminés en 2007 (**Fig. 1.8**).

Depuis le début de l'opération, environ 564000 tonnes de matière sèche de sédiments ont été refoulées de 2000 à 2007 à raison de deux campagnes (printemps et automne) par an, sauf pour 2002 où aucun refoulement dans la ballastière n'a eu lieu. De plus, des apports de sables ont été effectués au niveau de la prairie à restaurer pour améliorer la portance de leurs sols. Les relevés bathymétriques annuels ont permis la dynamique de déposition des sédiments dans la ballastière. Ils couvrent la totalité des fonds de la ballastière. La zone sud (prairie à restaurer) est hors d'eau, les isobathes augmentent progressivement (jusqu'à 5 m) vers la direction nord-ouest de la ballastière (roselière et plan d'eau permanente). Le suivi piézométrique a montré que le niveau d'eau de la ballastière suivait celui de la nappe. Le niveau de la nappe varie de façon saisonnière, il a tendance à baisser sur la période 2000-2005 mais semble remonter en 2006.

B. Les écosystèmes rivulaires (Projet REBEBAS)

Tous les sites d'étude se situent sur 2 des 3 secteurs de l'estuaire à savoir : **secteur intermédiaire** qui s'étend du pont de Tancarville à Rouen soumis au passage des navires à fort tirant d'eau et le **secteur amont** qui s'étend de Rouen au barrage de Poses subissant le passage des barges et péniches (**Fig. 1.9**). A l'intérieur de ces deux secteurs 7 sites choisis parmi les 10 retenus par le groupe de travail "reconquête et restauration environnementale" du GIP Seine Aval. L'approche typologique est basée sur le total de ces 7 sites (**Tableau 1.3**) représentatifs des écotones rivulaires parmi lesquels 4 sites "pilotes" ont été sélectionnés pour réaliser l'approche fonctionnelle des écosystèmes rivulaires. L'ensemble des sites se positionne sur un gradient de connectivité allant d'une connexion directe par débordement du fleuve à une absence totale de connexion que ce soit par le fleuve ou la nappe alluviale (**Fig. 1.9 et Tableau 1.5**).

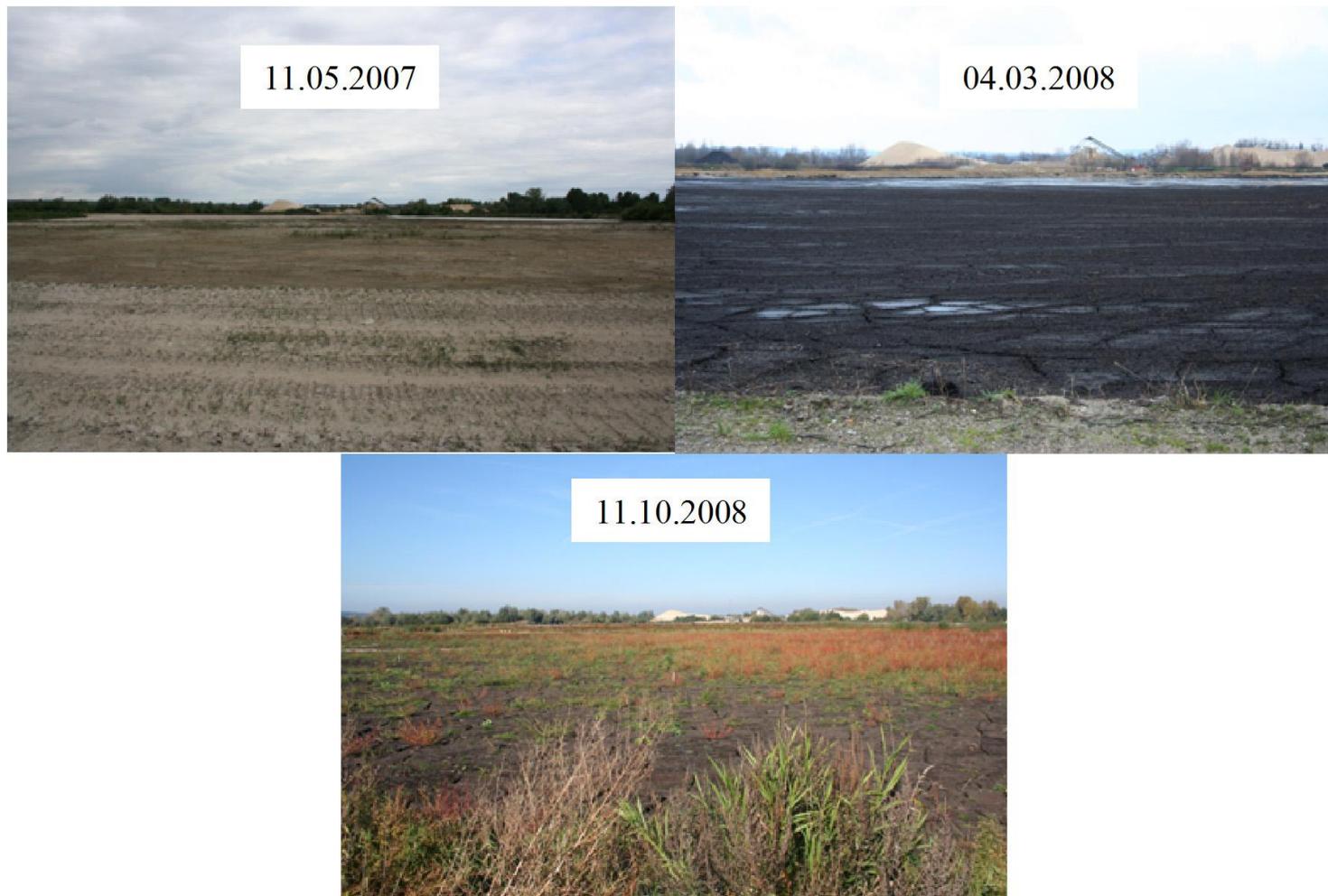


Figure 1.8. Les étapes du comblement de la ballastière à Yville sur Seine.

Zones directement connectées

- **Petiville (PK : 323-328)** – *Sédiment nu (vase) ; Roselière à Phragmites ; une saulaie ; une peupleraie ; une prairie humide*

Ce site est situé sur les berges du fleuve, dans la commune de **Petiville**, et s'apparente à un système alluvial « naturel » car il est positionné entre le fleuve et la digue. Il est donc influencé par la dynamique fluviale à la fois par des inondations, par le battement de la nappe et par des processus d'érosion et/ou de sédimentation. Il constitue, de ce fait, un écotone rivulaire de référence. Il est constitué de cinq ceintures de végétation : une vasière régulièrement recouverte par le fleuve au rythme des battements des marées, une roselière à Phragmites, une zone à Saules proches du fleuve qui sont fréquemment inondée, une peupleraie plantée, qui précède une digue de terre, et une prairie humide.

- **Bardouville (PK : 267-270)** – *Sédiment nu (vase) ; Roselière à Phalaris ; Saulaie*

Le site de Bardouville est directement connecté au fleuve, mais se caractérise par des sédiments majoritairement sableux. Il est constitué d'un long linéaire de berges semi-naturelles. C'est une plage sablo-graveleuses à pente douce avec une forêt alluviale et des microfalaises d'érosion. Deux anciennes chambres de dépôt sont présentes sur ce site. Bien que son fonctionnement soit tout à fait naturel, c'est un site un peu particulier par rapport aux autres puisque dépourvu de sol au sens pédologique du terme. Trois ceintures végétales sont échantillonnées : les sédiments nus, une zone à Phalaris et une zone à Saules.

- **Bras mort de Saint-Étienne-du-Rouvray (PK : 233,5)** – *Sédiment nu (vase) ; Saulaie à Impatiens ; Saulaie à Ficaire*

Ce bras mort est scindé en deux par un remblai. Il est bordé d'un système continu composé d'un bois alluvial, de roselières et d'une vasière. La zone humide et le bois alluvial situés en arrière du remblai semblent encore partiellement connectés à la Seine par une buse. Trois zones de prospection sont distinguées : une vasière, une saulaie à Impatiens et une saulaie à Ficaire.

- **Iles du Bras-Fallais (PK : 234)** – *Roselière à Phragmites ; Saulaie ; Frênaie ; Forêt alluviale mixte*

Ce site est connecté au fleuve et présente sur sa face ouest un réseau de vasières,

roselières et bois alluviaux relativement bien développés, assez représentatifs de paysages estuariens, mais devenu assez rare à l'échelle de l'estuaire. Les berges sont en pentes très abruptes sur le flanc Est, empêchant le développement de roselières. Cinq ceintures végétales directement connectées sont prospectées : deux roselières à Phragmites (jeune et vieille), une saulaie, une frênaie et une forêt alluviale mixte.

Zones périodiquement connectées

- **Grande vase/Petite Vase (PK : 267)** – *Plan d'eau artificiel connecté*

Ce site correspond à une ancienne chambre de dépôt du Grand Port Maritime de Rouen. Sur la partie aval de ce site, les berges ne sont pas endiguées. Il est ouvert sur la Seine *via* un passage d'eau régulièrement inondé et constitue aujourd'hui une zone humide ponctuellement connectée.

Zones indirectement connectées

- **Trou Buquet (PK : 285,5)**

Ce site est essentiellement constitué d'un bois alluvial de type saulaie artificiellement déconnectée du fleuve par une digue non bétonnée. Ce positionnement fait que, en théorie, il ne subit plus les processus d'érosion et/ou de sédimentation mais il reste relié à la dynamique fluviale par le battement de la nappe. Cependant il semblerait que de l'eau venue du fleuve réussisse à passer la digue, probablement lors des épisodes de crues les plus importants ou par un système de «buse» dont les clapets sont défailants. Malgré tout, ce site est considéré comme coupé du fleuve et constitue, par opposition à celui de Petiville, un écotone rivulaire « perturbé ».

- **Trou Deshayes (PK : 281)** – *Sédiment nu (vase) ; Roselière à Phalaris ; Roselière fauchée*

Ce site est localisé dans la commune d'Anneville-Ambourville, sur la rive gauche. Il est caractérisé par le même type d'aménagement que le site du trou Buquet : il est séparé du fleuve par une digue dans laquelle sont insérés des drains à clapets permettant l'évacuation des eaux vers le fleuve et empêchant les flux inverses. Les trois ceintures végétales indirectement connectées et prospectées sont : une vasière, une roselière à Phalaris et une roselière fauchée.

Zones déconnectées

- **Trou Deshayes (PK : 281)** - *Prairie exondée sous peupliers*

Bien que le site soit indirectement connecté au fleuve *via* la nappe alluviale comme vu précédemment, une prairie exondée jamais atteinte par les eaux, et de ce fait complètement déconnectée, est prospectée.

- **Ile du Bras-Fallais (PK : 234)** – *Prairie fauchée*

Sur ce site, une prairie fauchée située au centre de l'île est échantillonnée. Cette prairie n'est jamais inondée et donc complètement déconnectée du fleuve.

- **Grande vase/Petite Vase (PK : 267)** – *Forêt mixte à dominante de Saules sur chambre de dépôt*

Cette zone correspond à une forêt mixte exondée déconnectée car jamais atteinte par les eaux du fait de l'exhaussement créé par le dépôt des sédiments de dragage dans la chambre de dépôts.

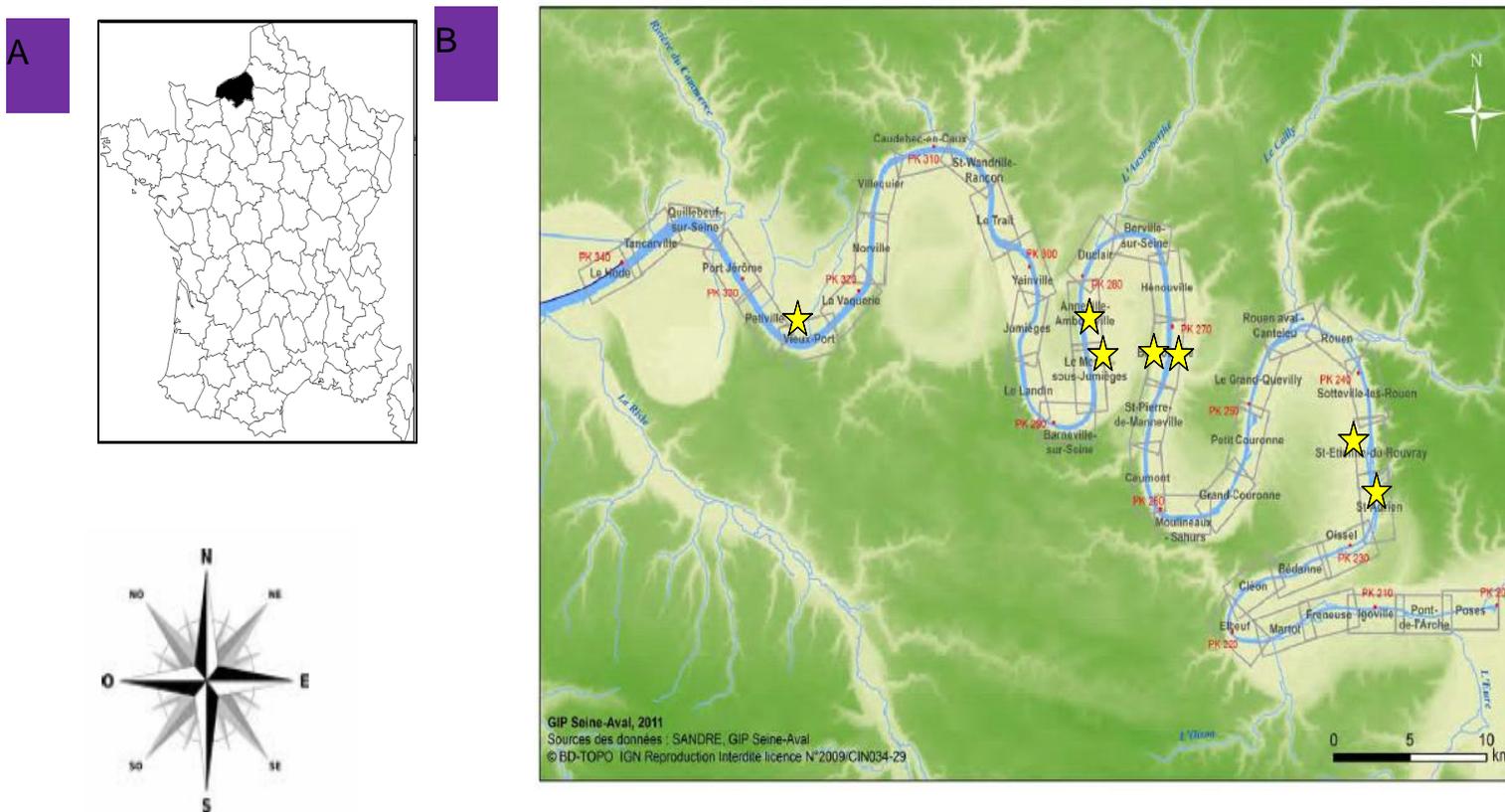


Figure 1.9. Localisation géographique de la Haute-Normandie (A), et méandres de la Seine de Poses à Tancarville et les sites d'étude retenus sont identifiés par une étoile jaune (B).

Tableau 1.5. Sites d'étude.

Site	n° selon inventaire GIP Seine-Aval	Point kilométrique	Commune	Rive	Domanialité/Propriétaire	Gestionnaire	Gestionnaire des berges
Les Ecores de Petiville	27	323-328	PETIVILLE	Droite	Domaine de l'État, terrains privés et Domaine Public Fluvial	Grand Port Maritime de Rouen pour les terrains de l'État, la partie fluviale et la majorité des berges, Conseil Général 76 pour l'extrémité amont des berges, acteurs privés	Grand Port Maritime de Rouen, Conseil Général de Seine- Maritime
Trou Buquet	1	285,5	YVILLE-SUR-SEINE	Gauche	Domaine de l'État	Grand Port Maritime de Rouen	Conseil Général de Seine-Maritime
Trou Deshayes	80	281	ANNEVILLE- AMBOURVILLE	Gauche	Acteurs privés	Grand Port Maritime de Rouen (à confirmer)	Grand Port Maritime de Rouen
Grande Vase - Petite Vase	44	267	QUEVILLON	Droite	Grand Port Maritime de Rouen	Grand Port Maritime de Rouen	Grand Port Maritime de Rouen
Berges de Bardouville	43	267-270	BARDOUVILLE	Gauche	Domaine de l'État et acteurs privés	Grand Port Maritime de Rouen, acteurs privés et communaux	Grand Port Maritime de Rouen (pour la majorité des berges), Conseil Général 76 (berges au droit de l'île aux peuples et au sud du site)
Bras mort de St Etienne du Rouvray	65	233,5	SAINT-ETIENNE-DU- ROUVRAY	Gauche	Domaine Public Fluvial	Voies Navigables de France	Voies Navigables de France
Ile du Bras-Fallais	47	234	GOUY, TOURVILLE- LA-RIVIERE	Ile	Domaine Privé de l'État, acteurs privés	Voies Navigables de France, acteurs privés	Voies Navigables de France

- PARTIE 1 -

Etude des possibilités de restauration du compartiment sol par modification du régime de perturbations et de contraintes liées aux crues : cas des écosystèmes rivulaires des secteurs intermédiaire et amont de l'estuaire de Seine.

Les **écosystèmes rivulaires**, constitués par l'ensemble des écosystèmes des berges des fleuves, sont des milieux-clés qui déterminent deux fonctionnalités écologiques essentielles, la fonction d'écotone et la fonction de connexion. En effet, les écosystèmes rivulaires des berges naturelles localisés, par définition, entre les milieux aquatiques du chenal et les milieux terrestres de la plaine d'inondation sont un lieu d'échanges de matière et d'organismes portés par les flux d'eau allant du chenal vers la plaine et inversement (dimension transversale). A ce titre, ces écosystèmes sont reconnus pour posséder un ensemble de caractéristiques et le fonctionnement écologique des zones dites de transition entre écosystèmes adjacents. Par ailleurs, les écosystèmes rivulaires en conditions naturelles sont en continuité le long des berges (dimension longitudinale) et permettent ainsi la dispersion des semences et les déplacements d'organismes (corridors fluviaux au sens de Forman et Godron).

Dans le cas de la **Basse Vallée de Seine**, l'estuaire a fait l'objet d'aménagements lourds pour autoriser la navigation de bateau à fort tirant d'eau jusqu'à Rouen (chenalisation, endiguements, dragage) impactant le fonctionnement des écosystèmes rivulaires en les déconnectant souvent du fleuve. Dans ce contexte, le projet **REBEBAS** (**R**estauration **E**cologique des **B**erges de la **B**asse Vallée de **S**eine), financé par le **GIP-Seine Aval**, avait pour objectif général de déterminer si l'état actuel des berges anthropisées de la basse vallée de Seine nécessite et autorise, la restauration d'un état et d'un fonctionnement considérés comme écologiquement acceptables pour un écotone rivulaire. En effet, compte tenu du degré d'anthropisation de la basse vallée de Seine, le projet REBEBAS posait l'hypothèse que l'état écologique des écosystèmes rivulaires étant fortement dégradé, les fonctionnalités liées à leur statut d'écotone ne pouvaient exister et se maintenir que localement sur des sites toujours en liaison avec le fleuve.

La première partie de ce travail de thèse s'inscrit précisément dans le cadre du projet REBEBAS et s'intéresse plus particulièrement aux **possibilités de restauration écologique**

du compartiment sol des écosystèmes rivulaires dans un estuaire fortement anthropisé. Cette partie comporte deux objectifs :

- **Objectif 1 : diagnostiquer l'état actuel (morphologie et fonctionnement)** des sols des écosystèmes rivulaires de la basse vallée de la Seine **en fonction de leur degré de connectivité au fleuve** (chapitre 2) ;
- **Objectif 2 : suivre leurs potentialités en terme de capacités épuratrices** vis-à-vis de l'azote **lors d'expérimentations en microcosmes visant à simuler un régime de perturbation et de contraintes liés aux crues** (chapitre 3 et 4).

A ces objectifs correspondent respectivement les hypothèses suivantes :

- **Hypothèse 1** : Compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, l'état des sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale est fortement dégradé et, corrélativement, certaines de leurs fonctions écologiques (régulation du cycle de l'azote et stockage de carbone) sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve.
- **Hypothèse 2** : La meilleure possibilité de restaurer les fonctions écologiques portées par le compartiment sol serait de ramener un régime de perturbation et de contraintes liée aux variations de niveau d'eau en cohérence avec le régime hydrologique typique d'un estuaire intertidale.

Le deuxième chapitre se propose donc de diagnostiquer l'état actuel du sol des écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine afin de voir si ces sols remplissent actuellement certaines de leurs fonctions spécifiques (stockage de C, épuration de l'N). L'état actuel du sol est appréhendé en combinant une approche descriptive (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) avec une approche fonctionnelle des sols (mesures *in situ* et tests en conditions contrôlées au laboratoire) sur des sols représentatifs d'un degré de connectivité au fleuve des écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de la Seine. Ces mesures *in situ* et *ex situ* sont relatives à la respiration du sol, à la minéralisation du C et de l'N et à la dénitrification. Elles permettent de mesurer le niveau réel et potentiel des fonctions écologiques prospectées.

Aucun cas de restauration *in situ* du compartiment sol n'ayant encore été réalisé dans les écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine, nous avons choisis de simuler expérimentalement l'effet des variations de niveau d'eau liées au régime d'inondations dans les chapitres 3 et 4. Le chapitre 3 vise plus spécifiquement à tester expérimentalement l'effet

d'une durée d'inondation constante attribuable aux crues du fleuve (perturbations) *versus* les variations journalières de niveau d'eau liées aux marées (contraintes) sur la fonction épuratrice vis-à-vis de l'azote des sols d'écosystèmes rivulaires en connexion directe avec la Seine. Le chapitre 4 cherche à tester expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation constante sur la même fonction épuratrice et sur les communautés bactériennes (dénitrifiantes et sulfato-réductrices) de sols représentatifs d'un gradient de connexion au fleuve. Ce gradient allant des sols directement connectés aux sols déconnectés en passant par des sols connectés indirectement par la nappe devrait permettre d'apporter des éléments de connaissance pour de futurs travaux de restauration *in situ* visant à ramener un régime de perturbations et de contraintes liées aux crues dans les écosystèmes rivulaires.

Chapitre 2

Influence du degré de connectivité au fleuve sur le fonctionnement des sols rivulaires de l'estuaire de Seine : incidences sur les possibilités de restauration des fonctions écologiques associées à ces sols.

C. Mchergui¹, E. Langlois¹, M. Aubert¹, L. Henneron¹, M. Akpa-Vinceslas¹, B.
Buatois², F. Bureau¹.

¹ Laboratoire ECODIV, EA1293, Université de Rouen, IRESE A, place Emile Blondel, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex.

² CEFE 1919, route de Mende, sur le campus du CNRS, 34293 Montpellier 5.



Zonation de la végétation sur le site « *Les Ecores de Petiville* » révélatrice de la connexion directe au fleuve (Photo: E. Langlois, 15/07/2009)

Introduction

Les **écosystèmes rivulaires** sont considérés comme des **écotones** car ils forment une transition entre les environnements aquatiques et terrestres (Curie 2006; Mitsch and Gosselink 2000; Pinay *et al* 1995). Ces écosystèmes jouent un rôle essentiel en tant qu'habitat nécessaire au maintien de nombreuses espèces végétales et animales (Hohensinner *et al* 2007; Trémolières and Schnitzler 2007), lieu de forte production primaire (Mitsch and Gosselink 2000; Mitsch and Gosselink 2007; Piégay *et al* 2003), ils interviennent également comme des systèmes régulateurs des régimes hydrologiques (Amoros and Bornette 2002; Amoros and Petts 1993). Ils contribuent également à l'amélioration de la qualité des eaux par la régulation des pollutions diffuses (Anbumozhi *et al* 2005) et leur capacité à épurer les eaux (Anbumozhi *et al* 2005; Groffman *et al* 1992; Mitsch and Gosselink 2000; Pinay and Tremolieres 2000). On sait aujourd'hui que la connectivité hydrologique, traduite par les échanges entre le fleuve et sa plaine d'inondation jouent un rôle majeur dans le fonctionnement naturel des écosystèmes alluviaux (Piégay *et al* 2003; Pinay *et al* 2007; Trémolières and Schnitzler 2007). Les écosystèmes rivulaires sont caractérisés par le lien qu'ils entretiennent avec le régime hydrologique (régimes de crues et fluctuations de la nappe alluviale) et l'hydrodynamisme du fleuve (processus d'érosion et/ou de sédimentation) (Hohensinner *et al* 2007).

Dans ces écosystèmes, la morphologie et le fonctionnement des sols sont donc liés, en partie ou totalement, à un engorgement en eau plus ou moins long. Leurs caractéristiques morphologiques sont donc sous la dépendance de la profondeur de la nappe, de l'amplitude et de la périodicité de ses battements qui conditionnent l'intensité des processus d'oxydo-réduction. Selon Guenat *et al* (2003), deux types de sols peuvent être caractéristiques de ces écosystèmes rivulaires : les FLUVIOSOLS (sols alluviaux) et les REDUCTISOLS (sols minéraux à caractère hydromorphes). Les FLUVIOSOLS sont issus de l'altération d'alluvions fluviales. Ils sont caractérisés par une nappe circulante bien pourvue en oxygène dissous et à fortes oscillations, qui n'a donc pas une incidence marquée sur leur morphologie. Les REDUCTISOLS ont des caractéristiques d'avantage marquées par un excès d'eau plus ou moins permanent. Dans ce cas, le déficit en oxygène est à l'origine du processus d'oxydo-réduction. Ce mécanisme se traduit par une redistribution des éléments dans le sol et notamment une mobilisation/redistribution du fer. Les REDUCTISOLS présentent ainsi des traits d'hydromorphie rédoxiques ou réductiques débutant à moins de 50 cm de la surface du

sol. Ils subissent des fluctuations de nappe et sont caractérisés par la présence d'horizons marqués par la redistribution du fer : rédoxique Go (zone de battement de la nappe où le fer est réoxydé et donne naissance à des tâches rouille) et réductique Gr (zone constamment engorgée où le fer est sous sa forme réduite et donne une coloration gris-bleue au sol) et parfois par un épisolum humifère épais et foncé.

Les sols des écosystèmes rivulaires assurent de nombreuses fonctions écologiques telles que le stockage du C (Coletti *et al* 2013; Guo *et al* 2009) et l'épuration de l'eau (N) (Curie 2006; Fustec and Thibert 1996; Groffman *et al* 1992; Pinay *et al* 2007; Pinay *et al* 1995). Ces fonctions sont rendues possibles par leur régime d'engorgement en eau temporaire ou permanent. Elles sont plus précisément liées à l'importance relative du processus de minéralisation *versus* celui de l'humification de la matière organique (stockage de C) (Andersen *et al* 2006; Coletti *et al* 2013; Hopkinson *et al* 2012; Mitsch and Gosselink 2007) et du processus de dénitrification (épuration de l'eau) qui ont lieu dans ces sols et sont fortement dépendants des conditions hydriques du sol (Chiu *et al* 2004; Hernandez and Mitsch 2007; Matheson *et al* 2002).

L'exploitation et la vocation industrialo-portuaire de l'estuaire de Seine ont largement altéré les fonctions hydrologiques et écologiques de ce territoire qui, peu à peu, a perdu de son potentiel de réacteur chimique et de sa productivité biologique (Guézennec, 1999). Les aménagements lourds menés, depuis le milieu du 19^{ème} siècle, sur l'estuaire de la Seine ont ainsi impacté les écosystèmes rivulaires en les déconnectant du fleuve (Alard 2002; Chabrierie *et al* 2001; Guézennec 1999). Dans un tel contexte, on peut se demander si l'état actuel des berges anthropisées de l'estuaire de Seine nécessite et autorise, la restauration d'un état et d'un fonctionnement considérés comme écologiquement acceptables pour des écotones rivulaires. L'objectif de cette partie est (1) **de diagnostiquer l'état actuel du compartiment sol des écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine** et (2) **de déterminer si ces sols remplissent actuellement leurs fonctions écologiques (régulation du cycle du C et épuration de l'N)**. Pour répondre à ces objectifs, l'état actuel du sol est appréhendé en combinant une approche descriptive (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) et une approche fonctionnelle des sols (des mesures *in situ* combinées à des tests en conditions contrôlées au laboratoire *ex situ*). Ces deux approches sont réalisées sur un échantillon de sols représentatif d'un gradient de connectivité au fleuve allant des sols directement connectés aux sols déconnectés en passant

par des sols connectés indirectement par la nappe. Compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, on pose l'hypothèse que les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale sont fortement dégradés et, corrélativement, que les fonctions écologiques prospectées sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve.

I. Matériel et méthodes

I.1 Sites d'étude

Le projet se focalise sur 2 des 3 secteurs de l'estuaire à savoir : le **secteur intermédiaire** qui s'étend du pont de Tancarville à Rouen soumis au passage des navires à fort tirant d'eau et le **secteur amont** qui s'étend de Rouen au barrage de Poses subissant le passage des barges et péniches (Fig. 2.1). A l'intérieur de ces deux secteurs, l'approche descriptive (morphologie des sols) est basée sur un total de **7 sites représentatifs** de l'état de connexion au fleuve des écotones rivulaires (correspondant à 23 zones d'échantillonnage au total) parmi lesquels **4 sites "pilotes"** ont été sélectionnée pour réaliser l'approche fonctionnelle des écosystèmes rivulaires (correspondant à 12 zones d'échantillonnage). Le choix des 7 sites s'est effectué le long d'un gradient de connectivité avec le fleuve (Fig. 2.2). Par comparaison à un site encore connecté directement au fleuve, certains sites ont subi des aménagements modifiant leurs régimes d'inondations (les crues *versus* les marées ou aussi perturbations *versus* contraintes).

- **Sites directement connectés au fleuve (DC)**

Le premier site est le site dit « **Les Ecores de Petiville** » (PK: 323-328), situé sur les berges du fleuve, dans la commune de « **Petiville** ». Il s'apparente à une zone riveraine « naturelle » car il est positionné entre le fleuve et la digue. Il est donc influencé à la fois par des inondations régulières, par le battement de la nappe et par des processus d'érosion et/ou de sédimentation ; il constitue, de ce fait, un **écotone rivulaire de référence pour ce travail** de thèse. Cinq zones en fonction du type de formations végétales sont distinguées et correspondent aux 5 zones échantillonnées pour les sols : une vasière régulièrement recouverte par fleuve au rythme des battements des marées, une roselière à phragmites, une zone à Saules proches du fleuve qui est fréquemment inondée, une prairie humide inondable et une peupleraie plus éloignée du cours qui précède la digue de terre.

Le second site est le site de **Bardouville (PK : 267-270)** qui est directement connecté au fleuve, mais se caractérise par des sédiments majoritairement sableux. Il est constitué d'un long linéaire de berges semi-naturelles. C'est un écotone rivulaire sablo-graveleuses à pente douce avec un bois alluvial et des microfalaises d'érosion. Deux anciennes chambres de dépôt de sédiments de dragage sont présentes sur ce site. Les sols ont été échantillonnés dans trois zones en fonction du type de formations végétales qui traduit le gradient hydrique : les sédiments nus, une zone à Phalaris et une zone à Saules.

Le troisième site est le site de **Bras mort de Saint-Etienne-Du-Rouvray (PK : 233.5)** divisé en deux parties par un remblai. La zone humide et le bois alluvial situés en arrière du remblai semblent encore partiellement connectés à la Seine par une buse. Les sols ont été échantillonnés dans trois zones : une vasière, une Saulaie à impatiens et une Saulaie à Ficaies.

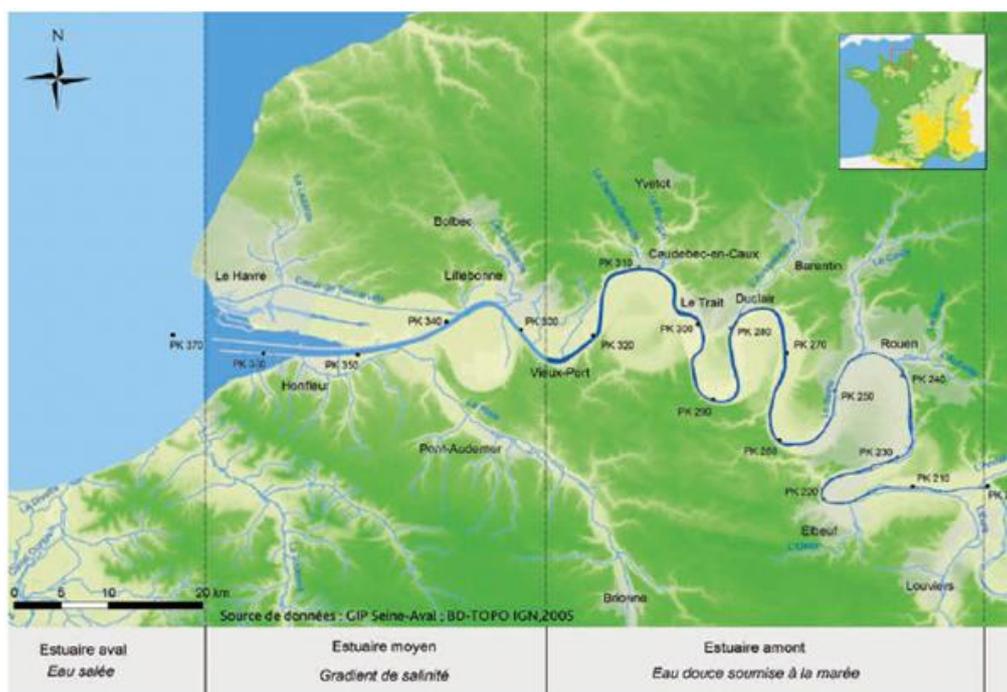


Figure 2.1. Zonation de l'estuaire de Seine (Guézennec, 1999).

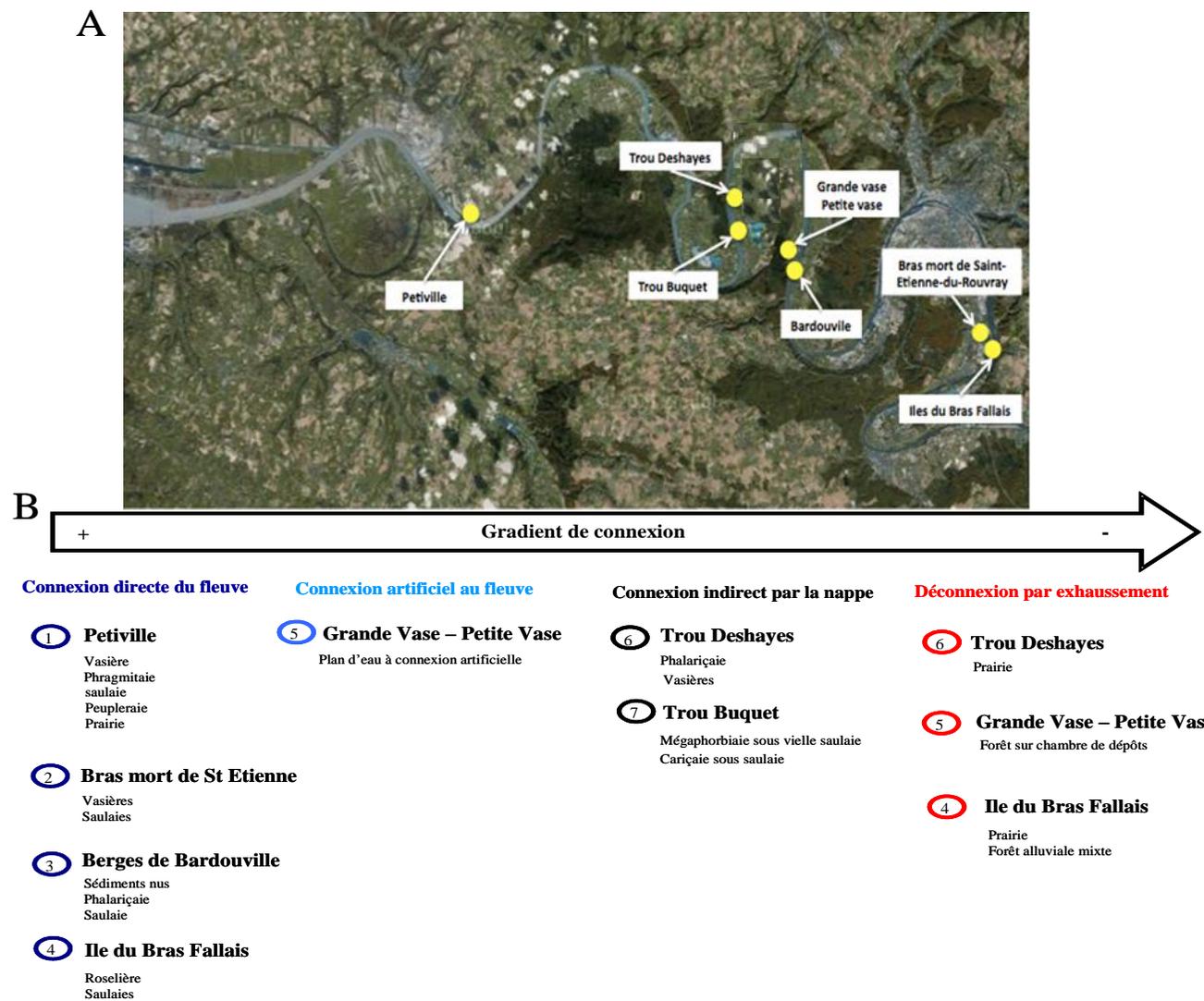


Figure 2.2. (A) Position des 7 sites d'étude au sein de l'estuaire de Seine (B) et schéma reconstituant le gradient de connectivité au fleuve de l'ensemble des 7 sites prospectés (source : E. Langlois, figure tirée du rapport final du projet REBEBAS, 2012).

Le quatrième site correspond à l'île du Bras Fallais (PK : 234) qui correspond, historiquement, à la réunion de deux îles. Son intérêt est qu'elle présente sur sa partie ouest une vasière, une roselière et des bois alluviaux relativement bien développés, représentatifs de paysages alluviaux devenus assez rare à l'échelle de l'estuaire. Les berges sont en pentes très abruptes sur le flanc Est de l'île, empêchant le développement de roselières. Les sols ont été échantillonnés dans 2 zones d'échantillonnages directement connectées au fleuve : les roselières à Phragmites et une saulaie située dans une dépression atteignables par les hautes eaux de la Seine (dépression correspondant à la zone située entre les deux anciennes îles).

- **Site connecté artificiellement au fleuve par une buse**

Il s'agit du site dit « Grande Vase/Petite Vase » (PK : 267) qui est un plan d'eau artificiel connecté. Ce site correspond à une ancienne chambre de dépôt du Grand Port Maritime de Rouen. Sur la partie aval de ce site, les berges ne sont pas endiguées. Il est ouvert sur la Seine *via* un passage d'eau régulièrement inondé et constitue aujourd'hui une zone humide ponctuellement et artificiellement connectée via une buse.

- **Zones indirectement connectées au fleuve (IC)**

Le premier site est le site dit « Trou Deshayes » (PK : 281) qui est constitué d'un ancien trou de Seine indirectement connecté car il est séparé du fleuve par une digue et subit seulement l'influence des battements de la nappe alluviale. L'eau d'écoulement provenant de la plaine alluviale est également évacuée vers le fleuve au moyen de drains à clapet empêchant tout refoulement de l'eau du fleuve. Les sols ont été échantillonnés dans trois zones représentatif du gradient topographique présent dans ce site : une vasière (topographiquement la plus basse), une roselière à Phalaris et une roselière fauchée (topographiquement légèrement plus haute que la roselière non fauchée).

Le second site est le site de « Trou Buquet » (PK : 285.5) qui est essentiellement constitué d'un bois alluvial de type saulaie artificiellement déconnecté du fleuve par une digue non bétonnée qui se situe dans la commune d'Yville-sur-Seine. Ce positionnement fait qu'il ne subit plus de processus d'érosion et/ou de sédimentation mais qu'il reste relié à la dynamique fluviale par le battement de la nappe. La digue est suffisamment haute pour éviter tous débordement du fleuve. Toutefois, deux épisodes exceptionnels de forts coefficients de marées associés à une forte houle se sont produits au cours de l'hiver 2010 et ont entraîné un

débordement du fleuve par-dessus la digue. Malgré tout, ce site est considéré comme coupé du fleuve et constitue, par opposition à celui de Petiville, un écotone rivulaire « perturbé ». Les sols ont été échantillonnés dans deux zones : une mégaphorbiaie sous saulaie et une cariçaie.

- **Zones déconnectées du fleuve (NC)**

Le premier site est le site dit « **Trou Deshaye** » (**PK : 281**) qui se situe dans la commune d'Yville-sur-Seine. Bien que le site soit indirectement connecté au fleuve via la nappe alluviale comme vu précédemment, une prairie exondée jamais atteinte par les eaux, et de ce fait complètement déconnectée, est étudiée. Le sol a été échantillonné dans une prairie dite exondée car topographiquement nettement plus haute que la vasière et les roselières à Phalaris. Le second site est le site de l'« **Ile Du Bras-Fallais** » (**PK : 234**) qui comprend une prairie fauchée située au centre de l'île et une forêt alluviale mixte dans la partie sud. Cette prairie et la forêt alluviale se positionnent en position topographique haute et sont donc exondées. Elles sont, à ce titre, déconnectées du fleuve.

Le troisième site est le site de « **Grande Vase/Petite Vase** » (**PK : 267**). Bien que le site soit artificiellement connecté au fleuve comme vu précédemment, une forêt mixte caractérise les chambres de dépôts les plus exondées jamais atteintes par les eaux. À la différence de la partie aval de ce site, les berges de la partie plus en amont sont endiguées et séparent la Seine de la zone remblayée à l'aide des sédiments de dragage et reboisée. Le sol a été échantillonné dans un boisement mixte à dominante de saules sur chambre de dépôt.

I.2 Morphologie des sols

L'approche descriptive vise à caractériser la morphologie des sols des 7 sites représentatifs sélectionnés (Fig. 2.2) : description des horizons constitutifs des profils de sol des 23 zones d'échantillonnage et de leurs propriétés physico-chimiques respectives. Cette approche permet d'appréhender la diversité des types de sol rencontrés sur la base des descripteurs morphologiques et physico-chimiques courants.

I.2.1/ Descriptions morphologiques et prélèvements des sols

Dans chacune des formations végétales identifiées sur les 7 sites sélectionnés, une description morphologique des sols est réalisée à l'aide de sondages à la tarière (tarière de type Edelman, 6 cm de diamètre). En pratique, 3 à 5 sondages à la tarière minimum sont

réalisés par formation végétale homogène. Les horizons pédologiques sont décrits sur le sondage le plus représentatif à l'aide des paramètres morphologiques suivants : profondeur, épaisseur, effervescence HCl, couleur, teneur en matière organique, pourcentage d'élément grossier (> 2 mm), signes d'hydromorphie et composition granulométrique (test tactile). Cette description du sondage moyen est consignée sur les fiches présentées en **annexe 1**. Chaque horizon est prélevé et mis en sachets plastiques pour le transport au laboratoire ; pour un horizon donné, chaque échantillon correspond au mélange de 3 à 5 réplicats (i.e. échantillons « poolés » correspondant aux 3 à 5 sondages à la tarière) afin de gommer l'hétérogénéité locale. Au laboratoire, les échantillons sont mis à sécher à l'air puis tamisés à 2mm, ceux destinés à l'approche fonctionnelle sont stockés à 4°C avant analyse (pendant une durée maximale de 48 h).

1.2.2/ Caractérisation physico-chimiques des sols

Les analyses physico-chimiques courantes des profils moyens ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras (INRA-LAS). Les analyses réalisées sont les suivantes :

- **pH** à l'eau (NF ISO10390),
- **granulométrie** en 5 fractions sans décarbonatation préalable de l'échantillon (NF X 31-107),
- **calcaire total** au calcimètre de Bernard (NF ISO 10693),
- teneurs en **C organique** et **N total** par analyse élémentaire CHN (NF ISO 10694 et NF ISO 13878) avec correction calcaire pour la détermination de la teneur en C organique,
- **phosphore assimilable** : méthodes Joret-Hébert (NF X 31-161) et Olsen,
- **Capacité d'Echange Cationique (CEC)** à la cobaltihexamine (NF X 31-130),
- **cations échangeables** à la cobaltihexamine : Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Al et H⁺ (NF X 31-130),
- **formes du fer** : fer amorphe (méthode Tamm à l'obscurité), fer « libre » (méthode Mehra-Jackson) et fer total (NF EN ISO 11885).

Calcul des stocks de carbone organique

Les stocks de carbone organique en kg/m² sont déterminés dans l'horizon 0-10 cm selon la formule suivante :

$$\text{Stock C org} = [\text{C org}] * \text{Da} * e$$

Avec :

- [Corg] = teneur en carbone organique dans l'horizon 0-10 cm en mg.g⁻¹ sol
- Da = densité apparente en g.cm⁻³ déterminée à l'aide de la méthode dites des petits volumes (Annexe 2)
- e = épaisseur de l'horizon de sol en cm (10 cm dans notre cas).

L'association des descriptions terrain et de la caractérisation physico-chimique des horizons prélevés permet de déterminer quels sont les types de sols présents sur les différents sites. Les sols sont dénommés selon le Référentiel Pédologique 2008 (AFES, 2009). Cette caractérisation pédologique des sols permet également d'établir un diagnostic « zone humide ». En effet, l'arrêté du 1er octobre 2009 précise les critères de définition et surtout de délimitation des zones humides. Il affirme que l'un ou l'autre des critères pédologiques ou floristiques suffit à reconnaître une zone humide. Dès lors, le seul critère pédologique, effectué sur le terrain selon la méthodologie préconisée par l'arrêté, suffit à identifier une zone humide et à en définir le périmètre. Un sol peut être qualifié d'humide lorsque des traces d'humidité ou d'oxydation (horizons histiques (tourbeux), traits réductiques et rédoxiques) sont repérables à 50 cm, au plus, sous la surface du sol. Ainsi, nous pouvons déterminer si les zones choisies dans le cadre de cette étude peuvent être identifiées en tant que zone humide.

I.3 Suivi du fonctionnement des sols *in situ*

Afin de caractériser le fonctionnement *in situ* des sols des 4 sites "pilotes", des mesures (i) de potentiel redox, (ii) de respirométrie, (iii) des formes minérales de l'N, (iv) de la biomasse microbienne, (v) de la minéralisation de l'N et (vi) de la dénitrification ont été réalisées saisonnièrement (3 prélèvements mensuel par saison) d'avril 2011 à mars 2012 dans l'horizon de surface (0-10 cm) sur les 12 zones d'échantillonnage.

I.3.1/ Potentiel redox

Les mesures de potentiel redox (**E_h** en mV) ont été réalisées à 5 cm de profondeur à l'aide d'une électrode redox Pt 5900.

I.3.2/ Respirométrie

La respiration du sol a été mesurée à l'aide d'un analyseur de gaz à infrarouge portable de terrain de type EGM 4 de PP system. Cet appareil permet de mesurer directement sur le terrain le dégagement de CO₂ lié à l'activité biologique globale du sol (ou respiration du sol). Cette mesure prend en compte à la fois la minéralisation du C de la matière organique par les micro-organismes du sol sous forme de CO₂ (respiration hétérotrophe) et la respiration racinaire (respiration autotrophe). Les mesures respirométriques sont ainsi réalisées en même temps que les campagnes de prélèvements permettant le suivi saisonnier des formes minérales de l'azote, de la minéralisation de l'azote et de la dénitrification *in situ*.

I.3.3/ Suivi des formes minérales de l'azote

Les formes d'azote minérales (N-NH₄⁺ et N-NO₃⁻) sont quantifiées sur des prélèvements de sol effectués saisonnièrement (3 prélèvements mensuel par saison) après extraction par agitation pendant 1 heure de 20 g de sol avec 100 ml de K₂SO₄ 0,5M. Les extraits sont filtrés sur filtres Whatman n°42 et conservés à -18°C jusqu'au dosage des formes minérales de l'N (N-NH₄⁺ et N-NO₃⁻) par analyse en flux continu (Auto Analyser3 de marque Bran & Luebbe, Germany).

Dans le même temps, la minéralisation nette de l'azote est estimée par la méthode dite des "buried bags", sachets plastiques enfouis dans le sol et laissés 1 mois sur le terrain entre deux prélèvements (Anderson and Ingram 1993). Cette méthode permet de connaître les capacités de production d'N par minéralisation du sol en mesurant l'azote minéral produit dans les sachets enfouis durant le mois d'incubation *in situ* (hors prélèvement par la végétation et hors lessivage par les pluies). La teneur en azote minéral des sachets est déterminée par extraction au K₂SO₄ 0,2M au moment de la mise à incuber (à T₀) et à la fin de l'incubation *in situ* (à T). La teneur en azote à T₀ est ensuite soustraite de la teneur en azote à T permettant le calcul de la minéralisation nette, de la nitrification nette et de l'ammonification nette selon les formules suivantes :

- Minéralisation (µg/g de sol sec) = (N-NH₄⁺^t + N-NO₃⁻^t) - (N-NH₄⁺^{t=0} + N-NO₃⁻^{t=0}) ;
- Nitrification (µg/g de sol sec) = (N-NO₃⁻^t) - (N-NO₃⁻^{t=0}) ;
- Ammonification (µg/g de sol sec) = (N-NH₄⁺^t) - (N-NH₄⁺^{t=0}).

I.3.4/ Suivi de l'azote organique dissout (NOD)

L'azote organique dissout (**NOD**) est obtenu après digestion au persulfate. La digestion au persulfate réduit tout l'N organique en nitrate, déterminées postérieurement par dosage colorimétrique avec le flux continu (Auto Analyser3 de marque Bran & Luebbe, Germany). L'azote organique dissout (NOD) est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{NOD} = \text{NO}_3 (i + O) - \text{NO}_3 (i)$$

Les indices i et $i + O$, indiquent respectivement les concentrations mesurées initialement et après oxydation au persulfate.

1.3.5/ Suivi de la biomasse microbienne

La biomasse microbienne a été déterminée par la technique de fumigation extraction (Vance *et al* 1987). Pour chaque échantillon, 40 g de sol humide ont été utilisés, 20 g pour l'extraction du carbone du sol sans fumigation et 20 g pour l'extraction avec fumigation. La fumigation a été réalisée sous vapeur de chloroforme pendant 24 heures à 20°C (lyse des parois microbienne) et l'extraction du carbone du sol par agitation pendant 30 min dans du K_2SO_4 (0.5 M). Les extraits sont filtrés sur filtres Whatman 42 et conservés à -18°C jusqu'au dosage par un analyseur de carbone organique total (TOC). La biomasse microbienne est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{C Biomasse} = 2.64 * \text{EC}$$

Avec EC: extractible microbien = C total dans l'extrait microbien = C Fumigé – C Non Fumigé

1.3.6/ Dénitrification in situ

La dénitrification *in situ* est suivie saisonnièrement par la méthode de blocage à l'acétylène (Yoshinari *et al* 1977). Pour chaque date de prélèvement, une carotte de sol (2 cm * 15 cm) est placée dans un flacon en verre, équipé d'un septum, fermé hermétiquement et incubé pendant 2 heures à température ambiante avec de l'acétylène. La capacité de dénitrification est estimée par la mesure de la teneur en protoxyde d'azote (N_2O) dans l'atmosphère du flacon après les 2 heures d'incubation (la production de N_2 étant inhibée par l'acétylène, le N_2O s'accumule). Le protoxyde d'azote est analysé via une chromatographie en phase gazeuse (Varian 3400, Middelburg, Pays-Bas) équipée d'un détecteur à capture (ECD ^{63}Ni) et d'une colonne Porapak Q.

I.4 Suivi fonctionnel *ex situ*

Afin de caractériser le fonctionnement *ex situ* des sols des 4 sites "pilotes", des mesures (i) de minéralisation potentielle de l'N (aérobie et anaérobie), (ii) de dénitrification potentielle (DEA), (iii) de minéralisation potentielle du C et (iv) de respiration induite par substrat (SIR) ont été réalisées en mars 2012 sur les horizons de surface (0-10 cm) des 12 zones d'échantillonnage.

1.4.1/ Minéralisation potentielle d'N

- **Minéralisation potentielle N (anaérobie)**

Cette méthode consiste à mesurer la production d'azote minéral après une incubation des sols en conditions anaérobies. La méthode utilisée est dérivée de celle proposée par (Anderson and Ingram 1993). Le sol est placé en condition anaérobie pendant 7 jours. On crée l'anaérobie en plaçant les sols dans l'eau. Ceci favorise la production d'ammonium (NH_4^+) au dépend de celle des nitrates (NO_3^-). La production d' NH_4^+ et dans une moindre mesure de NO_3^- durant cette période correspond à la minéralisation potentielle de l'azote du sol. Un dosage des formes minérales de l'azote est effectué à T0 et à T7. Le détail complet du protocole est présenté en annexe 3. La minéralisation potentielle anaérobie est exprimée en $\mu\text{g d'N} / \text{g de sol sec} / \text{jour}$:

$$\text{Minéralisation potentielle anaérobie} = \frac{[\text{N-min}] \text{ Tf} - [\text{N-min}] \text{ T0}}{7}$$

Le taux de minéralisation est exprimé en % de l'N total du sol / jour :

$$\text{Taux de minéralisation potentiel} = \frac{\text{Minéralisation}}{\text{N total}} \times 100$$

- **Minéralisation potentielle N (aérobie)**

Il s'agit de suivre la minéralisation de l'azote au cours d'une incubation des sols à 28 °C durant 28 jours. Les échantillons de sol sont d'abord tamisés à 5 mm. La capacité de rétention CR est déterminée par la méthode AFNOR rapide (ISO 14240-2:1997 F) (Annexe 4) afin de placer les sols à 80% ($\pm 5\%$) de leur CR pendant l'incubation. Une fois la CR est déterminé, 50 g de sol sont placés dans un bocal en verre (1 bocal par réplicat). Les sols sont réhumectés par vaporisation d'eau déminéralisée jusqu'à atteindre l'humidité souhaitée. Les bocaux sont alors placés dans une étuve à 28°C. En parallèle, un dosage à T0 de l'azote minéral est

effectué ainsi qu'une mesure d'humidité du sol afin de vérifier qu'elle est bien égale à 80% (\pm 5%) de la CR. L'azote minéral est dosé après les 28 jours d'incubation (Tf) afin de calculer la minéralisation de l'azote de la même manière que dans les conditions anaérobies.

Pour la minéralisation aérobie et anaérobie, les formes d'azote minérales du sol sont extraites par une solution de sulfate de potassium (K_2SO_4) (extraction 1:5 soit 20g sol dans 100 ml dans K_2SO_4 ; filtration sur filtre Whatman n°42). Puis, l'azote minéral du sol est dosé à l'aide d'un analyseur en flux continu (Auto Analyser3 de marque Bran & Luebbe, Germany). Les ions nitrates et ammonium sont mélangés avec différents réactifs. Les composés formés sont dosés par colorimétrie. Les nitrates sont réduits en nitrites dans une colonne de cadmium, puis les ions nitrites réagissent avec le sulfanilamide pour former un composé qui se couple ensuite avec le N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride. Le produit de cette réaction est rouge et peut être dosé par spectrophotométrie à 520 nm. Les ions ammonium réagissent avec le salicylate et l'acide dichloro isocyanurique pour former un composé bleu dosé à 660 nm. Les résultats sont initialement exprimés en mg/L et doivent être convertis en $\mu\text{g/g}$ de sol sec grâce au poids de sol sec présent dans l'échantillon et au volume de K_2SO_4 utilisé pour l'extraction.

Les résultats de minéralisation sont présentés sous forme d'une minéralisation brute exprimée en $\mu\text{g/g}$ de sol sec/jour.

1.4.2/ Mesure de la dénitrification potentielle

La dénitrification potentielle (aussi appelé enzymatique) est mesurée dans des conditions environnementales optimales pour les bactéries dénitrifiantes (température de 20° C, conditions d'anoxie complète, conditions non limitantes en NO_3^- et fourniture d'une source de carbone organique). Les mesures sont effectuées avec la technique de blocage à l'acétylène (référence bibliographique), afin de calculer les quantités respectives de N_2O produites. La production de N_2O a été évaluée en plaçant 5 g de sol dans un flacon en verre de 150 ml fermé par un septum et scellé par une capsule en aluminium afin de permettre l'accumulation de N_2O . L'oxygène a été évacué par 5 min de « flushing » au N_2 pur tout en agitant le flacon pour créer des conditions anoxiques complètes. Chaque flacon de a reçu 5 ml d'une solution riche en Glucose et en KNO_3 (préalablement « flushed » avec de l'hélium pendant 20 minutes). Pour les incubations destinées à l'inhibition à l'acétylène (l'acétylène bloque la réduction de N_2O en N_2), 10% du volume de gaz « headspace » été retiré et remplacé par de

l'acétylène. Les flacons ont ensuite été incubés à l'obscurité à 20°C (afin d'éviter la photosynthèse dans le flacon) et chaque échantillon a été réalisé en trois exemplaires. La réaction de dénitrification étant rapide, les temps d'incubation sont de 6 heures. Les mesures de N₂O se font généralement par chromatographie en phase gazeuse (Varian 3400, Middelburg, Pays-Bas) équipée d'un détecteur à capture (ECD ⁶³Ni) et d'une colonne Porapak Q (Tiedje *et al* 1984).

1.4.3/ Minéralisation potentielle du C

Le suivi de la minéralisation du C s'effectue en même temps que les incubations potentielles pour l'N. Un flacon contenant 20 ml de NaOH à 0,2 M est placé dans les bocaux qui sont ensuite hermétiquement fermés puis placés dans une étuve thermorégulée à 28°C. Le flacon de NaOH est destiné à piéger le CO₂ dégagé par l'activité respiratoire des microorganismes hétérotrophes présents dans le sol (plus la soude piège de CO₂ plus sa conductivité diminue). Durant la période d'incubation, le poids des bocaux est mesuré de manière hebdomadaire afin de vérifier qu'il n'y a pas de perte d'humidité. Chaque semaine, la solution de NaOH est changée et sa conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Conductimètre WTW LF330). La mesure de la conductivité permet de déduire le dégagement du CO₂ moyennant l'utilisation d'une courbe d'étalonnage (conductivité = fonction (teneur en CO₂)). Les résultats des mesures de dégagement de CO₂ hebdomadaire sont cumulés sur les 28 jours d'incubation (Annexe 5).

1.4.4/ Mesure de la respiration induite par substrat (SIR)

La respiration induite par un substrat (SIR) permet d'appréhender le potentiel d'activité respiratoire des microorganismes hétérotrophes présents dans le sol en les mettant dans des conditions favorables à leur activité, notamment, par la fourniture d'une source de C facilement assimilable comme le glucose (Kuzyakov (2006). Ceci distingue la SIR de la méthode de minéralisation potentielle du C décrite au § 1.4.3/ pour laquelle la seule source de C labile vient de l'échantillon en lui-même. La SIR permet donc d'estimer de façon indirecte la biomasse microbienne active du sol. Le protocole expérimental a été mis en place par Beare *et al* (1990). Les échantillons de sol (10 g de sol sec) placés dans un flacon en verre de 150 ml fermé avec un septum en caoutchouc et scellé par une capsule en aluminium afin de permettre l'accumulation de CO₂ sont humidifiés (80% de la capacité au champ). Les flacons ont ensuite été incubés pendant 6 h à l'obscurité à 20°C (afin d'éviter la photosynthèse dans le flacon) et

chaque échantillon a été réalisé en trois exemplaires. Les mesures de CO₂ se font après 2 et 6 h généralement par chromatographie en phase gazeuse, avec un détecteur par capture d'électron (Varian 3400, Middelburg, Netherlands équipé d'un catharomètre). La SIR est exprimé en $\mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{sol sec.h}^{-1}$.

Analyses statistiques

L'ensemble des traitements statistiques est effectué à l'aide du logiciel Statistica 6.1 (Statsoft). Nous avons utilisées des tests paramétriques (ANOVA et tests de comparaison de moyenne de Tukey HSD). Le seuil de rejet pour ces analyses a été fixé à $\alpha = 0,05$. Les tests paramétriques ne sont réalisés que si les échantillons sont distribués normalement et que leurs variances sont homogènes ($p > 0,05$ pour chacun de ces tests). La normalité et l'homoscédacité des données sont vérifiées respectivement à l'aide du test Shapiro–Wilk et du test de Bartlett. Deux analyses en Composante Principale (ACP) ont été réalisées : une première ACP pour examiner la variabilité des “objet-horizons” décrits à l'aide de 20 descripteurs physico-chimiques de type quantitatif. La matrice ainsi traitée contenait 20 colonnes et 65 lignes (horizons). Une deuxième ACP pour examiner les relations entre les variables fonctionnelles mesurées *in situ*. La matrice traitée contenait 10 colonnes (variables mesurées) et 324 lignes (4 sites*12 zones*9 dates*3 réplicats). Les ACP ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team. 2010).

II. Résultats

II.1 Diversité des types de sols

L'approche descriptive a permis d'identifier 3 types de sol (Tableaux 2.1 et 2.2) : (1) des **REDUCTISOLS fluviques carbonatés**, (2) des **FLUVIOSOLS carbonatés** et (3) des **ANTHROPOSOLS carbonatés**.

Les REDUCTISOLS et les FLUVIOSOLS se développent à partir d'alluviaux fluviales carbonatés et sont donc caractérisés par un fort taux de carbonates de calcium (CaCO₃), d'où l'indice « ca » appliqué à la totalité des horizons et qui ne sera plus précisé dans le reste du texte afin de simplifier la lecture. Les ANTHROPOSOLS sont eux aussi carbonatés mais se développent à partir de sédiment de dragages ou d'autres types de matériaux d'origine géologique mis en place suite à des activités humaines.

Les REDUCTISOLS sont caractérisés par la présence des horizons minéraux Go et Gr. Les horizons Go correspondent à la zone de battement de la nappe et sont alternativement en

conditions anaérobie (réductrice) et aérobie (oxydante). Cette alternance conduit à l'apparition de tâches d'hydromorphie de couleur rouille correspondant à des précipitations de fer ferrique créées en conditions oxydantes. Les horizons Gr, eux, sont constamment immergés et donc en conditions réductrices. Ils se caractérisent par la présence de fer sous sa forme réduite (fer ferreux) ce qui donne à ces horizons une couleur gris-bleuâtre relativement uniforme pouvant tendre vers le gris-noir en conditions réductrices importantes. La présence de signes réductiques débutant à moins de 50 cm de profondeur constitue le critère permettant de rattacher ces sols à une référence de REDUCTISOL. Ces solons sont développés à partir de matériaux alluviaux fluviaux d'où le qualificatif de « fluvique » attribué à l'ensemble de ces REDUCTISOLS. Néanmoins, malgré ces points communs, les REDUCTISOLS présentent des particularités morphologiques variées dans les sites étudiés.

Le REDUCTISOL de **la peupleraie du site de Petiville** (P-peup) présente un horizon de surface organo-minéral A relativement bien développé en terme de structure (structure biomacrostructuré). Sous l'horizon A, on observe des couches d'aspects et de granulométries parfois différentes. Ces différences texturales traduisent des phases d'alluvionnement distinctes (i.e. polyphasage) au sein du profil. La présence de tâches d'hydromorphie permet de distinguer un horizon Go entre 40 et 140 cm. Cet horizon a été subdivisé en deux parties à cause d'une différence importante dans leurs textures : la partie de 40 à 80 cm (Go1) présente une texture plus fine argilo-limoneuse alors que les sédiments limoneux dominent de 80 à 140 cm (Go2). Ce sol est le plus éloigné du chenal de la Seine, probablement moins atteint par les crues ce qui permet le développement de la structure de l'horizon A et son enrichissement en matière organique. Le sol de **la prairie humide de Petiville** (P-pr) (Tableau 2.1) présente des caractéristiques proches en terme de structuration de l'horizon A et de polyphasage mais est moins riche en matière organique en surface.

Le REDUCTISOL de **la phragmitaie de Petiville** (P-phr) est très proche morphologiquement. Il se distingue des autres REDUCTISOLS par la présence d'un horizon Js qui correspond à un horizon organo-minéral jeune de surface. Cet horizon ne montre aucune structure et ne peut donc pas être considéré comme un horizon A. L'absence d'horizon organo-minéral structuré fait que nous pouvons considérer ce sol comme un REDUCTISOL jeune en voie de différenciation. Un autre sol **sous saulaie** (P-saul) a reçu récemment des sédiments minéraux enfouissant l'horizon Js : il s'agit d'un processus de réalluvionnement qui

montre que ce sol a été récemment submergé par les eaux de la Seine chargées en alluvions, alluvions qui se sont déposés sur le profil (ralentissement du courant par les saules et dépôts des fines).

Les REDUCTISOLS du **Trou Buquet (TB)** se différencient du REDUCTISOL « typique » par une couche de matière organique peu décomposée en surface ainsi que par une morphologie plus complexe et une texture très fine en surface. Dans **la saulaie à mégaphorbaie (TB-saulm)**, sous l'horizon A relativement bien structuré et riche en matière organique, on observe une succession de couches d'aspects et de granulométries différentes. Ces différences texturales marquées traduisent des phases d'alluvionnement distinctes au sein du profil général A/Go/Gr. Ce polyphasage est aussi détecté dans **la cariçaie (TB-saulc)**. Cependant, la présence de tâches d'hydromorphie est détectée dès la surface dans la cariçaie mais seulement à partir de 10 cm dans la saulaie à mégaphorbaie traduisant des conditions d'engorgement différentes en liaison avec la topographie : la cariçaie est probablement inondée plus régulièrement et plus longuement.

Le REDUCTISOL de **la phalariçaie du Trou Deshaye (TD-Phal)** présentent des similitudes avec ceux du Trou Buquet : richesse en matière organique de l'horizon A et polyphasage (texture très fine en surface puis très sableuse dès 35 cm de profondeur). Pour le sol de **la prairie exondée (TD-prexh)**, un double rattachement est diagnostiqué : REDUCTISOL FLUVIOSOL carbonaté. En effet, dans ce cas, les signes d'hydromorphie (tâches rouille) ne semblent pas être dus à des engorgements liés à des remontées de nappe actuelle mais plutôt à une situation passée. L'hydromorphie bien que encore marquée ne serait donc plus le critère de différenciation principale de ce profil. Cette spécificité s'explique par la position topographique haute de la prairie par rapport à la Phalariçaie.

Le REDUCTISOL du **plan d'eau artificiel du site de Grande vase – Petite vase (GvPv-PE)** présente une morphologie assez particulière du fait de son remaniement récent lors de la création du plan d'eau. En surface, on retrouve un horizon organo-minéral jeune Js présentant des tâches d'hydromorphie caractéristiques d'un horizon Go. C'est pourquoi ce premier horizon a été qualifié de JsGo. Un horizon de transition est distingué de 25 à 50 cm. En effet, bien que des tâches d'hydromorphie, propres à un horizon Go, soient présentes, certaines caractéristiques d'un horizon Gr (couleur tirant sur le gris-vert) ressortent. De ce fait,

il a été nommé GoGr. Un horizon Gr est distingué de 50 à 100 cm. Ce système étant totalement reconstitué, le REDUCTISOL peut être qualifié de « remanié ».

Les REDUCTISOLS sous saulaies du bras mort de Saint Etienne du Rouvray (**StER-Sn** et **StER-SI**) présentent une texture très fine associée à une bonne richesse en matière organique en surface. L'un des profils présente des signes de polyphasage. On retrouve des caractéristiques proches pour le REDUCTISOL sous saulaie situé dans une dépression de l'Ile du Bras Fallais (Tableau 2.3).

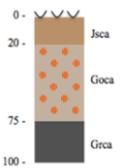
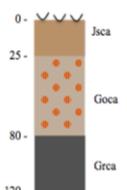
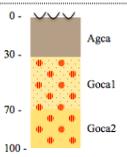
Des FLUVIOSOLS sont décrits sur le site de **Bardouville (BARD)** et sur **l'île du Bras Fallais (BF)**. Le site de Bardouville se caractérise par une forte érosion et présente des sols sableux que l'on peut rattacher aux FLUVIOSOL BRUT carbonaté (profil de type M). La nature grossière des alluvions constitutives et leur caractère carbonaté associés une faible teneur en fer et à des engorgements liée à des masses d'eau circulante empêchent que les signes d'hydromorphie se différencient clairement, bien que ces sols soient situés dans le chenal principal et régulièrement submergés. Le FLUVIOSOL de **l'Ile du Bras Fallais sous forêt alluviale mixte (BF-for)** est un FLUVIOSOL BRUNIFIE carbonaté qui présente un horizon structural en plus de l'horizon A macrostructuré indiquant des processus de différenciation pédogénétique certes récents mais bien marqués (profil de type ASM). Ce sol possède par ailleurs une texture très fine et une bonne richesse en matière organique et correspond à un FLUVIOSOL typique sans signe d'hydromorphie visible sur les 95 cm du sondage.

Des ANTHROPOSOLS sont décrits sur les sites de **Grande vase – Petite vase (GVPV)** et du **bras mort de Saint Etienne du Rouvray (StER-I)**. La forêt mixte à dominante de saules sur la chambre de dépôt du site de Grande vase – Petite vase (**GVPV-chd**) est caractérisée par un ANTHROPOSOL RECONSTITUE carbonaté provenant de sédiment de dragage. (cf. chambre de dépôt). Ce sol présente un horizon organo-minéral AZ mal structuré de 0 à 8 cm et une couche MZ de 45 à 70 cm constituant une discontinuité physique à la base de ce solum. Ce sol présente un horizon de transition AZMZ de 8 à 45 cm. La texture de ce sol est très sableuse. La position exhaussée par rapport à la Seine et un matériel alluvial pauvre en fer et de granulométrie très grossière filtrante, font que les engorgements ne s'expriment pas par des signes d'hydromorphie classiques rédoxique ou réductique. L'autre

ANTHROPOSOL diagnostiqué sur le site du bras mort de Saint Etienne du Rouvray correspond à un sol situé à proximité de la digue et semble développé à partir de matériaux terreux remaniés mais aussi de gravats.

La réalisation du diagnostic « Zone humide » selon l'arrêté du 1er octobre 2009 permet de déterminer que 15 des 18 sols prospectés peuvent être considéré comme correspondant à des sols humides. Seuls le FLUVIOSOL et les ANTHROPOSOLS décrits ne présentent aucun signe d'hydromorphie à moins de 50 cm de profondeur.

Tableau 2.1. Diversité des types de sols sur les 7 sites sélectionnés. Les zones sont présentées en fonction de leur degré de connectivité au fleuve et des abréviations entre crochets sont données pour chaque zone d'échantillonnage. Les types de sol sont dénommés selon le Référentiel pédologique 2008 (AfeS 2009). Le diagnostic « zone humide » est établi selon l'arrêté du 1er octobre 2009 (modifié d'après le rapport final du projet REBEBAS, 2012).

	SITE	ZONE (FORMATIONS VEGETALES) et [ABREVIATIONS]	PROFIL	APPARITION HYDROMORPHIE (CM)	TYPE DE SOL	DIAGNOS- TIQUE
CONNEXION DIRECTE AU FLEUVE	Petiville	Vasière [P-vn]		0 cm (surface)	REDUCTISOL fluviq. carbonaté	Zone humide
	Petiville	Saulaie / Phragmitaie [P-saul/phr]		20 cm	REDUCTISOL fluviq. carbonaté	Zone humide
	Petiville	Phragmitaie [P-phr]		25 cm	REDUCTISOL fluviq. carbonaté	Zone humide
	Petiville	Prairie humide [P-pr]		Entre 0 et 30 cm	REDUCTISOL fluviq. carbonaté (polyphasé)	Zone humide

				2-5 cm	REDUCTISOL fluviq carbonaté réalluvionné	Zone humide
				20 cm	REDUCTISOL fluviq carbonaté polyphasé	Zone humide
				0 cm (surface)	REDUCTISOL fluviq carbonaté	Zone humide
				10 cm	REDUCTISOL fluviq carbonaté (polyphasé)	Zone humide
				Absence de tâches	FLUVIOSOL BRUT carbonaté redoxique	Zone humide (?)
				0 cm (surface)	REDUCTISOL fluviq carbonaté (polyphasé)	Zone humide
CONNEXION ARTIFICIELLE AU FLEUVE	Grande vase/ Petite vase	Plan d'eau artificiel connecté [GVPV-pe]		0 cm (surface)	REDUCTISOL fluviq carbonaté remanié	Zone humide
CONNEXION PAR LA NAPPE ALLUVIALE	Trou Buquet	Saulaie à mégaphorbiaie [TB-saulm]		10 cm	REDUCTISOL fluviq carbonaté polyphasé	Zone humide

	Trou Buquet	Saulaie à Carex [TB-saulc]		0 cm (surface)	REDUCTISOL fluviq carbonaté polyphasé	Zone humide
	Trou Deshayé	Phalariçaie [TD-phal et TD-phalf]		6 cm	REDUCTISOL fluviq carbonaté (polyphasé)	Zone humide
DECONNEXION PAR EXHAUSSEMENT	Trou Deshayé	Prairie [TD-prexh]		25 cm	REDUCTISOL FLUVIOSOL carbonaté	Zone humide
	Ile du Bras Fallais	Forêt mixte alluviale [BF-fm]		Absence de tâches	FLUVIOSOL brunifié carbonaté	Zone NON humide
	Bras mort de St Etienne	Liseré boisé à brassicacées [StER-l]		Absence de tâches	ANTHROPOSOL / FLUVIOSOL Carbonaté	Zone NON humide
	Grande vase Petite vase	Forêt mixte à dominante de Saules sur chambre de dépôt [GVPV-chd]		Absence de tâches	ANTHROPOSOL RECONSTITUE carbonaté provenant de sédiments de dragage	Zone NON humide

II.2 Variabilité physico-chimiques des sols

Tous les sols décrits présentent une forte teneur en carbonate de calcium (CaCO_3) variant de 20 à 36 % et corrélativement un pH variant de 7,7 à 8,2. Des différences de texture marquées sont observées entre les sols des différents sites. Le sol de la Cariçaie du Trou Buquet (**TB-saulc**) est marqué par un horizon de surface très argileux et des horizons de profondeur plutôt limono-sableux-argileux. De même, tous les REDUCTISOLS fluviq carbonatés du site de Petiville présentent une texture limono-sableuse-argileuse. Le plan d'eau du site de Grande vase – Petite vase présente des horizons limono-argileux. Les sols du Bras mort de Saint Etienne du Rouvray ainsi que les sols de l'Ile du Bras Fallais présentent des sols très argileux. Ainsi, il existe une grande variabilité de texture entre ces sols. Ces différences

de textures observées entre les sites de prospection sont principalement dues à des apports de différents types d'alluvions. Cette variabilité de granulométrie retrouvée le long des berges de la Seine est caractéristique des sols de zone alluviale.

Une autre distinction nette s'observe pour le stock en carbone organique des horizons de surface (Tableau 2.3). En effet, les REDUCTISOLS directement connecté au fleuve présentent des valeurs variant de 1,76 kg/m² sous la saulaie jeune alluvionnée de Petiville (**P-saul**) à 3,80 et 6,69 kg/m² respectivement sous les saulaies du Bras mort de Saint Etienne (**StER-saul**) et de l'Ile du Bras Fallais (**BF-saul**). Ces deux derniers sites se situent dans des positions topographiques basses régulièrement inondés qui permettent une accumulation de matière organique, l'engorgement favorisant une décomposition lente. Les sites connectés seulement par la nappe (Trou Buquet et Trou Deshaye) présentent des valeurs variant de 3,0 kg/m² (**TD-phal**) à 5,7 kg/m² (Saulaie à mégaphorbiaie du Trou Buquet). Ces sites sont des dépressions situées derrière une digue : la litière peut donc s'accumuler sans risque d'être emportée par les crues et l'engorgement favorise, là encore, une décomposition lente et au final, un stockage de matière organique. Les sites déconnectés par exhaussement (position topographique haute) ont des stocks en C organique variant de 1,94 kg/m² (**BF-fm**) à 3,7 kg/m² (**TD-prexh**) en passant par 3,2 kg/m² (**GVPV-chd**). Ceci peut s'expliquer en partie par la stabilisation de ce groupe de sols qui ne sont pas atteints par les crues à faible temps de retour et ne sont donc pas régulièrement rajeunis, permettant un enrichissement en C organique des horizons de surface et une décomposition plus rapide en conditions aérobie.

L'analyse pédologique classique précédente ne permet pas d'aborder conjointement l'ensemble des descripteurs physico-chimiques. C'est pourquoi nous avons recours à une analyse en composantes principales ACP. Elle permet de dégager la variabilité des "objets-horizons" décrits à l'aide de 20 descripteurs physico-chimiques de type quantitatif. La représentation graphique (Fig. 2.3.B) donne la position relative des "objets-horizons" dans l'espace formé par 2 premiers axes et les relations entre les descripteurs physico-chimiques. L'axe 1 (50,78% de la variance) est principalement expliqué par la teneur en carbone organique, azote et bases échangeables (Ca, Mg, K). Ces descripteurs physico-chimiques sont par ailleurs bien corrélés entre eux (cf. angle faible). L'axe 2 (15,03% de la variance) correspond plutôt à un axe dépendant de la texture en opposant les horizons à texture limoneuse, riches en limon grossier (Lg, partie positive de l'axe), aux horizons à texture plus

grossière, riche en sables grossiers (Sg, partie négative de l'axe). Les autres paramètres interviennent moins dans la formation de l'espace réduit puisqu'ils ne se rapprochent pas du cercle des corrélations (Fig. 2.3.A). On note toutefois une corrélation entre pH et la teneur de limon grossier. Les teneurs en fer libre sont quant à elles corrélées avec les éléments fins (argile et limons fins).

Les « objets-horizons » (Fig. 2.3.B) se regroupent ainsi en 3 domaines : le **domaine organo-minéral** constitué exclusivement d'horizons A, un **domaine intermédiaire** où coexistent plusieurs types d'horizons à texture limoneuse dominante (Js, Go et Gr notamment) et le **domaine minéral** avec les couches M et les horizons Z à texture plus sableuse. Au-delà de la simple opposition entre domaine minéral (pH élevé, forte teneur en CaCO₃, texture grossière) et le domaine organo-minéral (pH plus bas, teneur plus faible en CaCO₃, texture fine, enrichissement en Corg et N, et corrélativement en bases échangeables, plus forte teneur en “fer libre”), nous avons projeté sur l'ACP réalisée l'appartenance à un profil pédologique et à un degré de connectivité (Fig. 2.4) pour mieux comprendre le mode de répartition des « objets-horizons ». On constate que les horizons, décrits par leurs caractéristiques physico-chimiques, ne s'organisent pas selon l'appartenance à un profil donné ou à un degré de connectivité au fleuve (Fig. 2.4).

II.3 Suivi du fonctionnement *in situ* de l'horizon 0-10 cm

Les deux premiers axes de l'ACP réalisée sur l'ensemble des descripteurs fonctionnels mesurés *in situ* entre avril 2011 et mars 2012 absorbent 51% de l'inertie totale (Fig. 2.5.A). L'axe 1 (33,89% de la variance) correspond à un gradient d'enrichissement en Matière Organique (**MO**) de l'horizon 0-10 cm : la partie positive de l'axe correspond aux plus fortes teneurs en **Corg** et **Ntot** donc en MO, la partie négative aux plus faibles valeurs. Ces 2 descripteurs sont par ailleurs bien corrélés entre eux (cf. angle faible) et avec la biomasse microbienne (**BM**), l'azote organique dissous (**NOD**), les nitrates (**NO₃**) et le rapport C/N (**C/N**).

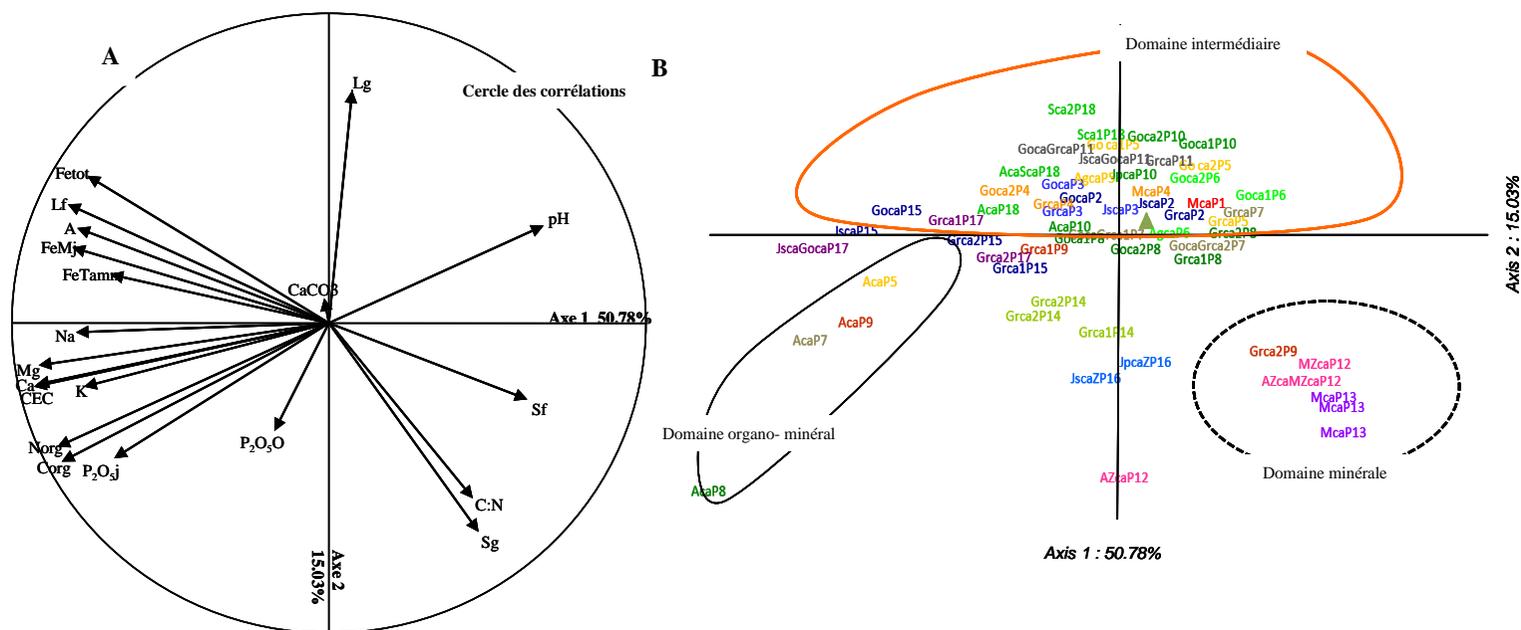
Tableau 2.2. Dénomination des 18 profils pédologiques observés sur les 7 sites d'échantillonnage selon le Référentiel Pédologique (Afes, 2009) et rattachement de chaque profil au gradient de connexion (DC = Directement Connecté, IC = Indirectement Connecté et NC = Non Connecté).

Sites	Formation	Type de sol (RP, AFES 2009)	Type de connexion	Profil
	P-vn	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Mca		P1
	P-saul/phr	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Jsca/Goca/Grca		P2
	P-phr	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Jsca/Goca/Grca		P3
	P-saul	REDUCTISOL fluviatique carbonaté réalluvionné: McaS/JscaS/Goca1S/Goca2S/GrcaS		P4
	P-peup	REDUCTISOL fluviatique carbonaté polyphasé: Aca/Agca/Goca1/Goca2/Grca		P5
Petiville	P-pr	REDUCTISOL fluviatique carbonaté (polyphasé): Agca/Goca1/Goca2	DC	P6
	TB-saulm	REDUCTISOL fluviatique carbonaté polyphasé: Aca/GocaGrca1/GocaGrca2/Grca		P7
Trou Buquet	TB-saulc	REDUCTISOL fluviatique carbonaté polyphasé: Aca/Goca1/Goca2/Grca1/Grca2	IC	P8
	TD-phal	REDUCTISOL fluviatique carbonaté polyphasé: Aca/Grca1/Grca2	IC	P9
Trou Deshayé	TD-prexh	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Aca/Jpca/Goca1/Goca2	NC	P10
Grande Vase / Petite Vase	GVPV-pe	REDUCTISOL fluviatique carbonaté remanié: JscaGoca/GocaGrca/Grca	IC	P11
	GVPV-chd	ANTHROPOSOL RECONSTITUE carbonaté: Azca/AzcaMzca/Mzca	NC	P12
Bardouville	BARD	FLUVIOSOL BRUT carbonaté redoxique: Mca	DC	P13
	StER-sn	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Grca1/Grca2		P14
Bras mort de St. Etienne	StER-saul	REDUCTISOL fluviatique carbonaté: Jsca/Goca/Grca1/Grca2	DC	P15
	StER-l	ANTHROPOSOL FLUVIOSOL carbonaté: Jsca/Jpca	NC	P16
	BF-saul	REDUCTISOL fluviatique carbonaté (polyphasé): JscaGoca/Grca1/Grca2	DC	P17
Ile du Bras Fallais	BF-fm	FLUVIOSOL brunifié carbonaté: Aca/AcaSca/Sca1/Sca2	NC	P18

Tableau 2.3. Valeurs moyennes des stocks de C et N en Kg/m² des horizons de surface (0-10 cm) des sols. Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Zones	Corg (C) (g/kg)	N total (g/kg)	C/N	Stock C (Kg/m ²)			Stock N (Kg/m ²)		
				Moy	Et		Moy	Et	
Petiville									
P-vn	18,62	1,52	12	1,56	0,08	abc	0,13	0,01	b
P-phr	19,15	1,77	11	2,04	0,11	cde	0,18	0,01	bc
P-saul	18,83	1,48	13	1,76	0,13	bc	0,13	0,03	b
P-peup	20,42	1,61	13	2,69	0,68	cdefg	0,23	0,07	bcde
P-pr	29,71	2,19	14	3,88	1,38	ghi	0,33	0,15	efgh
Trou Buquet									
TB-saulm	76,11	5,93	13	5,71	1,51	j	0,43	0,14	h
TB-saulc	93,12	6,43	15	2,38	0,32	cdef	0,17	0,02	bc
Trou Deshayé									
TD-vn	72,92	5,32	14	2,31	0,58	cdef	0,19	0	bc
TD-phal	44,43	3,52	13	2,72	0,71	cdefg	0,21	0,1	bcd
TD-phalf	47,12	3,62	13	2,98	0,42	defgh	0,21	0	cdef
TD-prexh	42,32	3,81	11	3,71	0,19	fghi	0,28	0	fgh
Grande vase - Petite vase									
GVPV-pe	12,12	0,99	12	2,12	0,51	fghi	0,18	0,05	bcd
GVPV-chd	71,11	4,92	14	3,21	1,98	i	0,21	0,16	fgh
Bardouville									
BARD-sn	5,23	0,13	40	0,61	0,11	fghi	0,02	0	defg
BARD-phal	2,21	0,08	27	0,42	0,12	abc	0,01	0	a
BARD-saul	3,56	0,09	39	0,43	0,12	a	0,01	0	a
Bras mort de St Etienne du Rouvery									
StER-sn	38,22	2,25	17	3,31	0,11	a	0,19	0,01	a
StER-saul	51,23	3,97	13	3,81	0,61	cdef	0,29	0,04	bc
StER-l	52,92	4,18	13	4,32	0,21	efghi	0,34	0,02	bcd
Ile du Bras Fallais									
BF-P	68,71	6,51	13	4,16	1,27	hi	0,38	0,11	gh
BF-saul	72,52	5,94	12	6,69	0,62	jk	0,55	0,06	i
BF-fr	45,32	4,01	11	2,62	0,26	cdefg	0,24	0,02	bcdef
BF-fm	49,91	4,37	11	1,94	0,11	cd	0,17	0,01	bc

Figure 2.3. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des profils pédologiques (18 profils, 62 horizons et 20 descripteurs physico-chimiques) des 7 sites : (A) Cercle des corrélations associées au deux premiers axes, et (B) projection des objets horizons. Les deux premiers axes représentent 65,81% de la variance, la direction des flèches donnent le sens de la plus variation des descripteurs.



C

Notations

Sg/ Sf/ Lg/ Lf/ A : 5 fractions granulométriques

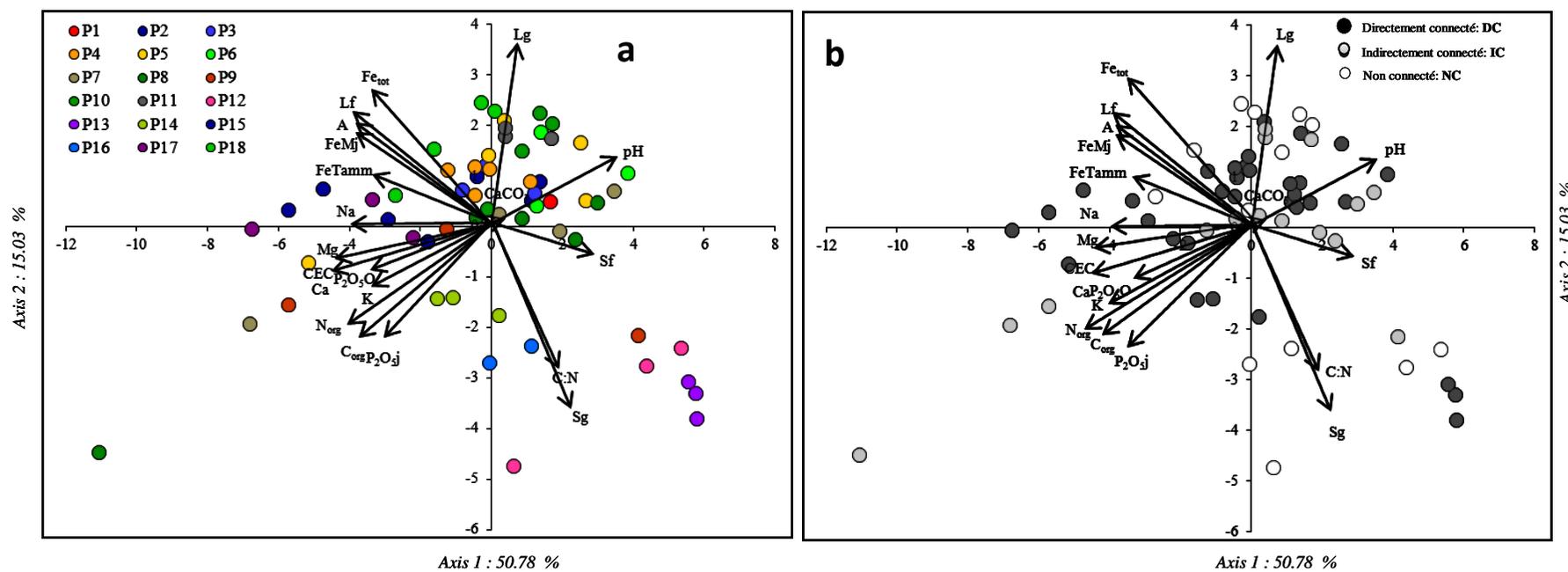
Ca/ Mg/ K/ Na : bases échangeables

Fe Tamm/Fe Mj: Fer amorphe, Fer cristallisé

	Goca	1	P1
Type	↑	↑	↑
d'horizon		N°	
			N° profil

Une couleur pour chaque profil

Figure 2.4. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des profils pédologiques (18 profils, 62 horizons et 20 descripteurs physico-chimiques) : (a) projection des sites d'échantillonnage (profils pédologiques), et (b) projection du degré de connexion (DC = Directement Connecté, IC = Indirectement Connecté et NC = Non Connecté).



L'axe 2 (17,20% de la variance) correspond plutôt à un axe dépendant du potentiel redox (**E**) et traduit un gradient d'engorgement en eau de l'horizon 0-10 cm : la partie positive de l'axe correspond aux plus fortes valeurs de **E** donc aux horizons superficiels non engorgés ou à engorgement temporaire en eau (les moins fréquemment inondés); la partie négative correspond aux plus faibles valeurs de **E** donc aux horizons superficiels à engorgement plus permanent en eau (les plus fréquemment inondés). On note également une corrélation entre ce potentiel redox (**E**), le dégagement de CO₂ liée à la respiration (**CO₂**), la minéralisation nette en N (**Minnet**) et la dénitrification (**N₂O**). Enfin, le potentiel redox (**E**) s'oppose à NH₄ : aux fortes valeurs de **E** correspondent des faibles valeurs en NH₄ et inversement.

En projetant sur l'ACP, l'appartenance à un degré de connectivité (Fig. 2.5.B), on constate que les horizons superficiels qui s'organisent préférentiellement le long de l'axe 1 (gradient de MO) correspondent aux sites indirectement connectés (Trou Buquet, TD-phal et TD-phalf du site Trou Deshayé). Tous les horizons superficiels des profils du site de Petiville (directement connecté) s'organisent préférentiellement selon l'axe 2 (gradient d'engorgement en eau) : **P-vn**, **P-Phr**, **P-sal** puis **P-peup** et **P-pr**. Cet axe 2 permet de faire la distinction entre les sols les moins fréquemment inondés (**TD-prexh**, **P-peup** et **P-pr**) et les sols les plus fréquemment inondés (**TD-vn** et **P-vn**). Pour évaluer l'influence du potentiel redox sur certains descripteurs fonctionnels *in situ*, nous avons effectué des régressions linéaires (Fig. 2.6):

- Plus le potentiel redox augmente, plus la respiration augmente (Fig. 2.6.A). On peut donc déduire que le niveau de respiration suit le potentiel redox. Nous distinguons une corrélation positive entre la respiration et le potentiel redox ($R^2 = 0,13$; $p\text{-value} = 0,0001$).
- Plus le potentiel redox augmente, plus la dénitrification augmente (Fig. 2.6.B). Sur l'ensemble des résultats, nous distinguons une corrélation positive entre la dénitrification et celles de potentiel redox ($R^2 = 0,03$; $p\text{-value} = 0,0001$).
- Corrélation la minéralisation nette – potentiel redox (Fig. 2.6.C). Enfin, nous distinguons une corrélation positive entre la minéralisation nette et celles de potentiel redox ($R^2 = 0,12$; $p\text{-value} = 0,0001$). Plus le potentiel redox augmente, plus la dénitrification augmente.

Figure 2.5. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les paramètres fonctionnels mesurés *in situ* sur l'ensemble des sites d'études entre avril 2011 et mars 2012. Projections des paramètres fonctionnels par (A) zones d'échantillonnage et (B) degrés de connexion. (CO₂ : respiration totale du sol; Minnet : minéralisation nette ; NO₂ : dénitrification réel ; NH₄ et NO₃ : formes minérale de l'azote ; Corg : carbone organique ; Ntot : azote total ; NOD : azote organique dissous ; BM : biomasse microbienne ; E : potentiel redox).

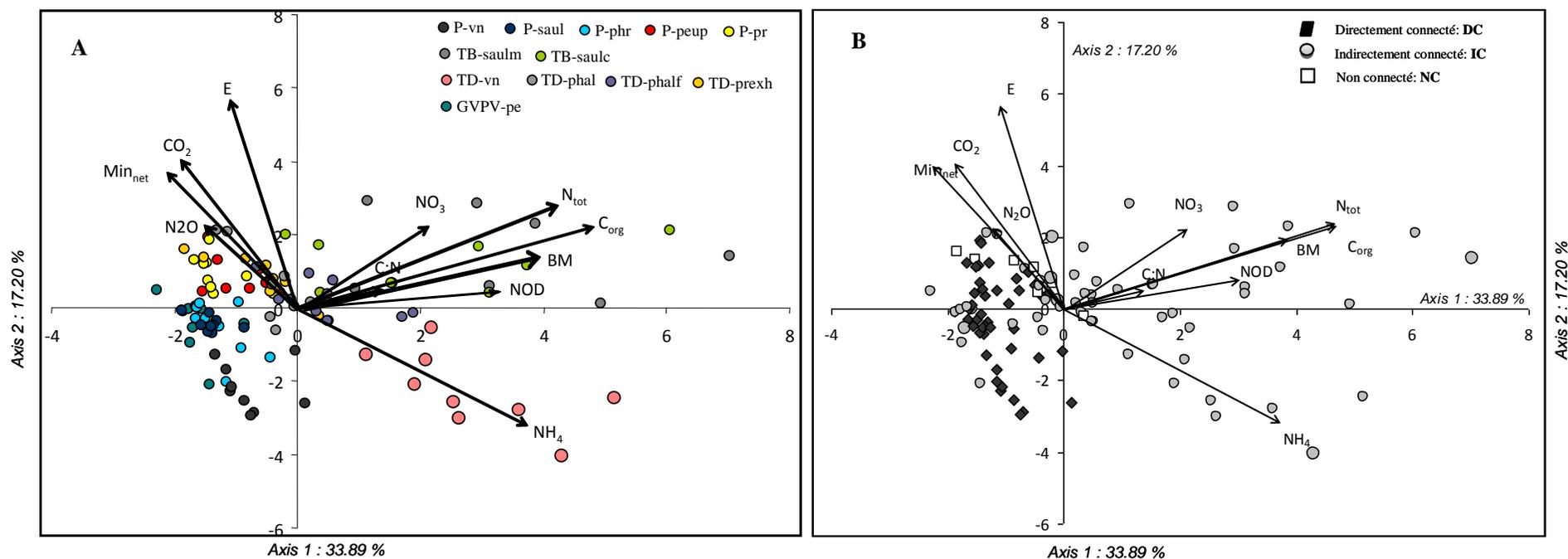
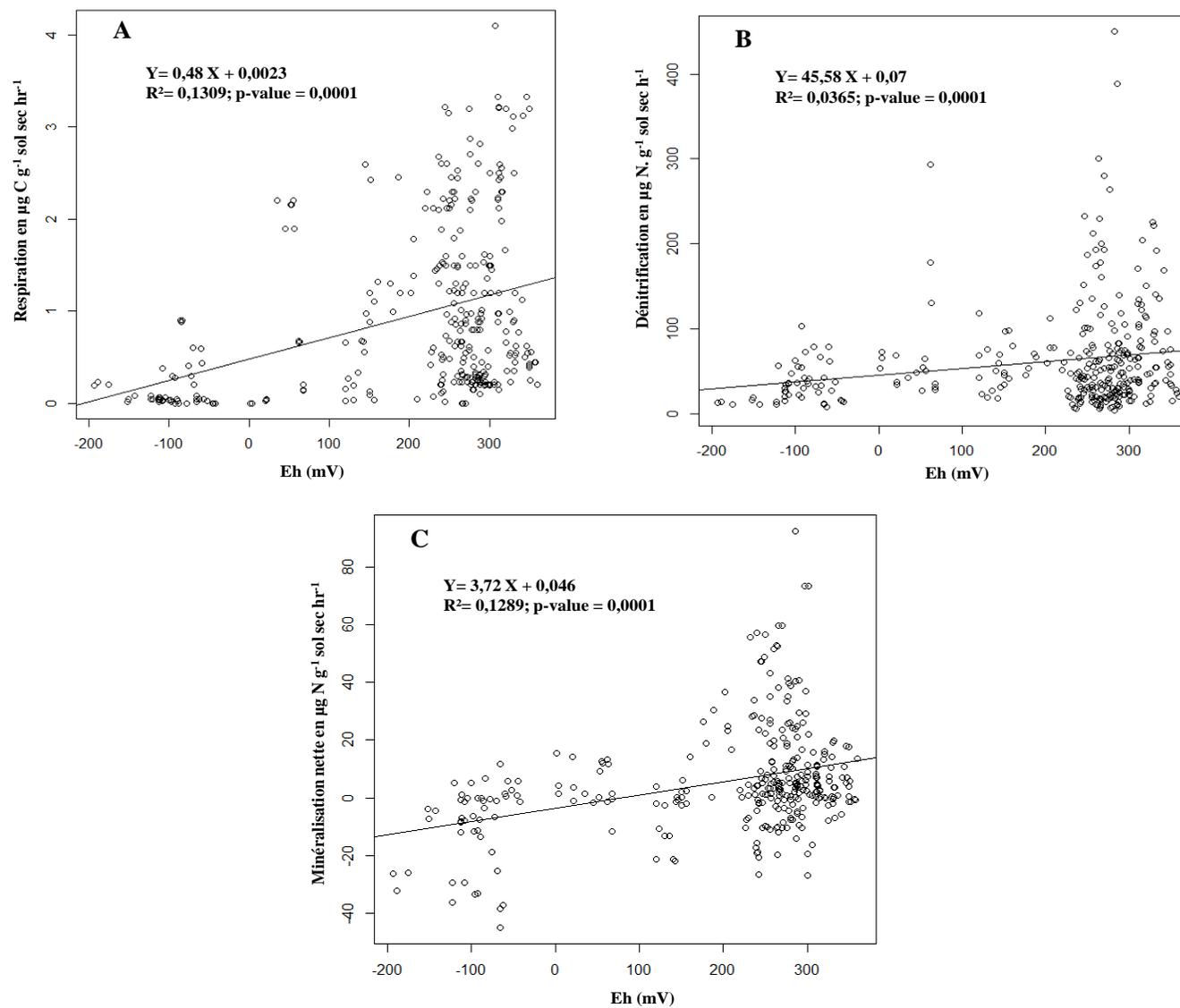


Figure 2.6. Régressions linéaires entre le potentiel redox et (A) la respiration, (B) la dénitrification, et (C) la minéralisation N nette.



II.4 Suivi du fonctionnement potentiel *ex situ* de l'horizon 0-10 cm

Si l'on compare les 4 « sites pilotes » en termes de C organique facilement minéralisé sous forme de CO₂ au cours des incubations en conditions contrôlées (Tableau 2.4), on constate que les horizons de surface produisant le plus de CO₂ sont ceux du Trou Buquet, **TB-saulm** et **TB-saulc**, avec des valeurs respectives de 276 et 312 µg de C/g sol sec/jour. Les valeurs les plus faibles sont trouvées sur la zone **GVPV-pe** avec 71 µg de C/g sol sec/jour. Globalement, les sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) dégagent plus de CO₂ (en µg/g sol/jour) que les sites connectés naturellement (**P**) ou artificiellement (**GVPV**) sur la durée de l'incubation.

Sachant que les horizons de surface de chaque site possèdent des teneurs en C organique très différentes, on peut aussi exprimer le résultat des incubations sous forme de taux de minéralisation (C minéralisé sous forme de CO₂ en % du C organique total / jour). Dans ce cas, les horizons de surface produisant le plus de CO₂ sont les horizons de surface des sols du site du Petiville avec un maximum de 0,18 % du C organique total / jour pour la vase nue (**P-vn**). Ce site présente cependant un gradient de minéralisation du C : celui-ci a tendance à diminuer progressivement quand on passe des zones d'échantillonnage proche du fleuve (**P-vn**, **P-Phr**, **P-Saul**) aux zones les plus éloignées (**P-Peup** et **P-Pr**). Les taux de minéralisation les plus faibles se retrouvent sur les sols des sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) qui ne laissent pas apparaître de gradient clair en fonction des zones d'échantillonnage.

Dans le cas de la SIR, la fourniture d'une source de C facilement assimilable permet de préciser les résultats obtenus précédemment : en effet, c'est l'horizon de surface de la prairie exondée du trou Deshayé (**TD-prexh**) qui produit le plus de CO₂ avec une valeur de 14 µg de C/g sol sec/h. Il est suivi par les horizons de surface du Trou Buquet (**TB-saulm** et **TB-saulc**). Les valeurs de SIR les plus faibles sont trouvées sur la vase nue et la phragmitaie de Petiville (**P-vn** et **P-phr**) avec des valeurs respectives de 0,42 et 1,05 µg de C/g sol sec/h. Il est également intéressant de noter que le Trou Deshayé présente un gradient des valeurs de SIR : celui-ci a tendance à augmenter progressivement quand on passe des zones d'échantillonnage les plus engorgées en eau (**TD-vn**, **TD-phal**, **TD-phalf**) à la zone la plus exondée (**TD-prexh**).

Si l'on compare les 4 « sites pilotes » en termes de production d'N minéral en condition anaérobie (en $\mu\text{g/g sol/jour}$ et majoritairement sous forme ammoniacal), on constate que les sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) produisent plus d'N minéral que les sites connectés naturellement (**P**) ou artificiellement (**GVPV**) sur la durée d'incubation (Tableau 2.5). Comme précédemment pour le C, sachant que les horizons de surface de chaque site possèdent des teneurs en matière organique très différentes (i.e. et donc en N total), on peut exprimer le résultat des incubations sous forme de taux de minéralisation (N minéralisé en % de l'N total / jour). Dans ce cas, les horizons de surface produisant le plus d'N minéral, plus de 0,30 % de l'N total / jour, se retrouvent au sein des 4 sites dans différentes zones d'échantillonnage (**P-vn**, **P-saul**, **P-Peup**, **TB-saulc**, **TD-vn**, **TD-prexh**). Le taux le plus faible se trouve sur le plan d'eau du site Grande Vase/Petite Vase (**GVPV-pe**) avec un taux de minéralisation de 0,15% de l'N tot/jour.

En termes de production d'N minéral en condition aérobie (en $\mu\text{g/g sol/jour}$), on constate que la production d'N est nettement inférieure à celle obtenue précédemment en condition anaérobie sauf pour la vase nue de Petiville (**P-vn**). Dans ces incubations aérobies, l'ammonium produit peut être transformé en nitrates par nitrification ; ces derniers peuvent être utilisés par la biomasse microbienne (immobilisation) ou subir le processus de dénitrification. Par ailleurs, on note pour les sites de Petiville et du Trou Deshayes un gradient de minéralisation aérobie de l'N : à Petiville, celui-ci a tendance à diminuer progressivement quand on passe des zones d'échantillonnage proche du fleuve (**P-vn**, **P-Phr**) aux zones les plus éloignées (**P-Peup** et **P-Pr**) ; au Trou Deshayes, il a tendance à diminuer progressivement quand on passe des zones d'échantillonnage les plus engorgées en eau (**TD-vn**, **TD-Phal**) au zone moins engorgées (**TD-prexh**). La valeur la plus faible est trouvée sur le plan d'eau du site Grande Vase/Petite Vase (**GVPV-pe**) avec 0.80 μg de N/g sol sec/jour.

Pour le **taux de minéralisation (en % de l'N total / jour)**, la valeur la plus forte est mesurée dans la vase nue du site Petiville (**P-vn**), alors que les valeurs les plus faibles sont trouvées sur la phalariçaie et la prairie exondée de site Tour Deshayes (**TD-phal** et **TD-prexh**), la saulaie de Trou Buquet (**TB-saulm**) et la prairie de site Petiville (**P-pr**). Ce mode d'expression ne modifie pas les tendances observées en termes de gradient de minéralisation de l'N à Petiville et au trou Deshayes.

La dénitrification potentielle (DEA) est quant à elle significativement différente d'une zone d'échantillonnage à l'autre (Tableau 2.5). Les horizons de surface produisant le plus de N₂O sont ceux de la prairie exondée (**TD-prexh**) et de la phalariçaie (**TD-phal**) du trou Deshayes avec des valeurs respectives de 2,98 et 1,80 µg de N/g sol sec/h. Les valeurs de DEA les plus faibles sont trouvées sur la vase nue et la phragmitaie de Petiville (**P-vn** et **P-phr**) avec des valeurs respectives de 0,35 et 0,16 µg de N/g sol sec/h.

III. Interprétation – Discussion

III.1 Diversité morphologique des sols

La majorité des sols rencontrés sur les berges de la Seine appartiennent à la catégorie des REDUCTISOLS fluviques (cf. diagnostique « Zones humides », Tableau 2.1). Ces sols sont les plus représentés spatialement sur l'ensemble des 7 sites prospectés et sont conditionnés par une durée plus ou moins prolongée d'engorgement en eau.

Les REDUCTISOLS localisés dans la partie « active » de la plaine alluviale (i.e. directement connectés au fleuve) ont une morphologie conditionnée par l'engorgement en eau en raison d'une position topographique plus basse que le FLUVIOSOL. Les différences morphologiques observées entre les horizons de surface des REDUCTISOLS peuvent être mises en relation avec leur position vis-à-vis de la Seine. Ainsi, la Phragmitaie et la Saulaie à Phragmites du site de Petiville (**P-phr** et **P-saul/phr**) et le plan d'eau artificiel connecté du site de Grande vase – Petite vase (**GVPV-pe**) présentent tous un horizon Js en surface. La présence de cet horizon Js peu épais dans ces REDUCTISOLS témoigne des fréquentes perturbations qu'ils subissent de par la proximité et la connexion directe avec le fleuve naturelle (**P**) ou artificielle (**GVPV**). Ces fréquentes perturbations ralentissent voire empêchent la formation d'un horizon A structuré typique compte-tenu de leur effet de « rajeunissement ». Plus éloigné du fleuve, les REDUCTISOLS de la prairie humide et de la peupleraie de Petiville (**P-pr** et **P-peup**) sont moins perturbés ce qui laisse le temps à un horizon A typique de se développer : structuration et enrichissement en matière organique par rapport à l'horizon jeune de surface Js à faible temps de différenciation. Au-delà des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques habituelles, le temps de différenciation des sols semble donc être un facteur discriminant important à prendre en compte.

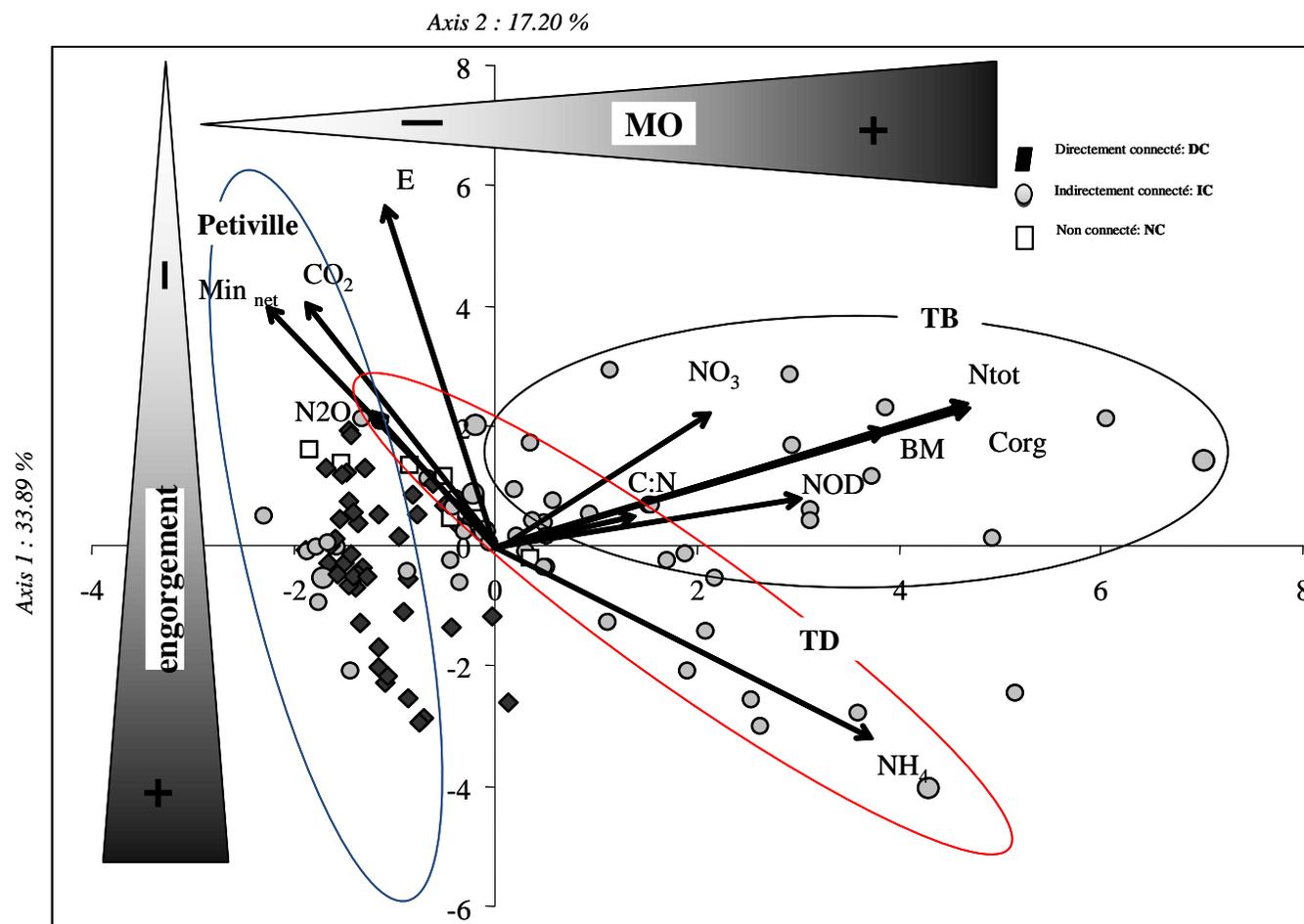
Tableau 2.4. Résultats de taux de minéralisation potentielle du C et SIR des horizons de surface (0-10 cm) des sols des 4 sites pilote (Petiville, Trou Buquet, Trou Deshayé, Grande Vase / Petite Vase). Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Sites	Minéralisation potentielle du C				SIR			
	µg C/g de sol sec/jour		Taux % Corg/jour		(µg C g ⁻¹ sol sec h ⁻¹)			
	Moy	Et	Moy	Et	Moy	Et		
Petiville								
P-vn	122,49	2,72	0,18	0,01	a	0,42	0,12	a
P-phr	129,04	34,58	0,15	0,02	ab	1,05	0,32	ab
P-saul	92,04	14,92	0,17	0,04	a	4,82	0,07	e
	130,32	38,01	0,13	0,05	ab	1,8	0,24	ab
P-peup								
P-pr	104,91	11,70	0,10	0,04	ab	4,94	0,96	e
Trou Buquet								
	276,38	62,56	0,08	0,01	bc	12,06	2,64	h
TB-saulm								
	311,78	68,88	0,09	0,02	bc	9,39	0,4	g
TB-saulc								
Trou Deshayé								
TD-vn	229,33	15,30	0,09	0,01	bc	2,63	0,03	cd
TD-phal	167,23	19,10	0,09	0,01	bc	4,39	0,04	de
TD-phalf	212,97	20,74	0,12	0,01	bc	7,01	0,27	f
TD-prexh	133,44	22,63	0,08	0,01	bc	14,2	3,26	h
Grande vase - Petite Vase								
GVPV-pe	70,69	13,71	0,12	0,01	ab	1,5	0,1	ab

Tableau 2.5. Résultats de taux de minéralisation potentielle de l’N (anaérobie et aérobie) et de la dénitrification potentielle ou DEA des horizons de surface (0-10 cm) des sols des 4 « sites pilotes » (Petiville, Trou Buquet, Trou Deshayé et Grande Vase / Petite Vase). Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Sites	Minéralisation potentielle anaérobie de l’N					Minéralisation potentielle aérobie de l’N					DEA		
	µg/g de sol sec/jour		Taux % Ntotal/jour			µg/g de sol sec/jour		Taux % Ntotal/jour			(µg N. g ⁻¹ sol sec h ⁻¹)		
	Moy	Et	Moy	Et		Moy	Et	Moy	Et		Moy	Et	
Petiville													
P-vn	6,32	0,35	0,41	0,03	a	6,04	0,64	0,39	0,04	a	0,35	0,1	ab
P-phr	6,67	0,70	0,29	0,04	ab	3,13	0,62	0,12	0,02	bc	0,16	0,09	a
P-saul	3,75	0,94	0,36	0,03	a	1,54	0,29	0,17	0,03	ab	1,27	0,24	bc
	8,28	1,18	0,35	0,14	a	1,53	0,27	0,07	0,05	bc			
P-peup											0,49	0,03	abc
P-pr	5,55	2,72	0,24	0,11	ab	0,98	0,51	0,04	0,02	cd	1,45	0,17	c
Trou Buquet													
	15,37	4,62	0,22	0,03	ab	2,56	0,13	0,04	0,01	cd			
TB-saulm											0,79	0,04	abc
	25,01	6,62	0,38	0,11	a	5,49	1,82	0,08	0,03	bc			
TB-saulc											0,87	0,09	abc
Trou Deshayé													
TD-vn	17,69	5,27	0,33	0,07	a	3,85	1,12	0,08	0,03	bc	1,44	0,4	c
TD-phal	11,88	5,87	0,22	0,01	bc	2,29	2,00	0,03	0,01	cd	2,98	1,4	d
TD-phalf	9,23	1,08	0,24	0,02	ab	1,66	0,70	0,04	0,02	cd	0,77	0,23	abc
TD-prexh	14,28	1,36	0,35	0,02	a	1,68	0,55	0,04	0,01	cd	1,8	0,14	d
Grande Vase / Petite Vase													
GVPV-pe	2,01	0,19	0,15	0,04	bc	0,80	0,11	0,06	0,02	bc	0,78	0,19	abc

Figure 2.7. Schéma montrant sur l'ACP réalisée sur l'ensemble des paramètres fonctionnels mesurés *in situ* sur les 4 sites pilotes l'interprétation des deux premiers axes. Abréviation : P = Petiville, TB = Trou Buquet et TD = Trou Deshaye).



Ce temps de différenciation des sols peut-être directement mis en rapport avec les stades de succession écologiques caractéristiques des phénomènes de succession dans les systèmes ripariens : classiquement, il est admis que les sols des écosystèmes les plus éloignés et les plus exhausés par rapport au cours d'eau sont ceux qui sont le moins atteignables par les crues du fleuve à faible temps de retour ce qui laisse du temps aux processus pédologiques de se dérouler.

Les REDUCTISOLS de la saulaie et de la cariçaie du site du Trou Buquet (**TB-saulm** et **TB-saule**) ainsi que ceux des phalariçaies du trou Deshayé (**TD-phal** et **TD-phalf**) se situent dans la partie « inactive » de la plaine. Dans ces sites protégés par les endiguements, les REDUCTISOLS ne sont plus atteints par les eaux de débordement (régime de perturbation) mais reste soumis à des périodes d'engorgement plus ou moins prolongées causées par les remontées de la nappe alluviale (régime de contraintes). Par conséquent, leur morphologie est conditionnée par les processus d'oxydo-réduction. Ces sites étant protégés du « rajeunissement » par les crues, cela permet le développement d'un horizon A typique (par rapport à un horizon atypique jeune de surface type Js). La présence de la digue et l'existence d'une situation topographie en légère dépression expliquent également la forte richesse en matière organique à la surface du REDUCTISOL. Ce positionnement induit des conditions d'engorgement en eau favorisant l'accumulation de matière organique en ralentissant la décomposition de la litière, litière qui reste sur le site puisqu'elle n'est pas emmenée par les eaux de débordement de la Seine.

Les FLUVIOSOLS et ANTHROPOSOLS carbonatés, localisés en position topographique haute, ne sont plus atteints par les eaux de débordement du fleuve durant les périodes de hautes eaux et sont donc, par conséquent, complètement exondée. Leur morphologie est plus influencée par le développement de processus pédologiques aérobie que par les processus d'oxydo-réduction dus à des périodes d'engorgement. Dans le cas de l'ANTHROPOSOL de la forêt mixte sur chambre de dépôt (**GVPV-chd**), la mise en place des sédiments de draguage gravelo-sableux a simulé une phase de sédimentation importante qui a conduit à l'exhaussement du sol. Ce processus d'exhaussement est plus « naturel » dans le cas du REDUCTISOL FLUVIOSOL de la prairie exondée du Trou Deshayé (**TD-prex**) et du FLUVIOSOL BRUNIFIE de la forêt alluviale mixte de l'Ile du Bras Fallais, (**BF-for**).

D'importantes différences de textures d'un profil à l'autre peuvent être observées. Les REDUCTISOLS ont une texture plutôt fine limono-argileuse à argilo-limoneuse et présente souvent un polyphasage. La texture des FLUVIOSOLS est plus variable allant d'une texture très grossière sur le site de Bardouville à une texture très argileuse sur l'Île du Bras Fallais. Ces différences de textures sont à relier à la variabilité des conditions hydrodynamiques qui règlent les processus de sédimentation/érosion à l'origine de la mise en place des sols des plaines d'inondation des grands fleuves (Amoros et Petts, 1993).

L'ACP réalisée sur l'ensemble des 7 sites sur la base des descripteurs physico-chimiques permet de distinguer trois types d'horizon correspondant à (i) un domaine organo-minéral, (ii) un domaine intermédiaire et enfin (iii) domaine minéral. Ces trois domaines correspondent à la différenciation classique des horizons constitutifs d'un profil de sol et représentent le gradient d'enrichissement en MO des horizons organo-minéraux de surface vers les horizons minéraux de profondeur. Les horizons A, les plus riches en MO, forment un domaine organo-minérale relativement étendu indicateur de leur variabilité physico-chimique et notamment texturale. Les horizons Go et Gr sont relativement proches les uns des autres quelque soit le profil de sol auquel ils appartiennent ; ils se regroupent au sein du domaine intermédiaire qui est bien localisé mais s'étire le long de l'axe 1. Ceci démontre une relative homogénéité de ces horizons Go et Gr d'un point de vue texturale (ils sont plutôt limoneux) et une variabilité en termes de teneur en MO qui reste toujours moins importante que celle des horizons A. Le dernier domaine est bien localisé et regroupe les horizons M (voire Z) qui ne contiennent pas de MO et sont de texture grossière (ils sont plutôt sableux).

Par ailleurs, cette caractérisation morphologique (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) ne permet pas la différenciation des sols des sites étudiés en fonction de leur degré de connexion avec la Seine. Les horizons A représentatifs de groupe IC (P7, P8 et P9) se positionnent par exemple à proximité de ceux du groupe DC (P5) et le domaine intermédiaire regroupe des horizons Go et Gr de l'ensemble du gradient de connexion prospecté. Ceci s'explique par le fait que les descripteurs morphologiques et physico-chimiques courants utilisés dans cette partie du travail sont plutôt indicateurs des conditions initiales de mise en place des sols au sein de la plaine d'inondation en rapport avec les processus de sédimentation/érosion conditionnés par l'hydrodynamisme du fleuve. Sur l'ensemble des 7 sites prospectés et malgré qu'ils soient

représentatifs d'un gradient de connexion, on reste dans des sols typiques d'une plaine d'inondation (REDUCTISOLS et FLUVIOSOLS). Seuls les ANTHROPOSOLS ne sont pas caractéristiques d'une plaine alluviale mais leur existence est ici en cohérence avec le degré d'anthropisation de l'estuaire de Seine. A Petiville (site directement connecté), les sols restent actuellement sous la dépendance des crues et des marées et donc des processus de sédimentation/érosion actuels. Les endiguements réalisés au Trou Buquet et au Trou Deshaye (site indirectement connecté) n'ont fait que « figer » les caractéristiques morphologiques des sols existants au moment de leur mise en place. En effet, on sait que certains « trous » de Seine ont été comblés au moment de la mise en place des endiguements ce qui n'est pas le cas des deux sites choisis (S. Moussard, communication orale). De même, si les sols déconnectés par exhaussement ne sont plus atteignables par les crues, ils peuvent conserver assez longtemps certains signes d'hydromorphie comme le REDUCTISOL de la prairie exondée du trou Deshaye notamment de par leur texture fine limoneuse. Dans le cas précis de ce site, l'intérêt écologique est bien ici d'avoir à proximité des sols régulièrement engorgés de la dépression, des sols exondés afin de maintenir une diversité d'habitat favorable à l'expression de la biodiversité. Pour cette même raison, l'existence de FLUVIOSOLS BRUTS (site de Bardouville) et de FLUVIOSOLS BRUNIFIE (Ile du Bras Fallais) qui traduisent des stades d'évolution différents d'un point vu pédologique est également à prendre en compte. L'exhaussement permet une stabilisation des sols et l'expression de processus pédologiques (enrichissement en matière organique et humification par exemple) qui ne peuvent s'exprimer complètement si le sol subit des rajeunissements liés aux crues ou des engorgements liés aux remontées de nappe récurrents.

L'hypothèse de départ selon laquelle, compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale sont fortement dégradés, ne semble pas être validée sur la base des descripteurs morphologiques et physico-chimiques habituels. Par contre, on voit bien que ces descripteurs morphologiques et physico-chimiques habituels ne sont pas suffisants pour évaluer le fonctionnement actuel des sols des écosystèmes rivulaires et corrélativement, les fonctions écologiques spécifiques associées à ces sols. A ce niveau, dans le cas des sols seulement connectés par la nappe ou dans celui des sols déconnectés par exhaussement, on peut se poser la question de savoir si ces sols subissent actuellement des régimes de contraintes et de perturbations qui leur permettent de remplir avec un niveau suffisant les fonctions écologiques qui sont habituellement attribuées au

compartiment sol des écosystèmes rivulaires. Ce résultat justifie pleinement la nécessité d'une approche complémentaire basée sur des descripteurs fonctionnels.

III.2 Suivi de fonctionnement *in situ*

Selon l'ACP (Fig. 2.7) réalisée sur l'ensemble des descripteurs fonctionnels mesurés saisonnièrement *in situ* sur les horizons de surface (0-10 cm), la variabilité du fonctionnement actuel de l'ensemble des sols des 7 sites prospectés dépend en premier lieu de leur enrichissement en MO (axe 1) et en second lieu de leur niveau d'engorgement en eau (axe 2). Les sols du Trou Buquet et du Trou Deshayé s'organisent préférentiellement selon leur niveau d'enrichissement en MO alors que les sols du site de Petiville s'organisent préférentiellement selon leur niveau d'engorgement en eau.

Le site de Petiville, positionné entre le fleuve et la digue, est influencé par la dynamique fluviale à la fois par des inondations, par le battement de la nappe et par des processus d'érosion et/ou de sédimentation ; il constitue, de ce fait, un **écotone rivulaire de référence**. Sur l'ACP (Fig. 2.7), l'ensemble des horizons de surface (0-10 cm) des sols du site de Petiville s'organisent nettement selon un gradient d'engorgement en eau allant des horizons superficiels les plus fréquemment inondés (partie négative de l'axe 2 ; **P-vn**) aux horizons superficiels les moins fréquemment inondés où les plus stables (partie positive de l'axe 2 ; **P-pr** et **P-peup**). Ce site abrite les horizons de surface qui **minéralisent et dénitrifient le plus** (zones **P-pr** et **P-peup**). Ceci s'explique par l'effet combiné de leur éloignement par rapport à la Seine et de leur position topographique. En effet, ces sols se caractérisent par leurs positions topographiques hautes (exhaussement progressif de puis la rive) par rapport au reste du site : ils sont moins atteints par les crues à faible temps de retour ou les marées et subissent donc un régime de contraintes et de perturbations moins important en périodicité. De ce fait, ces sols se trouvent dans un environnement plus « stable » qui va leur permettre d'accumuler de la matière organique. Selon Pinay *et al* (1995), les sols alluviaux peuvent accueillir à la fois une activité de dénitrification et de nitrification. Les nitrates formés dans les microsites aérobies peuvent alors diffuser dans les zones anaérobies où ils seront dénitrifiés. Ces deux processus peuvent exister en même temps et dans le même endroit. Selon Curie (2006), la dénitrification peut avoir lieu à partir du moment où 3 facteurs sont réunis (**i**) une source de nitrates sans laquelle la dénitrification n'a pas lieu de se produire, (**ii**) une absence d'oxygène sans quoi les bactéries utilisent l'oxygène libre plutôt que l'oxygène, et enfin (**iii**) un substrat

carboné facilement utilisable comme source d'énergie pour les bactéries hétérotrophes. Selon Lu *et al* (2009) la présence de carbone organique est indispensable à la réalisation du processus de dénitrification. Le carbone organique favorise également le processus de dénitrification en accélérant la respiration aérobie donc l'anoxie. Il faut souligner aussi que les variations fréquentes des conditions d'oxydoréduction des sols accentuent le processus de dénitrification et entraîne une disparition d'azote plus rapide (Reddy and Patrick 1975; Reddy and Patrick 1984; Tanner *et al* 1999). Selon Faulwetter *et al* (2009), la dénitrification se produit pour une gamme de potentiels redox allant de +100 à +400 mV. Cette gamme correspond bien aux valeurs régulièrement mesurées dans les horizons de surface des zones P-pr et P-peup. A l'inverse, les valeurs mesurées les horizons superficiels les plus fréquemment inondés de la zone **P-vn** sont nettement plus faibles et négative.

Les sols du site de Trou Buquet (**TB-saulm** et **TB-saule**) se trouvent dans une position topographique basse derrière une digue. Ce positionnement fait que, en théorie, il ne subit plus les processus d'érosion et/ou de sédimentation mais reste connecté au fleuve par le battement de la nappe. De ce fait, les sols de ce site ont un fonctionnement plus prononcé en conditions anaérobies conduisant à un ralentissement de la décomposition pendant les phases d'engorgement en eau et donc à une augmentation de la teneur en matières organiques du sol (Chen *et al* 2009; Coletti *et al* 2013; Zhang *et al* 2011). Ceci explique les fortes quantités de carbone organique (**Corg**), d'azote total (**Ntot**) et, corrélativement, de biomasse microbienne (**BM**) et de **NOD** dans ce site. La fonction "**puits de carbone**" dans ces systèmes indirectement connectés (situés derrière les digues) est donc renforcée. L'importance des zones humides dans la séquestration de carbone ne fait pas l'objet d'un consensus dans la littérature (Chen *et al* 2009; Coletti *et al* 2013; Hopkinson *et al* 2012; Zhang *et al* 2011). Dans ces conditions la fonction "**puits de carbone**" a été renforcée, mais pas la fonction **effet filtre** (vis-à-vis de l'N).

Néanmoins, les sols du site du Trou Deshayé, qui se trouvent également derrière une digue, suivent un gradient d'engorgement en eau allant des sols fréquemment inondés (**TD-vn**, **TD-phal** ; partie négative de l'axe 2 sur la figure 2.7), aux sols les moins fréquemment inondés où les plus stables (**TD-phalf**, **TD-prexh** ; partie positive de l'axe 2). Ce site abrite à la fois des zones qui ont des fortes valeurs de dénitrification (**TD-prexh**), et des zones qui sont riche en MO (**TD-vn** et **TD-phal**). Contrairement au Trou Buquet, l'existence d'un gradient topographique au Trou Deshayé a permis à ce site d'assurer les deux fonctions

caractéristiques d'un écotone rivulaire **puits de carbone** et **effet filtre** (vis-à-vis de l'N). Le gradient topographique a permis à ce site de se distinguer de celui de Trou Buquet et de se rapprocher de celui de Petiville.

L'hypothèse de départ selon laquelle, compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale sont fortement dégradés et, corrélativement, que les fonctions écologiques prospectées sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve n'est pas validée. En effet, sur la base de descripteurs fonctionnels mesurés saisonnièrement *in situ*, nous avons démontré que sur les sites indirectement connectés au fleuve et correspondant à des dépressions (niveau topographique bas) peuvent favoriser l'expression de la fonction de stockage du C par enrichissement progressif en MO des sols suite à l'élimination du régime de perturbation lié aux crues. De même, dans les sites indirectement connectés au fleuve et présentant des variations topographiques (dépressions et zones exhausées) peuvent être favorables à la fois à l'expression de la fonction de stockage de C mais aussi à la dénitrification.

III.3 Suivi du fonctionnement potentiel *ex situ*

- *Minéralisation potentielle C et SIR*

Nous avons constaté que les sols provenant des sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) sont ceux qui produisent le plus de CO₂ (**minéralisation potentielle de C**). Cela s'explique par le fait que ces sites sont les plus riches en matière organique MO (Tableau 2.3). Cependant, quand on normalise par rapport à la matière organique présente dans ces sols, ces mêmes sites (**TB** et **TD**) présentent les valeurs les plus faibles en termes de taux de **taux de minéralisation de C**. On note aussi que les valeurs les plus fortes se retrouvent dans les sols du site de **P** (site directement connecté). Cela est dû au niveau d'activité biologique conditionnée par le régime de perturbation mais aussi la qualité de matière organique qui est généralement estimée par son ratio C/N. Selon Citeau *et al* (2008), le ratio C/N est un indicateur qui permet de juger le degré d'évolution de la matière organique, c'est-à-dire de son aptitude à se décomposer plus ou moins rapidement dans le sol. Plus celui-ci est élevé, moins la décomposition est rapide. Dans les sols de site de **P** (site directement connecté), **le taux de minéralisation de C** a tendance à diminuer progressivement quand on passe des zones

d'échantillonnage les plus engorgée en eau (**P-vn**, **P-phr** et **P-saul**) à la zone la plus stable (**P-peup** et **P-pr**), mais pas dans les sols des sites indirectement connectés. En effet, le site Petiville (**P**) est directement connecté au fleuve donc influencé par la dynamique fluviale à la fois par des inondations, par le battement de la nappe et par des processus d'érosion et/ou de sédimentation. De ce fait, les zones d'échantillonnage les plus fréquemment inondées en eau (**P-vn**, **P-phr** et **P-saul**) subissent un régime de perturbation récurrent qui active le fonctionnement biologique du sol de ses milieux pionniers ; cette forte activité biologique s'appuie majoritairement sur une alimentation en matière organique apportée par les eaux du fleuve et facilement utilisable (labile). A l'inverse, dans les zones d'échantillonnage les moins fréquemment inondées donc les plus stables (**P-peup** et **P-pr**), l'activité biologique utilise de la matière organique particulaire qui a tendance à devenir plus récalcitrante avec le développement des processus pédologique d'humification de ses milieux plus stabilisés.

En ce qui concerne la **SIR**, les sols produisant le plus de CO₂ sont globalement ceux des sites indirectement connectés (**TB** et **TD**). Ces sites, ne subissent plus les processus d'érosion et/ou de sédimentation mais restent connecté au fleuve par le battement de la nappe, deviennent plus anaérobies conduisant à un enrichissement en matière organique de mauvaise qualité. Le simple ajout d'une source de carbone organique facilement utilisable (labile) (méthode **SIR**) va favoriser la minéralisation de cette matière organique récalcitrante. Celui-ci peut être confirmé avec le gradient de **SIR** sur le site Petiville : le dégagement de CO₂ a tendance à augmenter quand on passe des zones d'échantillonnage proche fleuve (**P-vn**, **P-phr**, **P-saul**) aux zones les plus éloignées ou les plus stables (**P-peup** et **P-pr**).

- *Minéralisation potentielle N et DEA*

En termes de **minéralisation potentielle anaérobie de l'N**, les sols des sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) produisent plus d'N minéral que les sites connectés naturellement (**P**) ou artificiellement connectée (**GVPV**). Par contre, quand on normalise par rapport à l'N total présent dans ces sols, le **taux de minéralisation** ne suit plus ce classement. Celui-ci peut être expliqué par deux facteurs (i) la quantité et (ii) de la qualité de la matière organique présente dans ces sols. Le **taux de minéralisation** dépend de la quantité de matière organique, et donc d'azote, présente dans le sol qui est un facteur clé des processus de minéralisation car il contrôle la quantité de substrat disponible pour les microorganismes responsables de la minéralisation. En effet, les sites indirectement connectés (**TB** et **TD**) sont

ceux qui stockent le plus de matière organique. **Le taux de minéralisation** dépend aussi de la qualité de matière organique qui est généralement estimée le plus globalement par son ratio C/N qui est un indicateur qui permet de juger le degré d'évolution de la matière organique, c'est-à-dire de son aptitude à se décomposer plus ou moins rapidement dans le sol (Citeau *et al* 2008; Vallauri *et al* 2002). Selon Berbiers *et al* (1989) plus celui-ci est élevé, moins la décomposition est importante.

En conditions **aérobies**, nous avons noté que la production d'N minéral est nettement inférieure à celle obtenue dans des conditions **anaérobies** sauf pour la **P-vn**. Nous avons aussi constaté un gradient **de minéralisation aérobie d'N** sur les sites de **Petiville** et **Trou Deshaye** : la minéralisation a tendance à diminuer quand on passe des zones d'échantillonnage les plus fréquemment inondées aux zones les moins fréquemment inondées (plus stable). Cela peut être expliqué par les voies de transformation d'N quand on passe des zones d'échantillonnage les plus engorgées en eau aux zones les plus stables. Dans les sols provenant des zones d'échantillonnage les plus fréquemment inondées, comme le montre la figure 2.5 la forme majoritaire d'azote est l'ammonium NH_4^+ . En conditions aérobies, l' NH_4^+ se transforme en nitrate NO_3^- par nitrification. Dans les sols provenant des zones d'échantillonnage les plus stables, la forme minérale majoritaire est le NO_3^- (Fig. 2.5) qui peut être utilisé par la biomasse microbienne (immobilisation) ou subir le processus de dénitrification.

Les sols caractérisés par les plus fortes capacités potentielles de dénitrification (**DEA**) correspondent, dans le site du Trou Deshaye, à une zone d'échantillonnage indirectement connectée (**TD-phal**) et à une zone déconnectée par exhaussement (**TD-prexh**). Cela s'explique par le fait que ces sols sont riches en matière organique. Contrairement aux sites directement connectés au fleuve, les sites indirectement connectés (via la nappe), ne subissent pas les inondations provoquées par les marées. Donc, ne sont pas en renouvellement et au contraire se stabilisent et s'enrichissent en matière organique. La dénitrification dépend également de deux autres facteurs (**i**) l'oxygène et (**ii**) la quantité de nitrates (substrat). Selon Pinay *et al* (1995), la quantité de nitrate dans le sol est étroitement couplée à la dynamique des matières organiques du sol. Ainsi, Lu *et al* (2009) montrent que la matière organique facilite l'assimilation de nitrate par les microorganismes dénitrifiant. Dans notre cas, il est par ailleurs intéressant de noter que le sol de la prairie exondée n'a pas perdu ses capacités à dénitrifier malgré son positionnement derrière les digues. Il est probable que la texture

limoneuse fine de ce sol permette, en climat normand, le maintien de conditions favorables à ce processus.

Il semble que les mesures fonctionnelles *ex situ* puissent être des indicateurs potentiels pour différencier les sols des zones humides en fonction du gradient de connexion avec la Seine à conditions de les combiner à des mesures fonctionnelles *in situ*.

Conclusion

Les écosystèmes estuariens répondent aux aménagements par un comportement souvent non linéaire et imprévisible. L'hypothèse de départ selon laquelle les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale de l'estuaire de Seine sont fortement dégradés et, corrélativement, que les fonctions écologiques prospectées sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve n'est pas validée. En effet, ce travail démontre que :

- Sur l'ensemble des 7 sites prospectés représentatifs d'un gradient de connexion au fleuve et sur la base des descripteurs pédologiques morphologiques et physico-chimique habituels, les sols identifiés sont majoritairement des sols typiques d'une plaine d'inondation de grand fleuve. Il s'agit de REDUCTISOLS fluviqes carbonatés et, dans une moindre proportion de FLUVIOSOLS carbonatés. Seule l'apparition de quelques ANTHROPOSOLS n'est pas caractéristique d'une plaine alluviale mais leur existence est ici en cohérence avec le degré d'anthropisation de l'estuaire de Seine.
- Si la variabilité des conditions créées par le régime de perturbation (crue) et de contraintes (marées) dans le site de référence directement connectés à la Seine permet l'expression des fonctions écologiques habituellement attribuées aux écotones rivulaires, ces fonctions ont aussi été mesurées sur la base des descripteurs de fonctionnement *in situ* dans des sites indirectement connectés au fleuve.
- Sur le site de référence, les fonctions de dénitrification et de stockage du C existent dans les zones les plus éloignées de la Seine et les plus exhausées du site par opposition aux zones les plus proches de la Seine et les plus inondées qui dénitrifient moins et possèdent des taux de minéralisation du C importants.
- Dans les sites situés derrière les digues et seulement connectés à la Seine par la nappe, on constate que l'élimination du régime de perturbation lié aux crues favorise un régime de contraintes liée aux fluctuations du niveau de la nappe. Si ces sites

correspondent à des dépressions (niveau topographique bas), ils sont plus favorables au stockage de C. Si ces sites présentent des gradients topographiques, ils peuvent être favorables au stockage de C mais aussi à la dénitrification.

Chapitre 3

A comparison of permanent and fluctuating flooding on microbial properties in an ex-situ estuarine riparian system.

C. Mchergui¹, L. Besaury², E. Langlois¹, M. Aubert¹, M. Akpa-Vinceslas¹, B. Buatois³, L. Quillet², F. Bureau¹.

¹ Normandie Univ, UR, ECODIV-EA 1293, Fédération de Recherche SCALE-FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

² Normandie Univ, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA 4312, Université de Rouen, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

³CEFE 1919, route de Mende, sur le campus du CNRS, 34293 Montpellier 5.

Cet article est accepté à *Applied Soil Ecology*.



Jardin Expérimentale (Photo : C. Mchergui 2012)

1. Introduction

Within natural floodplains, flood disturbances are one of the major events that control ecosystem development and functioning (Amoros and Petts, 1993). In fluvial riparian zones, flood disturbances strongly influence carbon (C), and nitrogen (N) cycling pathways by changes in microbial community structure of floodplain soils (Mitsch and Gosselink, 2000). Natural flood disturbance regimes in estuarine zones included occasional flooding (floods) and daily water level fluctuations related to tide. The effects of flood disturbances in fluvial systems have been widely studied over the last three decades (Bornette et al., 2008; Duffour and Piégay, 2010; Müller, 1998), but few authors have examined the effects flood disturbances on soil functioning in an estuarine environment.

The functioning of riparian soils is largely determined by hydrological connectivity and exchange processes between a river and its floodplains (Hohensinner et al., 2007). Nevertheless, human activities such as navigation and associated managements (e.g., embankments and channelization) greatly interfere with the natural flooding regime of riparian zones along rivers. In fluvial riparian zones, several studies have reported that flood disturbance regime through altered frequency, duration, and intensity of flooding directly affect N removal by controlling the duration of aerobic *versus* anaerobic phases (Pinay and Decamps, 1988; Song et al., 2010). Alternate flooding-draining, which controls the nitrification/denitrification balance, can thus lead to increased N losses in riparian zones (Hernandez and Mitsch, 2007; Pinay et al., 1995; Song et al., 2010). Denitrification is one of the important processes occurring in the wetlands, which uses nitrogen oxides as alternative electron acceptors when oxygen is limited. Denitrification process is mediated by denitrifying bacteria communities under anaerobic conditions (Henry et al., 2006). Denitrifying bacteria are frequently isolated from sediment, soil and aquatic environments, and the denitrifying ability is present in many phylogenetically diverse bacterial groups (Braker et al., 2000; Rösch et al., 2002).

In estuarine riparian zones, anoxic conditions rapidly occur and enhance the production of large amounts of sulfides by sulfate-reducing bacteria that play an important role in sulfur cycling in sediment and soils (Jorgensen, 1982; Ouddane et al., 2004). Elhottová et al. (2006), Mentzer et al. (2006) and Unger et al. (2009) showed that flooding regime in riparian zones modifies the oxic/anoxic characteristics of soils, and thus affects the microbial community structure. They studied the global microbial composition and activity by using phospholipid

fatty acid (PLFA) analysis combined with enzyme activity assays. Molecular quantitative methods, such as qPCR and qRT-PCR, are particularly well suited for the quantification and study of the gene expression of sulfate-reducing and denitrifying bacteria (Besaury, 2012; Henry et al., 2006). Sulfate reduction and denitrification are not specific to any phylogenetic group (Joye and Hollibaugh, 1995; Wagner et al., 1998; Zumft, 1999). Therefore, to analyze sulfate reducer and denitrifier abundance, functional genes can be used, such as those coding for NO_2^- reductase (*nirK* and *nirS*) and N_2O reductase (*nosZ*) in the denitrification pathway (Henry et al., 2006; Kandeler et al., 2006; Scala and Kerkhof, 1999), and those coding for dissimilatory sulfite reductase (*dsrB*) and adenosine-5'-phosphosulfate reductase (*apsA*) in the sulfate reduction pathway (Leloup et al., 2005; Quillet et al., 2012).

Today, the restoration of biodiversity and its functions in human-disturbed floodplains is an important ecological topic. It is therefore necessary to better understand the influence of the disturbance regime (frequency and intensity of floods events) on the functioning of floodplain soils. Using soils from a riparian system of the Seine estuary (France), we experimentally assessed the effects of alternate flooding – draining conditions (due to daily water fluctuation related to tide) *versus* permanent floods on N removal, a microbially-mediated soil process. We measured the effects of alternate flooding-draining events on redox potential, denitrification and soil bacterial community composition, using redox electrode, acetylene inhibition and quantitative real-time PCR methods, respectively. We used the functional genes *nosZ* and *dsrB* and real-time PCR molecular techniques to analyze the abundance and activity of denitrifying and sulfate-reducing bacteria. As the frequency of disturbance is more important in the fluctuating flooding regime than in the permanent one, we hypothesize that alternate flooding-draining events will have the strongest influence on soil bacterial, functional groups abundance (denitrifying *versus* sulfate-reducing bacteria) and N removal process.

2. Materials and methods

2.1 Study site

Soils were sampled in April 2011 in the site of Petiville, near the Seine River in the North-West of France (49° 26' 08" N; 00° 35' 73" E) under a temperate oceanic climate. In the absence of dykes, the site is directly connected to the river by water flows due to the tidal regime and / or floods. The soils are typical hydric soils classified as “REDUCTISOL

fluviqve” according the “Référentiel Pédologique” (Association Française pour l'Etude du Sol AFES, 2009), also referred to as GLEYSOL fluviq (IUSS Working Group WRB, 2006). Their morphological characteristics as follows: a water-table close to the surface, a G horizon (named Go) that reflects temporarily re-oxidized conditions (corresponding to the fluctuations of the water table) and another G horizon (named Gr) that reflects permanent anaerobic conditions (corresponding to the permanent level of the water table).

Vegetation in the study site was typical of riparian zones and was composed of *Phalaris arundinacea*, willows (*Salix alba*) and poplar (*Populus sp.*) stands. Riparian vegetation distribution in the site is largely controlled by periodic flooding varying magnitude and soil properties. Therefore, vegetation and soil morphological characteristics indicate that the study site is still active and directly connected to the Seine River.

2.2 Soil sampling

Three soil sampling sites were taken (0-10 cm depth) along a landscape gradient perpendicular to the Seine River at the commune of Petiville in the North-West of France (49° 26' 08' N; 00° 35' 73" E). At each site, three replicate were taken. The sites were selected based on elevation and distance from the river channel, with each soil type having distinct geomorphical properties found under varying depths, frequency and duration of flooding, and vegetation. Soils were sampled to a 10 cm depth by using metal spade. The samples were passed through a 5-mm mesh sieve, homogenized and stored at 5 °C.

The three soils classified by the French system were: (1) Mudflat (Reductisol fluviqve from mudflat in the intertidal zone), (2) Salix (Reductisol fluviqve in the high-frequency flooding zone < 30 m from the channel), and (3) Populus (Reductisol fluviqve under, low-frequency flooding within the riparian zone, > 100 m from the channel). Each soil had distinct soil properties as shown in Table 3.1. For the following soil properties, organic carbon, total nitrogen, cation exchange capacity (CEC), total iron and clay contents all increased in the following order: Mudflat < Salix < Populus. Populus had the highest organic matter and clay content and visibly the most aggregated, which can be attributed to greater in litter inputs from the forest stand and reduced erosion by flood events.

Table 3.1. Physico-chemical properties of the soils used in this experiment. Symbols indicate the methods used in physico-chemical analyses.

Soil	Horizon (AFES, 2009)	Depth (cm)	pH [†]	C Org	Total N	C/N	CaCO ₃	CEC	Ca	Mg	K	Na	P ₂ O ₅	Clay	Silt	Sand
				(g/kg) [‡]	(g/kg) [‡]		(g/kg) [§]	(cmol+/kg) [¶]	(g/kg) [#]	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)				
Mudflat soil	Maca	0-20	8.23	14.8	1.23	12.3	287	7.91	11	1.01	0.252	0.237	0.17	114	591	295
Salix soil	Js ca	0-5	8.2	20.4	1.73	11.8	294	14.2	16	1.49	0.22	0.207	0.177	202	702	96
	Goca1	5-50	8.21	17.1	1.55	11	310	13.7	16	1.31	0.159	0.315	0.257	221	663	116
	Goca2	50-95	8.18	20.2	1.7	11.9	293	14.9	17.3	1.31	0.148	0.363	0.333	233	668	99
	Grca	95-120	7.85	18.4	1.5	12.2	299	11.7	16.5	1.33	0.205	0.289	0.234	208	629	163
Populus soil	Aca	0-20	7.85	63.3	5.73	11	258	33.6	42.8	2.68	0.49	0.356	0.354	352	570	78
	Agca	20-40	8.26	15.6	1.52	10.3	277	17	18.9	1.27	0.282	0.236	0.131	259	622	119
	Goca1	40-80	8.37	5.8	0.719	8.29	306	14.3	16.8	1.18	0.278	0.203	0.056	299	609	92
	Goca2	80-140	8.52	3.42	0.462	6.8	321	7.95	11.4	0.75	0.167	0.151	0.035	179	612	209
	Grca	140-170	8.31	9.7	0.579	16.2	286	7.35	11.3	0.709	0.235	0.134	0.026	210	485	305

(†) pH H₂O (1:2.5 soil/deionized water); (‡) Organic carbon (after decarbonation) and total nitrogen were measured by CHN elementary analysis; (§) Determination of total calcium carbonate (CaCO₃) by NF ISO 10693 method; (¶) Determination of cationic exchange capacity and exchangeable cations (Ca, Mg, K, Na) by cobaltihexamine chloride method; (#) Determination of phosphorus soluble with Joret-Hébert method (AFNOR, 1993).

2.3 Experimental design

The experiment was conducted outdoors at the ECODIV laboratory of the Normandie University, Rouen (France) under similar climatic conditions as the sampling site. The experimental design of the mesocosm study was a 3 X 3 factorial of three soil types (Mudflat, Salix, and Populus) and three flooding conditions as follows:

- (1) Control no flood water added (**C**),
- (2) Daily alternating of 12 hrs flooding and 12 hrs draining (**DD**),
- (3) Permanently flooded (**PF**).

These treatment intervals were based on flood durations typically found on the Seine River floodplain (Programme scientifique Seine-Aval, 2010). For the flooding treatments 6 cm of water above the soil was maintained by adding water as needed. Deionized water used for the flooding and was assumed that it would be chemically in equilibrium with soil solution after 3 days.

The treatments were carried out in a mesocosm study. Approximately 2,500 g of field moist soil were placed in polyethylene pots (24 cm diameter at the top and 20 cm diameter at the bottom X 32 cm depth) which resulted in a 17-cm deep soil profile. The bottom of the pot was constructed of polypropylene geotextile (PAILLAGE HORS-SOL TISSE, Interma-Celloplast, Mayenne, France). These pots were placed in a larger pot (32 cm diameter at the top and 22 cm at the bottom X 42 cm depth) which had solid and non-draining bottoms to create an ex-situ mesocosm. The mesocosms were destructively sampled at 3, 7, or 14 days. After each sampling period the mesocosms were taken out and allowed to drain for about 12 hours and subjected to destructive sampling.

2.4 Soil functioning

Three replicates of each treatment were sampled on days 0, 3, 7 and 14. Just before destruction of soil samples, redox potential measurements (Eh in mV) were made 5-cm deep in the soil profile, using a Pt 5900 redox electrode. An aliquot of each soil was then used after 0, 3, 7 and 14 days of incubation for soil analysis (NH_4^+ -N and NO_3^- -N) and soil water content measurements (gravimetric moisture measurements). All analyses were completed as quickly as possible and within no more than 6 days after sample collection. In the laboratory, a sub-sample (~30 g) of each soil was oven-dried at 105°C for 48 hrs to determine moisture content. For mineral N (NO_3^- -N and NH_4^+ -N) measurements, a sub-sample of 20 g of fresh soil from each soil sample was extracted with 100 ml of 0,5 M K_2SO_4 and analyzed by flow injection (Anderson and Ingram, 1993).

Soil cores were taken after 0, 3, 7 and 14 days of incubation for denitrification rate measurements that were conducted using the acetylene inhibition technique (Yoshinari et al., 1977). Long intact cores (2-cm diameter * 15 cm, approximately 30 g) were taken into serum bottles and sealed with rubber stoppers crimped with aluminium caps. The cores were equilibrated in the bottles at 25°C for a short time, then amended with 20 mL of acetylene, then incubated for an additional 2 hrs. All incubations were done on the day the cores were taken (Yoshinari et al., 1977). At the end of incubation, a 5-mL gas sample was taken from the head space and injected into a Shimadzu gas chromatograph (Varian 3400, Middelburg, Netherlands) equipped with an Electron Capture Detector. Nitrous oxide was quantified with external standards made with pure bottled N₂O (N45, Air Liquide, France). Denitrification rates were calculated as the rates of nitrous oxide (N₂O) accumulation in the head space over a 2 hr time period.

2.5 Soil bacterial community

After incubation periods of 0, 3, 7 and 14 days, 2 grams of soil were sampled for microbial measurements. The samples were frozen at -80 °C for further RNA/DNA extraction, cDNA synthesis and PCR quantification of 16S rRNA, *dsrB*, *nosZ* genes.

RNA/DNA extraction and cDNA synthesis

Total nucleic acids were extracted from sediments using the RNA® powersoil kit (Mobio, France) according to the manufacturer's protocol. This extraction combines a chemical and mechanical lysis. DNA and RNA were then separated and purified using All Prep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, France) based on the manufacturer's protocol. All extracts were aliquoted and stored at -80 °C until further processing. Quantification of extracted DNA was carried out after comparison of the amounts of DNA with those from the Smart Ladder DNA standard (Eurogentec, France). Images of the gels were analyzed with the software Quantum-Capt from the Quantum- ST4 image acquisition system (Vilber Louma, Deutschland). Total RNA was then digested using TurboDNase (Ambion, France). DNase treated RNA (0.5 µg) was reverse-transcribed using a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, France) with MultiScribe™ Reverse Transcriptase and random primers. RT products were used immediately for PCR amplifications, and synthesized cDNAs were stored at -20 °C. Possible DNA contamination of the RNA extracts was checked by PCR amplification of RNA aliquots without the reverse transcription step. No DNA was detected in these controls.

Quantitative real-time PCR of the 16S rDNA, dsrB, nosZ genes and their corresponding cDNAs

16S rRNA, *nosZ* and *dsrB* genes were quantified using real-time PCR (Chromo4 detection system, BIORAD, France) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega). 16S rRNA genes were quantified using 63F primers: 5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (Marchesi et al., 1998) and BU16S4: 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3' (derived from 341 F, (Muyzer et al., 1993)) to amplify a 314-bp DNA fragment, as described by Plassart et al. (2008). The PCR reaction was carried out as follows: an initial denaturation step (10 min at 95°C), 40 cycles of denaturation (40 sec at 95°C), annealing (45 sec at 64°C) and elongation (30 sec at 72°C), and a final extension step (7 min at 72°C).

dsr2060F: 5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3' (Geets et al., 2006) and *dsr4R*: 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3' (Wagner et al., 1998) primers were used to quantify the *dsrB* gene, as described by Foti et al. (2007). The PCR reaction was carried out as follows: an initial denaturation step (10 min at 95°C), 40 cycles of denaturation (40 sec at 95°C), annealing (40 sec at 55°C) and elongation (1 min at 72°C), and a final extension step (7 min at 72°C). The expected size was 380 bp. *nosZF2*: 5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSST-3' and *nosZR2*: 5'-CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3' (Henry et al., 2006) primers were used to quantify the *nosZ* gene. PCR conditions were as follows: pre-cycling of 5 min at 94°C, 8 cycles of 94°C denaturation for 30 sec, 63°C annealing for 30 sec, 72°C extension for 30 sec and 80°C for 18 sec, and then 35 cycles with an annealing temperature of 57°C.

Melting curve analyses were completed between 60°C and 100°C to determine whether there was a detectable primer-dimer contribution to the SYBR I Green fluorescence measurements. The procedures were performed in triplicate. Gene abundance results are expressed as number of cells *per* gram of sediment (fresh weight basis). Calculations were made taking into account that each sulfate-reducing prokaryotes (SRP) and denitrifying bacterium contains one copy of the *dsrB* and *nosZ* genes, respectively (Henry et al., 2006; Klein et al., 2001), and that the average number of 16S rDNA gene copies *per* cell is 3.6 (Klappenbach et al., 2001).

2.6 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using Statistica 6.1 (Statsoft) with 95% confidence intervals. All the results are the means of three replicates (n=3). The standard errors of the means were calculated and were used to estimate the variability of each parameter in the study sites and at the different dates. The normal distribution of the model

residues (Shapiro-Wilk test) and the homoscedasticity of variance (Bartlett test) were checked. We used analysis of variance (MANOVA) to test for flood duration effect (0, 3, 7 and 14 days), treatment effect (C, DD and PF) and soil effect (Mudflat soil, Salix soil, and Populus soil). Principal component analysis (PCA) was used as exploratory data analysis to reduce dimensionality in the data and to examine the associations in the microbial communities. Pearson correlation coefficients were calculated to determine the relationships among soil physic-chemical parameters and soil bacterial community characteristics. PCA and Pearson correlation coefficients were conducted using R version 2.10 (R Development Core Team. 2010. R: a language and environment for statistical computing).

3. Results

3.1 Effect of flooding - draining events on soil functioning

Effect on soil redox potential

Redox potential differed among soils, treatments, and flood durations (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 3.2). In the Mudflat soil, redox potential remained negative in all treatments, except in C soil where it rose from -150 mV at the beginning to $\sim +200$ mV at the end (Fig. 3.1.A). In the Salix soil, redox potential remained suboxic in C soil, while it decreased rapidly to -80 and -120 in DD and PF soils, respectively (Fig. 3.1.B). For the Populus soil, redox potential decreased slowly over flooding conditions to approximately +50 mV and -50 mV in DD and PF soils, respectively after 14 days' flooding (Fig. 3.1.C). Redox potential exhibited a significant difference along DD and PF soils in all soils, except in Salix soil (Table 3.4).

Effect on soil nitrogen changes

Available $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ contents differed among soils, treatments, and flood durations (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 3.2). In the C Mudflat soil, available $\text{NH}_4\text{-N}$ decreased after 14 days without any flood regime up to 10-fold less than the starting concentration ($\sim 25 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil), while it changed little over flooding conditions (e.g., DD and PF soils) (Fig. 3.2.A1). For available $\text{NO}_3\text{-N}$, values rose up 5-fold more than the starting concentration in C soils while it changed little over flooding conditions (Fig. 3.2.A1). In the Salix soil, the initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ ($\sim 0 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) rose rapidly to ~ 2 and $3 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil at the end in DD and PF soils, respectively while it did not differ

significantly after 14 days of flood duration in C soils (Fig. 3.2.B). Conversely, initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ ($\sim 4 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) decreased in all treatments except in C where it did not differ significantly after 14 days of flood duration (Fig. 3.2.B1). The Populus soil responds in a similar way to that Salix soil for flooding conditions. The initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ $\sim 0 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil increased to ~ 3 , and $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil in DD and PF soils, respectively at the end (Fig. 3.2.C). Conversely, initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ $\sim 15 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil decreased in all treatments except in C soils where it increase to approximately $\sim 50 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil after 14 days of flood duration (Fig. 3.2.C1). In all soils, flooding conditions did not induced any significant difference of ammonium content among DD and PF soils while, in the Populus soil, the nitrate content exhibited significant differences among DD and PF soils (Table 3.4).

Effect on soil denitrification rates

Denitrification rates did not differ among soils, treatments and flood durations (MANOVA, P -value > 0.05). But there was a significant interaction between soil and date (MANOVA, P -value < 0.05). The interaction between soil and treatment was also significant (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 3.2). In the Mudflat soil, $\text{N-N}_2\text{O}$ emission decreased from $\sim 0.03 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} at the beginning to approximately 0.01 and $0.007 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} in DD and PF soils, respectively at the end. For C soils, it increase significantly to approximately $0.04 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} after 7 days' of flood duration, and then decreased to $0.004 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} at the end (Fig. 3.3.A). In the Salix soil, the initial $\text{N-N}_2\text{O}$ emission $\sim 0.005 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} rose rapidly to approximately 0.05 and $0.02 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} in DD and PF soils, respectively, after 3 days' flooding, and then decreased to approximately 0.01 and $0.005 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil hr^{-1}

Figure 3.1. Effects of frequent changes in flooding - draining conditions on mean redox potentials in (A) Mudflat soil, (B) Salix soil, (C) Populus soil (C) over 14 days' incubation in the experimental mesocosms: C, DD, and PF correspond to the various treatments (mean \pm SEM, n=3).

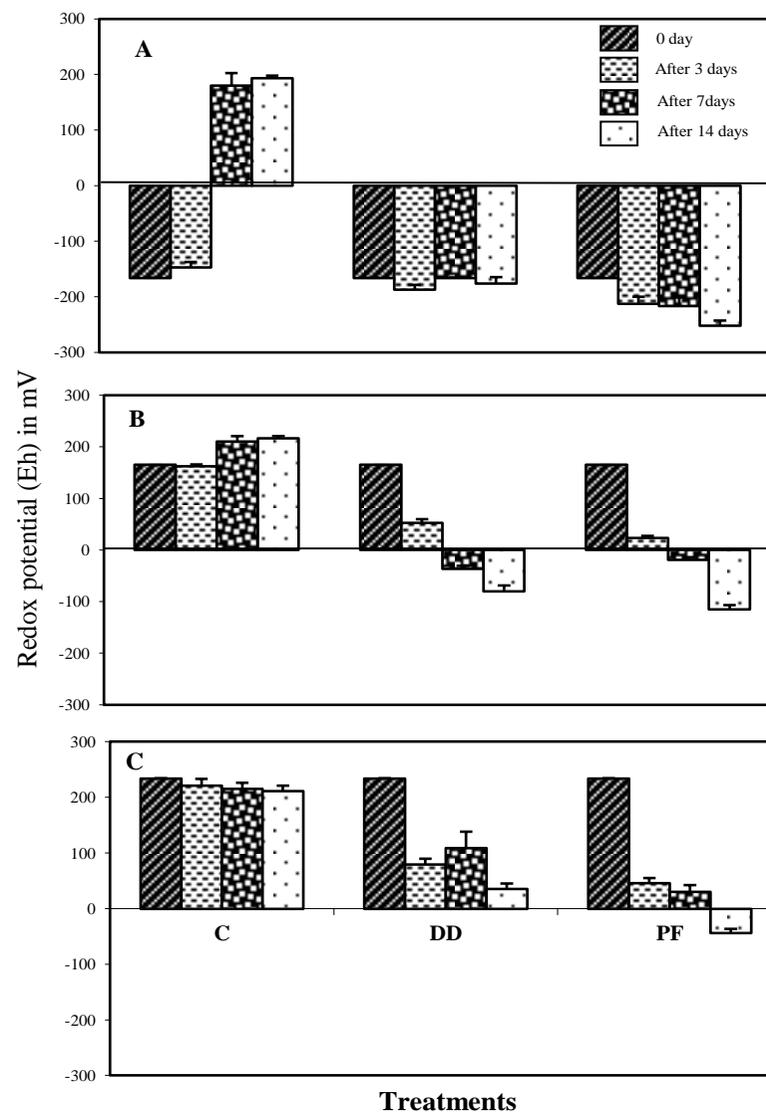


Figure 3.2. Changes in inorganic nitrogen as influenced by frequent changes in flooding – draining conditions over 14 days' incubation in the experimental mesocosms: C, DD, and PF correspond to the various treatments. Patterns of ammonium concentrations (A, B, and C) and nitrate concentrations (A1, B1 and C1) respectively measured in the Mudflat, Salix and Populus soils.

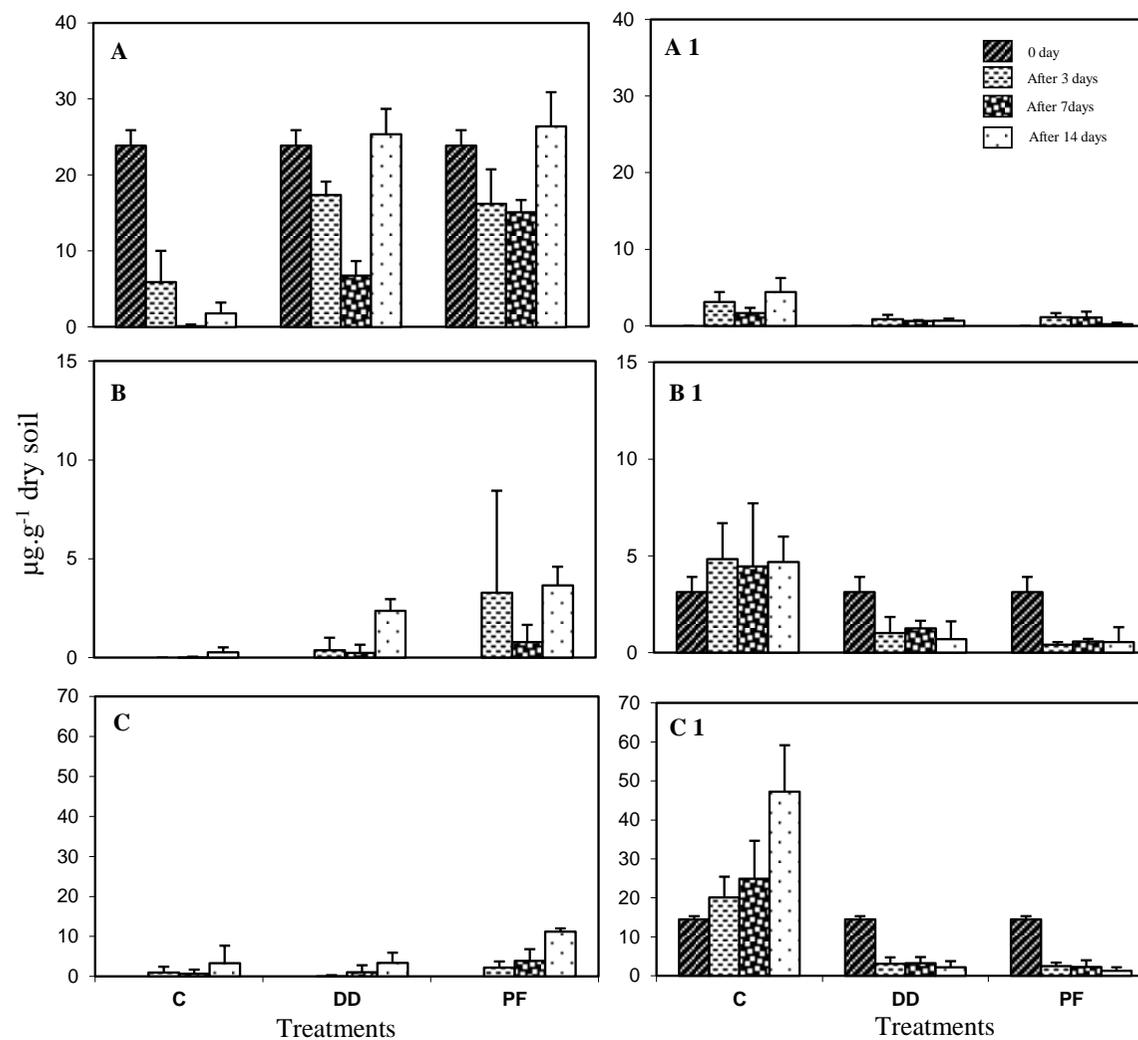
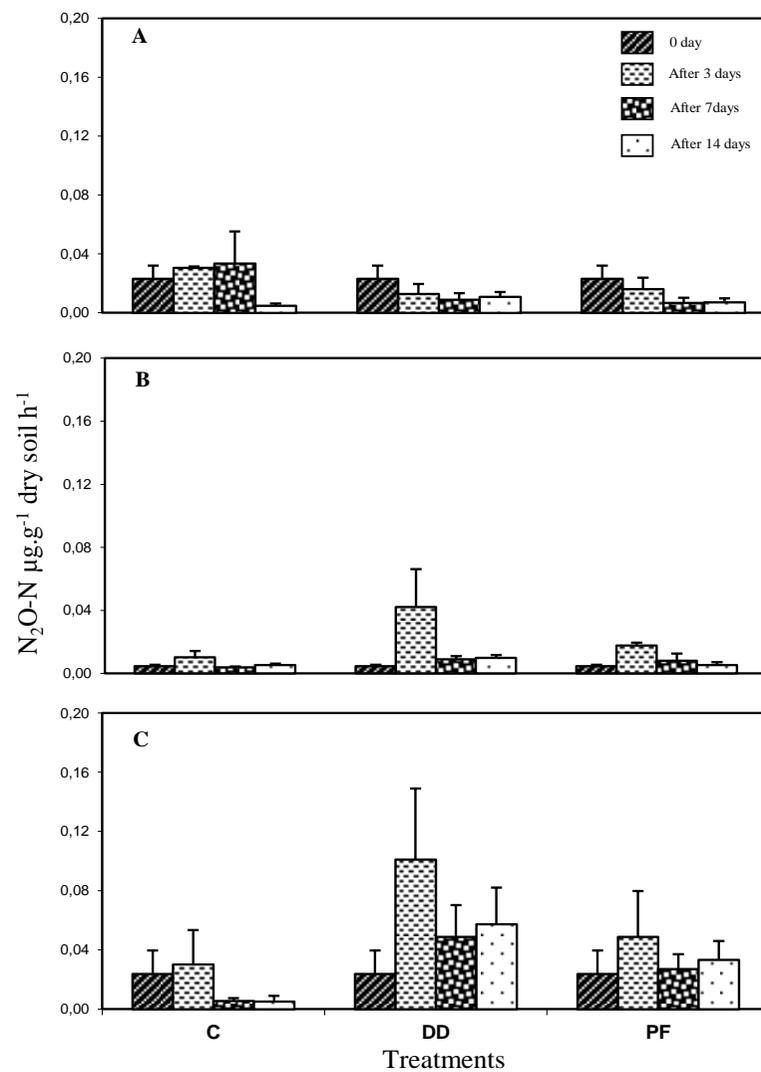


Figure 3.3. Denitrification rates in (A) Mudflat soil, (B) Salix soil, and (C) Populus soil in C, DD, and PF between 0 and 14 days of incubation (mean \pm SEM, n=3).



at the end. For C soils, it did not differ significantly throughout the whole flood duration (Fig. 3.3.B). In the Populus soil, under flooding conditions, the initial N-N₂O emission $\sim 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} rose rapidly to approximately 0.1 and $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} in DD and PF, respectively, after 3 days' flooding, and then decreased to approximately 0.05 and $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} after 14 days' flooding. Conversely, for C soils, it decreased to $0.005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil hr^{-1} in the end (Fig. 3.3.C). Among all soils, only the Populus soil exhibited significant difference in denitrification rates among DD and PF soils (Table 3.4).

3.2 Effect of flooding - draining events on bacterial community

Based on the quantification of the 16S rDNA, *nosZ* and *dsrB* genes done by qPCR, the denitrifying bacteria were the least represented in all treatments (Fig. 3.4.A1, B1 and C1). Indeed, based on the number of those different genes per genome, the minimum and maximum abundance values for the total bacterial cells *per* gram of soil were respectively 10^8 and $15 \cdot 10^8$; the minimum and maximum abundance were $3 \cdot 10^6$ and $15 \cdot 10^6$ denitrifying bacteria *per* gram of soil. The minimum and maximum abundance values for the sulfate-reducing bacteria cells *per* gram of soil $1.2 \cdot 10^7$ and $7.7 \cdot 10^7$. Maximum abundance values for denitrifying bacteria and for sulfate-reducing bacteria were found in the Mudflat soil.

Total RNA was only extracted from samples taken on days 0 and 14 (at the minimum and maximum redox potential values) and for DD and PF soils due to difficulties inherent in RNA extraction (Fig. 3.5). Potential activity was higher for total bacteria compared to denitrifying bacteria and finally sulfate-reducing bacteria. The potential activity of total bacteria differed between PF and DD soils in the Mudflat and the Populus soil but was similar in the Salix soil (Fig. 3.5). Overall, PF and DD soils had no impact on the potential activity of total bacteria, denitrifying bacteria and sulfate-reducing bacteria in the Salix soil. At the beginning, the potential activity of sulfate-reducing bacteria was the greatest in the Mudflat soil, *i.e.* more than 2- and 4-fold greater than the activity measured in the Salix and Populus soils, respectively. After 14 days' flooding, the potential activity of sulfate-reducing bacteria measured under DD soils in the Mudflat soil was more than 2 times greater than in PF soils (Fig. 3.5.A2). Moreover, in the end, the potential activity of denitrifying bacteria measured under DD soils in the Populus soil was the greatest, *i.e.* more than 8- and 40-fold greater than the amounts measured in the Mudflat and Salix soils, respectively (Fig. 3.5.A1, B1 and C1). These results are confirmed by the soil bacterial abundance and activity profiles in DD and PF

soils (Fig. 3.6). There is a significant difference between both treatments (Table 3.3), but the most prominent was in Populus soil. Indeed, in the end, DD was characterized by a high relative abundance of the *nosZ* gene and *nosZ* RNA transcripts characteristics of denitrifying bacteria.

A Principal Component Analysis of bacterial community density and activity revealed the effects of flood treatment. PC1 (Fig. 3.6) accounted for 40% of the variance and PC2 (Fig. 3.6) for 30%. Soil samples separated into groups. The PC1 axis revealed temporal changes in the bacterial community: in the beginning, bacterial abundance was located in the positive part of the PC1 axis, while after 14 days' flooding bacterial abundance in the Mudflat soil (DD and PF) and the Populus soil (DD) were located in the negative part of the PC1 axis. Separation along the PC1 axis was due to flood duration and correlatively redox potential, while separation along the PC2 axis was due to soil type. Bacterial abundance profiles showed clear differences among the soils used in this experiment. These differences were obvious principally along the second ordination axis of the PCA between the Mudflat and Populus soils (Fig. 3.6). The Mudflat soil was characterized by a high relative abundance of the *dsrB* gene characteristic of sulfate-reducing bacteria. In the Populus soil, molecular analyses of the three selected genes on day 14 showed similarity between PF soils and soil analysis on day 0. Conversely, along the first ordination axis of the PCA, the difference between DD and PF was obvious. The bacterial abundance profiles showed a clear difference between DD and PF along the first axis. DD (Populus soil) was characterized by a high relative abundance of the *nosZ* gene characteristic of denitrifying bacteria.

Figure 3.4. qPCR quantification of total bacteria (A, B, C), denitrifying bacteria (A1, B1, C1) and sulfate-reducing bacteria (A2, B2, C2) under different treatments (C, DD, and PF) over 14 days' incubation (mean \pm SEM, n=3) in three different soils (Mudflat soil (A, A1, A2), Salix soil (B, B1, B2) and Populus soil (C, C1, C2)).

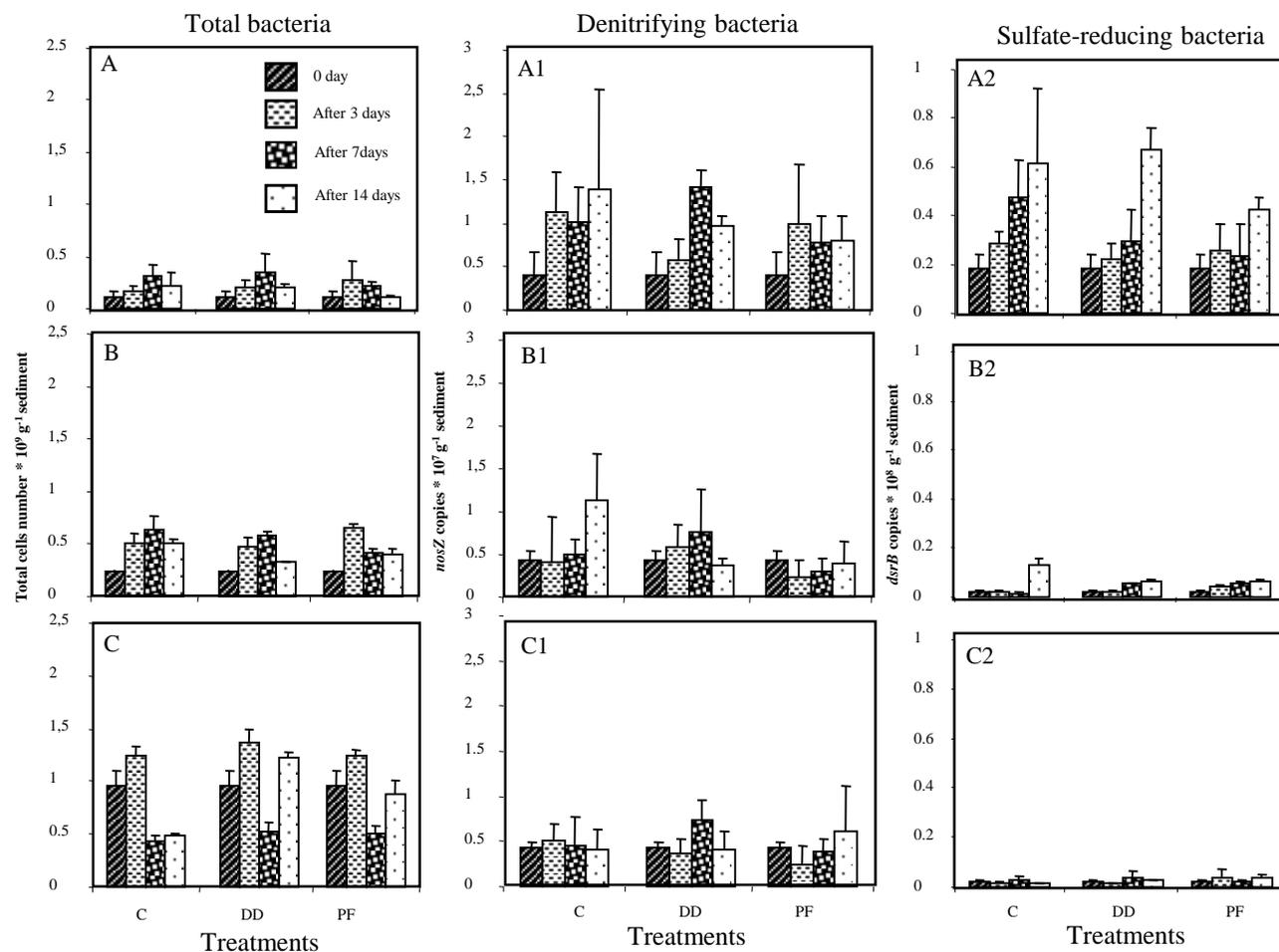


Figure 3.5. Quantification of 16S rRNA (A, B, C), *nosZ* mRNA (A1, B1, C1) and *dsrB* mRNA (A2, B2, C2) with fluctuation events (DD and PF) between 0 and 14 days' incubation (mean \pm SEM, n=3) in three different soils (Mudflat soil (A, A1, A2), Salix soil (B, B1, B2) and Populus soil (C, C1, C2)).

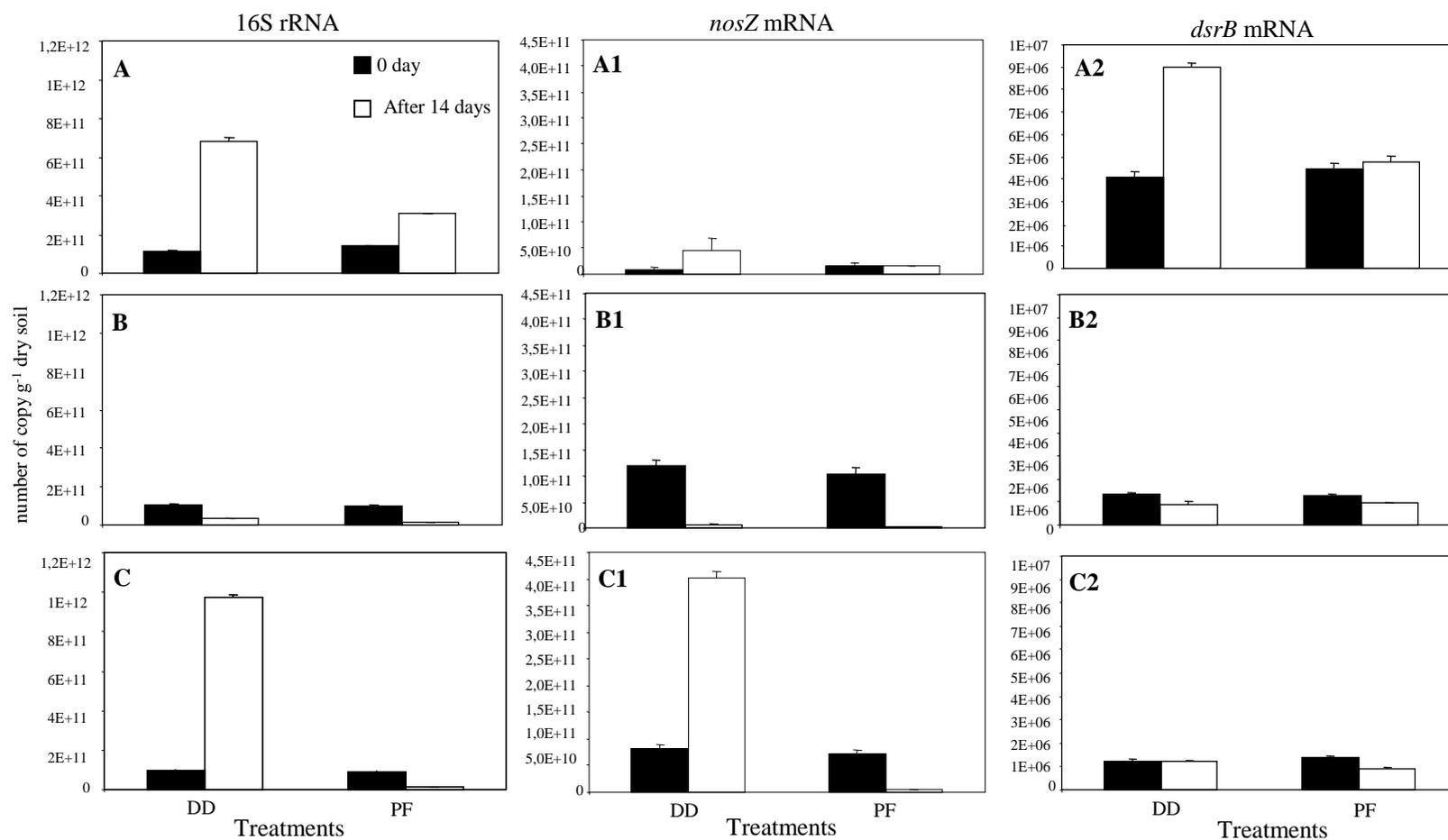


Figure 3.6. Principal component analysis carried out on the matrix of different bacterial community density and activity, representing 70% of the variability. Variables are (i) 16S *rDNA* abundance and activity (total bacteria), *dsrB* mRNA (sulfate-reducing bacteria) and *nosZ* mRNA (denitrifying bacteria) genes, (ii) 16S rRNA, *dsrB* mRNA and *nosZ* mRNA abundance between day 0 (black) and day 14 (white) of incubation in three soils (Mudflat soil, Salix soil and Populus soil): (a) eigenvalue diagram; (b) site ordination and (c) Coding for sites and treatments. PCA axis 1 accounts for 40% of the variation and axis 2 accounts for 18%.

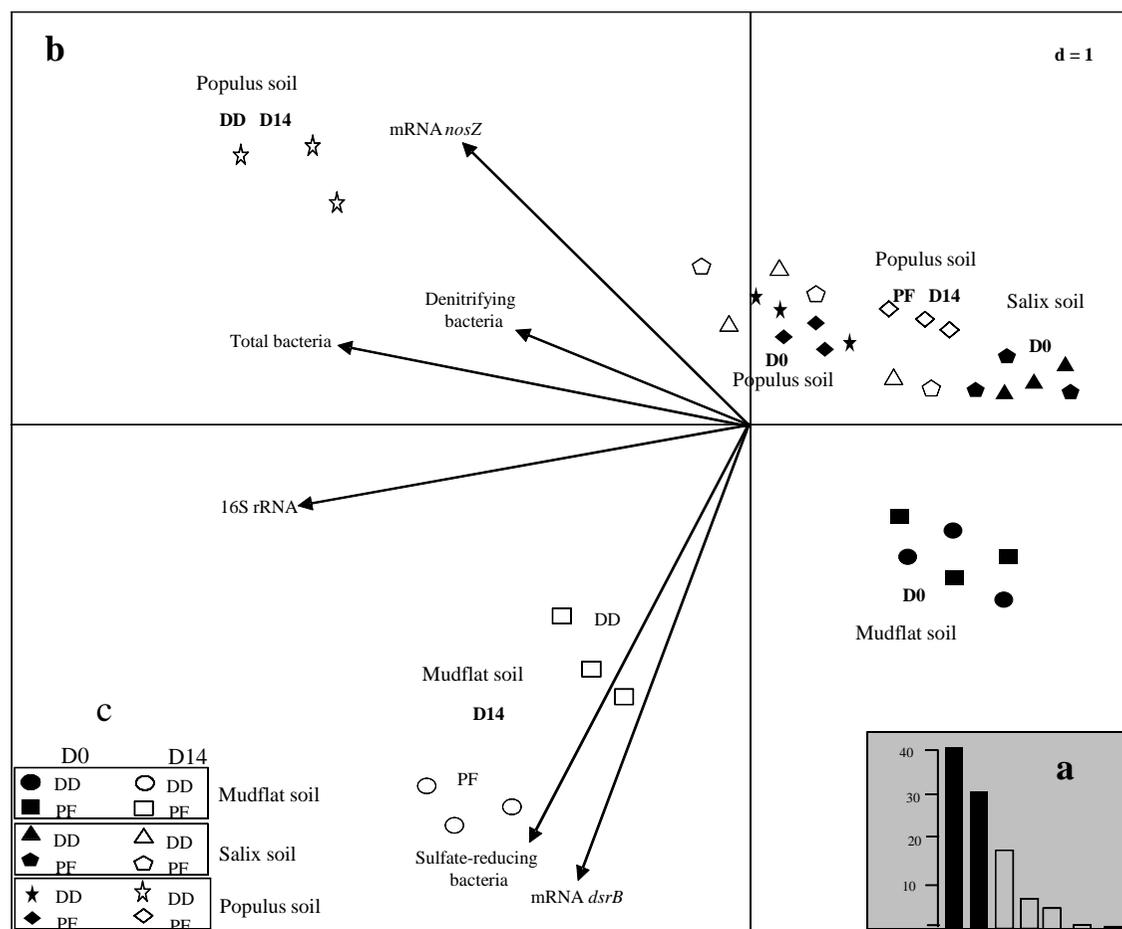


Table 3.2. F-values and significance of ANOVA testing the effects of soil type, flood duration, and treatments (C, DD, and PF) on ecological functioning and bacterial community composition.

Treatment	DF	<i>F values</i>						
		Eh	NH ₄ -N content	NO ₃ -N content	Denitrification	Total bacteria	Denitrifying bacteria	SRB
Soils Type (soil)	2	35000***	37.3***	26.7***	2.961	33.05***	16.99***	43.2***
Flood duration (Date)	3	1927***	9.6***	8***	3.039	1.95	2.46	85.8***
Treatments (Trt)	2	20300***	78.1***	167.1***	0.308	1.47	1.16	2.2
Soil * Date	6	2253***	191.3***	82***	9.268***	3.1**	5.84***	121.9***
Soil * trt	4	463***	10.7***	64.5***	2.913*	0.26	0.57	2.2
Date * trt	6	3569***	10.4***	22.7***	1.328	0.38	2.39*	2.2
Soil * Date * trt	12	415***	20.1***	29.2***	2.186	1.91*	3.85***	10.1***

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

Table 3.3. F-values and significance of ANOVA testing the effects of soil type, flood duration, and treatments (C, DD, and PF) on bacterial community activity.

Treatment	DF	<i>F values</i>		
		16S rRNA	nosZ mRNA	dsrB mRNA
Soils Type (soil)	2	1586***	734.1***	5208***
Flood duration (Date)	1	3199***	11.8*	247***
Treatments (Trt)	1	3057***	713.7***	318***
Soil * Date	2	1470***	662.3***	523***
Soil * trt	2	1114***	594***	254***
Date * trt	1	3089***	667.8***	363***
Soil * Date * trt	2	1115***	582.7***	284***

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

Table 3.4. Summary of statistically significant effects of flooding time (0, 3, 7, 14 days), flooding conditions (DD and PF treatments), and their interactions (NS = *P*-value > 0.1).

Parameter	Treatment	Eh	NO ₃ -N content	NH ₄ -N content	Denitrification	Denitrifying bacteria	SRB
Mudflat soil	Flood duration (Date)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.03	0.006
	Treatments (Trt)	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS
	Date * trt	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS
Salix soil	Flood duration (Date)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.02
	Treatments (Trt)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Date * trt	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	0.01
Populus soil	Flood duration (Date)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS
	Treatments (Trt)	<0.001	0.007	NS	0.02	NS	NS
	Date * trt	<0.001	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	NS

Figure 3.7. Correlation matrix (Pearson) of the PCA performed on soil physicochemical parameters and different bacterial community density. Values in bold are significantly different from 0 at *P*<0.05. *Eh* soil redox potential, *N-NH₄* ammonium content, *N-NO₃* nitrate content, *nosZ* gene encoding Nitrous Oxide Reductase (denitrifying bacteria), and *dsrB* gene encoding dissimilatory Sulfite Reductase (sulfate-reducing bacteria).

Eh						
N-NH ₄	-0.35 ***					
N-NO ₃	0.26 **	-0.29 **				
N-N ₂ O	0.22 *	-0.12	-0.09			
nosZ	-0.13	-0.08	-0.08	-0.15		
dsrB	-0.53 ***	-0.02	0.08	-0.09	0.28 **	
	Eh	N-NH ₄	N-NO ₃	N-N ₂ O	nosZ	dsrB

Pearson method

*, **, *** & † = *P* = 0.05, 0.01, 0.001 and 0.10 respectively

4. Discussion

4.1 Effect of frequent changes in flooding - draining conditions on N removal

In Salix and Populus soils, after 3 days' flooding, soil denitrification rate measured in DD soils was more than 2-fold higher than in PF soils. The potential activity of denitrifying bacteria in DD soils in the Salix and Populus soils are linked with the soil redox potentials and NO₃-N concentration observed. Indeed, the soil redox potential was higher in DD soils than in PF soils, likely due to the effect of alternate flooding - draining events on the oxygenation status of the soils. Thus, draining conditions creates a more aerobic soil profile, increases rates of NO₃-N production through nitrification. Pinay et al. (2002) report that draining periods are important since they allow for nitrification and contribute to soil fertility by providing another inorganic nitrogen source (ammonia and nitrate). Therefore, flooding conditions can cause a rapid increase of denitrifying bacteria numbers and in nitrogen cycling processes, resulting in a higher denitrification process. Other studies have shown similar responses (Busnardo et al., 1992; Reddy and Patrick, 1975; Song et al., 2010; Tanner et al., 1999). Reddy and Patrick (1975) found that increased frequency of flooding - draining events had a greater effect on N removal through denitrification. They reported that N removal were below 37.2% of total N in short-term cycles of 6-hr alternate flooding - draining conditions, followed by 32.1, 24.9 and 25.7% for 12-hr, 24-hr and 48-hr alternate flooding - draining cycles, respectively. Song et al. (2010) also observed an increase of N removal with the frequency flooding - draining events. They reported that the magnitude of flooding conditions effect on the denitrification rate ranked as follows: inundated > reflooding > saturated > drying.

Flooding conditions can lead to the onset of anoxia in PF conditions. As flood events last longer, the potential for anaerobiosis increases and thus the potential for anaerobic nutrient cycling processes, namely ammonification, which would explain the high values of ammonium-nitrogen content in the Mudflat soil, and in PF conditions in the Salix and Populus soils. This observation is in agreement with the study of Pinay et al. (1995) who reported that flood frequency and duration may drive soil nitrogen dynamics. They showed that in quasi-permanent waterlogged conditions, organic nitrogen is only mineralized into ammonium.

Using Pearson method, we found that denitrification rates were not correlated with nitrate content. However, redox potential appears to be a major factor influencing both N dynamics and denitrification process with the positive correlation observed between Eh and both nitrate content and denitrification rates (Fig. 3.7).

N removal changed in response to the different treatments in each soil type. For instance, after two weeks' flooding, soil denitrification rate was greater in the Populus soil than in the Salix and Mudflat soils. The slowly decrease of redox potential was considered responsible for this difference. In the Populus soil, redox potentials measured after 14 days flooding correspond to the maximum for the denitrification pathway. In addition to slowly decrease of redox potential, two other factors may have contributed to the high denitrification rate observed in the Populus soil during flooding conditions, i.e. organic C and clay content. Indeed, soils used in our experiment had different textures and organic C contents (Table 3.1). Clay and organic carbon increased from the intertidal zone (mudflat soil) to the low-frequency flooded zone (Populus soil). The high values of denitrification in the Populus soil in comparison with the Mudflat soil is probably in relation with the high C organic content (63 g/kg) (Table 3.1) likely to be a source of dissolved organic C that is known as an important controlling factor in the denitrification process (Lu et al., 2009). Rapid leaching of nutrients from this organic matter can result in an initial pulse of C, N, and P following flood events. Therefore, the pulse of nutrients and readily bioavailable carbon can cause a rapid increase in microbial activity and N removal through denitrification processes. They also reported that adding a carbon source (glucose) could remarkably improve the nitrate removal rate through denitrification. They demonstrated that denitrification could increase from 20 % to more than 50% in summer and from 10% to 30% in winter.

The texture of soils had the greatest impact on the denitrification process. Fine texture (clay and fine silt) contents increased from the Mudflat soil (~71%) to the Populus soil (~93%) (Table 3.1). For instance, clay develops large surface areas per unit of weight or volume, which provide greater chemical adsorption sites and microbial habitats. Below a threshold of ~70% silt and clay, soils do not show any significant denitrification. Above that threshold, denitrification increases rapidly. This finding is in agreement with the study of Pinay et al. (2002) who demonstrated that below a threshold of ~65% silt and clay, floodplain soils do not show any significant denitrification.

4.2 Effect of frequent changes in flooding - draining events on the bacterial community

Our results confirm that the frequency of alternate flooding - draining events had the greatest impact on the activity of the soil bacterial community. Sulfate-reducing bacteria were highly active in the Mudflat soil under alternate flooding - draining conditions; indeed, Mudflat soils are considered as reservoirs of sulfate-reducing bacteria (Quillet et al., 2012). Concerning denitrifying bacteria, they were highly active under DD conditions in the Populus soil. The potential activity of sulfate-reducing and denitrifying bacteria in the Mudflat and Populus soils are linked with the redox potentials observed. Indeed, redox potentials in the mudflats were always close to -150 mV, i.e. the maximum value for the sulfate-reduction pathway. Conversely, the redox potentials in the Populus soil slowly decreased down to values that correspond to the maximum for the denitrification pathway. These results are confirmed by the high denitrification rates found in the Populus soil as opposed to the low values found in the Mudflat soil.

5. Conclusions

The results show that increasing the frequency of alternate flooding – draining events increased N loss through denitrification in our mesocosms. This change in denitrification was induced by the response of the denitrifying bacterial community composition to alternate flooding – draining events (in the Populus soil), whereas it remained low for the Mudflat soil. Our results highlight the prevailing importance of soil physic-chemical properties over denitrifying bacterial community composition or quantity on the denitrification rate.

Human activities in the floodplains alongside rivers have resulted in drastic deviations from their natural status over time. When a dyke is built, river flooding frequency is often reduced. Improving our knowledge about the ecological consequences of anthropogenic

changes of water regimes on nitrogen cycling in riparian zones brings about several new scientific challenges. These challenges relate the possibilities of restoration and rehabilitation of degraded riparian ecosystems. Indeed, the relatively high denitrification rate observed in the DD (daily drained) mesocosm suggests that there is a potential for restoring riparian $\text{NO}_3\text{-N}$ removal functions in degraded floodplains by restoring hydrology systems. We can reconnect riparian zones to streams, either by restoring subsurface flow or by creating wetlands. Restoring or creating sinks is considered as a more promising approach to reduce $\text{NO}_3\text{-N}$.

Investigating how microbial community diversity is modified according to the different flooding regimes using new sequencing techniques such as pyrosequencing could also be of great interest.

Acknowledgements

We would like to thank the Platform for Chemical Analysis in Ecology of the “SFR 119 Montpellier Environnement Biodiversité”, at the “Centre d’Écologie Fonctionnelle et Évolutive CNRS, Montpellier, France). We are also grateful to Philippe Delporte and Vincent Guiot for help with field sampling and laboratory analyses and Ludovic Henneron for statistical analyses. Financial support for this research was provided by the REBEBAS (SA IV 2008) project funded by the “Groupement d’Intérêts Public Seine Aval” (GIP Seine-Aval). We would also like to thank Mounia Ahmed for language editing. The authors also thank the anonymous reviewers for their helpful comments on the paper.

Chapitre 4

Ex-situ experimental assessment of effects of flood duration on riparian soils characterized by a river-floodplain connectivity gradient: implications for the restoration of soil N removal function in human-impacted floodplains.

C. Mchergui¹, L. Besaury², E. Langlois¹, M. Aubert¹, M. Akpa-Vinceslas¹, B. Buatois³, L. Quillet², F. Bureau¹.

¹ Normandie Univ, UR, ECODIV-EA 1293, Fédération de Recherche SCALE-FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

² Normandie Univ, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA 4312, Université de Rouen, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

³CEFE 1919, route de Mende, sur le campus du CNRS, 34293 Montpellier 5.

Cet article est en préparation pour *Applied Soil Ecology*.

1. Introduction

The restoration of biodiversity and its functions in human-disturbed wetlands is an important ecological topic. Exploitation of the large rivers by humans over the centuries has resulted in a drastic deviation from its natural status (Even et al., 2007). Hydrological connectivity between the river channel and its floodplain (Amoros and Petts, 1993) is recognized as a central key for the natural functioning of riparian ecosystems (Pinay and Decamps, 1988). Following the building of dykes, the hydrological connectivity of riparian zones is often importantly modified (Trémolières and Schnitzler, 2007). The lateral

hydrological connectivity is known to influence vegetation dynamics (Allen, 2007; Bornette et al., 2008; Duffour and Piégay, 2010; Miller, 1998; Shafroth et al., 2002) and macroinvertebrate communities (Paillex et al., 2009). Changing the connectivity between the river channel and its floodplain after dykes construction is particularly drastic in macrotidal estuaries where riparian zones are subject to occasional flooding (due to floods) and to daily water level fluctuations (due to tidal regimes). However, few authors have examined the role of river-floodplain connectivity on riparian soils functioning.

Flood disturbances regime strongly influence the pathways of C, and N cycling by inducing changes in the microbial properties of floodplain soils (Amoros and Petts, 1993; Mitsch and Gosselink, 2002). In fluvial systems, several studies have shown that changes in the flooding conditions, through alterations of the frequency, duration, period of occurrence, and intensity of water levels, directly affect N removal in riparian soils by including changes in the microbial structure of the flooded soils (Hernandez and Mitsch, 2007; Song et al., 2010; Unger et al., 2009). Mitsch and Gosselink (2002) report flooding duration and frequency influence soil biochemistry and constitute the key factor in the ultimate selection of microbial communities. Denitrification is an important soil function affected by flooding regimes (Pinay et al., 1995; Song et al., 2010). It is a respiratory process in which oxidized nitrogen compounds are used as alternative electron acceptors for energy production when oxygen is limited (Pinay and Decamps, 1988). Reddy and Patrick (1975) report that denitrification takes place when a deficiency in oxygen causes certain bacteria to use nitrate instead of oxygen as an electron acceptor for respiration. The community structure of denitrifying bacteria has been reported to be linked to the denitrification process rate (Cavigelli and Robertson, 2001).

With the loss of soil oxygen, anaerobic microorganisms could become dominant in permanently or seasonally flooded soils (e.g., hydromorphic soils). This results in reduced forms of oxygen, nitrogen, manganese, iron and then sulfur in such soils. The physiological implications of fluctuations in oxygen availability for bacterial communities have rarely been studied in hydromorphic soils in function of river-floodplain connectivity. However, the frequency of redox potential changes may have a strong effect on community development and an analogous function to the effects of flood duration events on soil microbial community structure and activity (Pett-Ridge et al., 2006). Additionally, Elhottová et al. (2006) and Mentzer et al. (2006) report that flooding regimes may alter the specific composition of microbial communities by selecting for microbes that can survive rapid changes in soil redox

potentials. They studied global microbial composition and activity by using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis combined with enzyme activity assays. Quantitative molecular methods such as qPCR and qRT-PCR are particularly well suited for quantifying and studying the expression of specific environmental microorganisms such as denitrifying and sulfate-reducing bacteria, which are hardly cultivable (Besaury et al., 2012; Geets et al., 2007; Quillet et al., 2012; Zhang and Fang, 2006). Sulfate reduction and denitrification are not specific to any one phylogenetic group (Wagner et al., 1998; Zumft, 1999). Therefore, to analyze sulfate reducer and denitrifier abundance, functional genes can be used, such as those coding for NO_2^- reductase (*nirK* and *nirS*) and N_2O reductase (*nosZ*) in the denitrification pathway (Henry et al., 2006; Kandeler et al., 2006), and those coding for dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) and adenosine-5'-phosphosulfate reductase (*apsA*) in the sulfate reduction pathway (Leloup et al., 2005; Quillet et al., 2012).

Human activities, especially embankments, interfere with the natural flooding regime of the floodplains that alongside rivers such as the Seine River. Based on the degree of connectivity, we can currently distinguish 3 categories of riparian ecosystems alongside the Seine river: (i) ecosystems directly connected to the river by water flows due to the tidal regime and/or floods, (ii) ecosystems indirectly connected by groundwater table fluctuations (sites located behind embankments, in a low topographic position), and (iii) disconnected ecosystems (sites located behind dykes, in a high topographic position). Using soils from the Seine fluvial estuary, characterized by a gradient of hydrological connectivity to the river channel we experimentally assessed the effects of flood duration on N removal microbially-mediated, and we discussed the implications for the restoration of this function in soils within human-impacted floodplains. We hypothesized that the flooding conditions we tested would not improve the expression level of the denitrification process or the microbial community structure in soils directly or indirectly connected to the Seine river; indeed, these soils are usually subject to a flooding regime that allows for the expression of this ecological function. In contrast, we hypothesized that the expression level of the denitrification process would decrease as a result of changes in the microbial community structure in disconnected soils; indeed, these soils are not usually subject to disturbance regimes that favor the expression of microorganisms usually found in waterlogged soils.

2. Materials and methods

2.1 Study site

The study sites were located in the Seine fluvial estuary in the North-West of France (49° 26' 08" N; 00° 35' 73" E) (Fig. 4.1.A) under a temperate oceanic climate. Four study sites were selected based on the river-floodplain connectivity gradient (Fig. 4.1.B). We distinguish 4 types of soil:

- (i) **Mineral soil directly connected to the Seine river** by water flows due to the tidal regime and/or floods at Petiville (high-frequency floods, near the channel, < 30 m from the river channel), named **High connected soil**: a typical hydromorphic mineral soil classified as “REDUCTISOL fluviq ue carbonaté” according to the “Référentiel Pédologique 2008” (AFES, 2009) (also referred to as Fluvic Gleysol; WRB, 2006), characterized by hydromorphic features in the top 5 cm, a Go horizon that reflects temporarily re-oxidized conditions (corresponding to the fluctuations of the water table) and a Gr horizon that reflects permanent anaerobic conditions (corresponding to the permanent level of the water table).
- (ii) **Mineral soil indirectly connected to the Seine river** by groundwater table fluctuations at Trou Buquet (non-flooded because the site is located behind a dyke, < 100 m from the river channel), named **Low connected mineral soil**: a typical hydromorphic soil classified as “REDUCTISOL fluviq ue carbonaté humifère” according to the “Référentiel Pédologique 2008” (AFES, 2009) (also referred to as Fluvic Gleysol; WRB, 2006), characterized by hydromorphic features in the top 10 cm, a Go horizon and a Gr horizon.
- (iii) **Mineral soil disconnected from the Seine river** at Trou Deshay e (non-flooded because the site is located behind a dyke, in a high topographic position, > 100 m from the river channel), named **Disconnected soil**: a typical hydromorphic mineral soil classified as “REDUCTISOL/FLUVIOSOL carbonaté” according to the “Référentiel Pédologique 2008” (AFES, 2009) (also referred to as Fluvic Gleysol; WRB, 2006), characterized by hydromorphic features beyond a 25-cm depth, a Go horizon and a Gr horizon.
- (iv) **Organic soil indirectly connected to the Seine river** by groundwater table fluctuations at Yville (non-flooded because the site is located behind a dyke, > 800 m from the river channel), named **Low connected organic soil**: a hydromorphic organic soil classified as “HISTOSOL interstratifié” according to the “Référentiel Pédologique 2008” (AFES, 2009) (also referred to as Fluvic Gleysol; WRB, 2006). “HISTOSOL interstratifié”, mainly composed of organic soil material but the soil

profile is composed of a histic H horizon on its surface (H horizon with 25% organic carbon in weight within a 40-cm depth), a thin layer of mineral G horizon in its middle (with 11-13% organic carbon, 56-60 % clay content within a 20-cm depth) and a deep histic H horizon (30% organic carbon in weight, 60-cm deep).

All these soils remain potentially flooded during exceptional floods.

2.2 Soil sampling

0-10 cm soil layer was sampled from each study site. In the laboratory, the soil samples were sieved through a 5-mm mesh to remove stones, woody debris and plant roots. The homogenized soil samples were stored at +5 °C no more than 5 days prior to mesocosm construction. Their physico-chemical parameters appeared to be directly related to their degree of connectivity (Table 4.1):

- (i) **High connected soil** is characterized by a low organic carbon content (OC) of 20.4 g/kg, a low total N content of 1.73 g/kg, a “silt + clay” content of 71.1 percent and a pH of 8.23 in its topsoil.
- (ii) **Low connected mineral soil** is characterized by a high organic carbon content (OC) of 109 g/kg, a high total N content of 8.61 g/kg, a maximum “silt + clay” content (~96.6 percent) and a pH of 7.94 in its topsoil.
- (iii) **Disconnected soil** is characterized by a low organic carbon content (OC) of 42.7 g/kg, a low total N content of 4.2 g/kg, a “silt + clay” content of 86 percent, and a pH of 8.02 in its topsoil.
- (iv) **Low connected organic soil** is characterized by a maximum organic carbon content (OC) of 354 g/kg, a maximum total N content of ~20.3 g/Kg, and a pH of 6.16 in its topsoil.

Figure 4.1. (A) Geographical situation of the study sites along the Seine River, and (B) Scheme/Diagram of the River-Floodplain connectivity scale and location of our study sites.

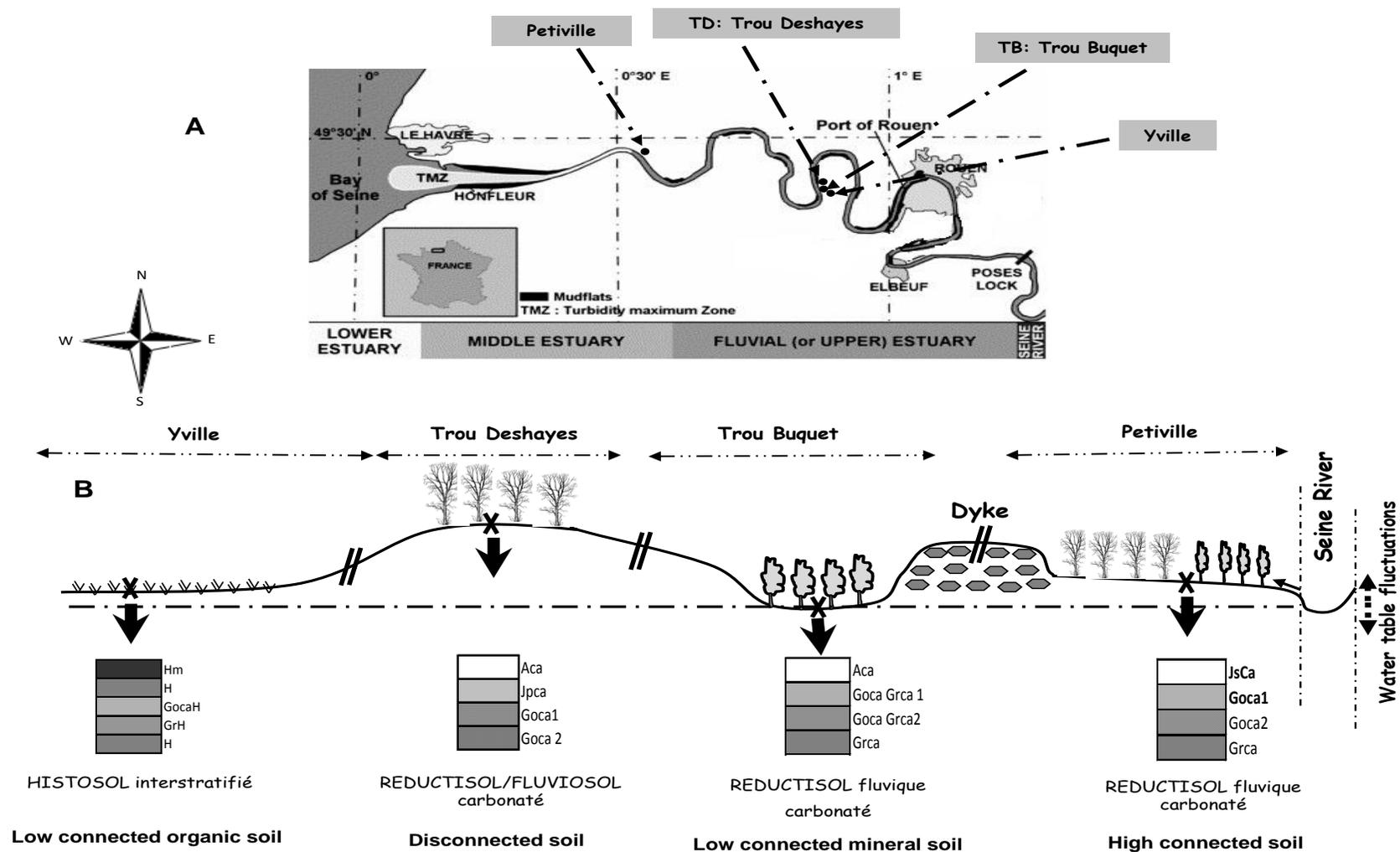


Table 4.1. Properties of the soil profiles used in the 4 study site.

Sites	Soil type (PR, 2008)	connectivity gradient	Horizon	Hydromorphic feature	Depth (cm)	pH ^a	Corg ^b (g/kg)	Total N ^b (g/kg)	C/N	CaCO ₃ ^c (g/kg)	CEC ^d (cmol+/kg)	Ca ^d (cmol+/kg)	Mg ^d (cmol+/kg)	K ^d (cmol+/kg)	Na ^d (cmol+/kg)	Clay ^e (g/kg)	Silt ^e (g/kg)	Sand ^e (g/kg)
Petiville	REDUCTISOL fluviq carbonaté	High connected	Js ca	5 cm	0 – 5	8,2	20,4	1,73	11,8	294	14,2	16	1,49	0,22	0,207	202	702	96
			Goca1		5 – 50	8,2	17,1	1,55	11	310	13,7	16	1,31	0,159	0,315	221	663	116
			Goca2		50 – 95	8,2	20,2	1,7	11,8	293	14,9	17,3	1,31	0,148	0,363	233	668	99
			Grca		95 – 120	7,9	18,4	1,5	12,2	299	11,7	16,5	1,33	0,205	0,289	208	629	163
TB	REDUCTISOL fluviq carbonaté	Low connected	Aca	10 cm	0 – 10	7,9	109	8,61	12,6	292	51,9	60	3,03	0,614	0,371	402	564	34
			GocaGrca		10 – 75	8,3	29,8	1,43	20,8	298	14,7	17	1,01	0,302	0,163	194	680	126
			GocaGrca		75 – 100	8,2	28,5	1,26	22,7	234	14,2	16,6	0,825	0,205	0,157	121	623	256
			Grca		120 – 160	8,4	8,32	0,328	25,4	231	5,48	7,77	0,379	0,154	0,0901	85	806	109
TD	REDUCTISOL/FLUVIOSOL carbonaté	Disconnected	Aca	25 cm	0 – 18	8	42,7	4,2	10,2	225	26,2	26,8	1,08	0,205	0,0946	235	581	184
			Jpca		18 – 25	8,3	25,9	2,63	9,84	246	21,4	22,8	0,594	0,145	0,0879	231	672	97
			Goca1		25 – 70	8,5	11,4	1,18	9,69	299	16	17,5	0,407	0,126	0,0878	221	713	66
			Goca2		70 – 105	8,6	8,39	0,813	10,3	333	16,6	17,9	0,529	0,157	0,103	248	692	60
Yville	HISTOSOL interstratifié	Low connected	H	40 cm	0-20	6,4	251	16,7	15	1,3	98,6	103	1,97	0,161	0,124	nd	nd	nd
			H		20-40	6,7	243	15,2	16	<1	92,1	98,4	0,896	0,0573	0,0705	nd	nd	nd
			Go cah		40-50	7,9	135	12,8	10,5	45,7	77,5	85,1	0,951	0,215	0,172	560	382	58
			Gr h		50-60	6,9	114	9,4	12,2	<1	69,7	74,2	1,14	0,318	0,149	661	335	4
			H		60-100	5,7	303	21,8	13,9	1,3	96,5	119	1,59	0,121	0,224	nd	nd	nd

(a) pH H₂O (1:2.5 soil/deionized water); (b) Organic carbon and total nitrogen were measured by CHN elementary analysis; (c) Determination of total calcium carbonate (CaCO₃) by the NF ISO 10693 method; (d) Determination of the cationic exchange capacity and exchangeable cations (Ca, Mg, K, Na) by the cobaltihexamine chloride method; (e) determination of the granulometric composition by the Robinson pipette method.

2.3 Experimental design

The experiment was conducted outdoors at the ECODIV laboratory (latitude 49° 27' 47" N; longitude 1° 05' 18" E) at *Normandie University*, Rouen (France) under similar climatic conditions as in the sampling sites. Wet homogenized soils, sieved to 5 mm, were placed in cylindrical mesocosms (32x24x20 cm polyethylene containers), to generate a 17-cm deep soil profile. Approximately 2,500 g of wet (fresh) soil were used in each mesocosm. Each soil profile was exposed for 3, 7 and 14 day to flooding. These flood durations were chosen taking into account the data provided by a study of representative flood times in the Seine River floodplain (GIP, Seine-Aval 2010). Throughout the experiment, the water used to flood the different soils of the mesocosms was deionised water. If deionised water appears to be less appropriate than stream water to simulate real field conditions, we assumed that the deionised water is balanced with soils conditions after 3 days of equilibration for the first measurement. During the flooded periods, the table water was kept 6 cm above the soil surface. Evaporation was compensated for by regularly adding deionised water. The experimental design consisted of three different treatments in triplicate, with four soil types (4 soils × 3 treatments × 3 replicates × 4 dates): (i) the first treatment consisted of the Control soil (**C**) in which no water or nitrate was added, in the second treatment (ii) soils were Permanently Flooded (**PF**) but not amended with nitrate (this treatment will be called **PF** after, for Permanently Flooded), and in the third treatment (iii) soils were Permanently Flooded and Amended with a 50 mg/L nitrate solution obtained by adding KNO₃ to deionised water. That nitrate concentration is similar to the concentration in the Seine water (GIP, Seine-Aval 2009). This treatment is called **PFA** thereafter, for Permanently Flooded Amended.

2.4 Soil functioning

Three replicates of each treatment were sampled on 0, 3, 7 and 14 days' flooding. Just before destructive soil sampling, redox potential measurements (Eh in mV) were made 5-cm deep in the soil profile, using a Pt 5900 redox electrode. An aliquot of each soil was then used after 0, 3, 7 and 14 days' flooding for soil analysis (NH₄⁺-N and NO₃⁻-N) and soil water content measurements (gravimetric moisture measurements). All analyses were completed as quickly as possible and within no more than 6 days after sample collection. In the laboratory, a sub-sample (~30 g) of each soil was oven-dried at 105°C for 48 hrs to determine moisture content. For mineral N (NH₄⁺-N and NO₃⁻-N) measurements, a sub-sample of 20 g of fresh

soil from each soil sample was extracted with 100 ml of 0,5 M K₂SO₄ and analyzed by flow injection (Anderson and Ingram, 1993).

Denitrification rate measurements after 0, 3, 7 and 14 days' flooding were conducted using the acetylene inhibition technique (Yoshinari et al., 1977). Long intact cores (2-cm in diameter * 15 cm, approximately 30 g) were taken into serum bottles and sealed with rubber stoppers topped with aluminium caps. The cores were incubated and amended at 25°C for 2 hrs with 20 mL of acetylene to bring the soil atmosphere pressure to 10 KPa (10% V/V). All incubations were performed on the day the cores were taken (Yoshinari et al., 1977). Denitrification rates were calculated as the rates of nitrous oxide N₂O accumulation in the head space over a two-hour time period. At the end of the incubation period, a 5-mL gas sample was taken from the head space and injected into a Shimadzu gas chromatograph Varian 3400, Middelburg, Netherlands equipped with an Electron Capture Detector. Nitrous oxide was quantified with external standards made with pure N₂O in bottles (N45, Air Liquide, France).

2.5 Soil bacterial community structure

After 0, 3, 7 and 14 days' flooding, 2 g of soil were sampled for microbial measurements. These samples were frozen at -80 °C for further RNA/DNA extraction, cDNA synthesis and PCR quantification of the 16S rRNA, *dsrB* and *nosZ* genes.

DNA extraction

DNA was extracted from soils using the DNA® powersoil kit (Mobio, France) according to the manufacturer's protocol. All extracts were aliquoted and stored at -20 °C until further processing. Quantification of extracted DNA was carried out after comparison of the amounts of DNA with those from the Smart Ladder DNA standard (Eurogentec, France). Images of the gels were analyzed with the software Quantum-Capt from the QuantumST4 image acquisition system (Vilber Louma, Deutschland). Quantification of extracted DNA was carried out after comparison of the amounts of DNA with those from the Smart Ladder DNA standard (Eurogentec, France). Images of the gels were analyzed with the software Quantum-Capt from the QuantumST4 image acquisition system (Vilber Louma, Deutschland).

Quantitative real-time PCR targeted to the 16S rDNA, dsrB, and nosZ genes

Quantification of the *16S rDNA*, *dsrB*, and *nosZ* genes was carried out by real-time PCR (Chromo4 detection system, BIORAD, France) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Total bacterial quantification was performed using the primers 63F: 5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (Marchesi et al., 1998) and BU16S4: 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3' (derived from 341 F, Muyzer et al. (1993)) to amplify a 314-bp DNA fragment, as described by (Plassart et al., 2008). The PCR was carried out as follows: an initial denaturation step (10 min at 95°C), 40 cycles of denaturation (40 sec at 95°C), annealing (45 sec at 64°C) and elongation (30 sec at 72°C), and a final extension step (7 min at 72°C). The *dsr2060F*: 5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3' (Geets et al., 2006) and *dsr4R*: 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3' (Wagner et al., 1998) primers were used to quantify the *dsrB* gene, as described by Foti et al. (2007). The PCR was carried out as follows: an initial denaturation step (10 min at 95°C), 40 cycles of denaturation (40 sec at 95°C), annealing (40 sec at 55°C) and elongation (1 min at 72°C), and a final extension step (7 min at 72°C). The expected size was 380 bp. The *nosZF2*: 5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT-3' and *nosZR2*: 5'-CAKRTGCAKSGCARTGGCAGAA-3' (Henry et al., 2006) primers were used to quantify the *nosZ* gene. PCR conditions were as follows: a 5 min pre-cycling step at 94°C, 8 cycles composed of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 63°C for 30 sec, extension at 72°C for 30 sec, and 80°C for 18 sec, and then 35 cycles with an annealing temperature of 57°C. Melting curve analyses were completed between 60°C and 100°C to determine whether there was a detectable primer-dimer contribution to the SYBR I Green fluorescence measurement. The quantifications were performed in triplicate. The results are expressed as numbers of cells per gram of soil (fresh weight basis). Calculations were carried out taking into account that each sulfate-reducing bacteria SRB and denitrifying bacteria contains one copy of the *dsrB* and *nosZ* genes, respectively (Henry et al., 2006; Klein et al., 2001), and that the average number of *16S rDNA* gene copies per cell is 3.6 (Klappenbach et al., 2001).

Based on the fact that 3.6 copies of the *16S rDNA* gene are encountered per cell, one copy of the *dsrB* gene per sulfate-reducing bacteria (SRB) (Besaury et al., 2012) and one copy of the *nosZ* gene per denitrifying bacteria (Henry et al., 2006), total bacterial, sulfate-reducing bacterial (SRB) and denitrifying bacterial abundance was calculated. Denitrifying bacteria/total bacteria and sulfate-reducing bacteria/total bacteria ratios were calculated and compared. QPCR were realised with DNA extracts samples diluted at 1/2, 1/5, 1/10 and 1/50. No changes were observed for the quantification whatever the dilution used showing the absence of inhibitors in the DNA extracts samples. The efficiency of the qPCR ranged

between 93% and 98% for the three different genes. The standards for *nosZ* and *dsrB* were obtained by cloning into PGEM-t-EASY plasmid (Promega) the PCR products for those genes obtained from DNA extracted from *Pseudomonas stutzeri* and *Desulfovibrio piezophilus* C1TLV30 respectively. The 16SrDNA amplicon for the 16SrDNA was obtained from the SRB strain.

2.6 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Statistica 6.1, with 95% confidence intervals. All the results are the means of three replicates ($n=3$). The standard errors of the means were calculated and were used to estimate the variability of each parameter in the study sites and at the different dates. The normal distribution of the model residues (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Bartlett test) were checked. We used analysis of variance (MANOVA) to test for flood duration (0, 3, 7 and 14 days), treatment effect (C, PF and PFA) and degree of connectivity effect (High connected soil, Low connected mineral soil, Low connected organic soil, and Disconnected soil). Pearson correlation coefficients were calculated to determine the relationship among soil physico-chemical parameters and soil bacterial community characteristics using R version 2.10 (R development Core Team. 2010. R: a language and environment computing).

3. Results

3.1 Effect of flooding duration on soil functioning

Effect on the soil redox potential

Soil redox potentials differed among soils, treatments, and flood durations (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 4.2). In the High connected soil, initial soil redox potentials were above 250 mV but decreased rapidly to approximately +100 and +75 mV after 14 days' flooding in PF and PFA conditions, respectively while the values changed little after 14 days of flood duration in C soils (Fig. 4.2A). In all three treatments, the soils remained suboxic over the whole flood duration.

In the Low mineral connected soil, initial redox potential was approximately 175 mV. They decreased rapidly to approximately -100 and -80 mV after 14 days' flooding in PF and PFA conditions, respectively while it did not differ significantly after 14 days of flood duration in C soils (Fig. 4.2B). The soil redox potential remained positive throughout the whole flooding period.

In the Disconnected soil, initial redox potential was below 350 mV. In both PF and PFA conditions, it decreased throughout the flooding period but remained positive (approximately +100 mV after 14 days' flooding) (Fig. 4.2C). Conversely, in C soils, initial redox potential decreased rapidly down to +200 mV after 3 days (due to the impact of rainfalls), followed by a sharp increase up to approximately +375 mV after 14 days.

The same trend was observed in the Low organic connected soil (Fig. 4.2D). Initial redox potential was below 250 mV decreased rapidly down to approximately -50 after 14 days' flooding in PF and PFA conditions while it did not differ significantly after 14 days of flood duration in C soil (Fig. 4.2D). Soil redox potential exhibited a significant difference along C and PF conditions in all soils, except in the connected soil (Table 4.3). Finally, we were able to distinguish between two categories of soils: soils that maintained a positive redox potential throughout the experiment (such as the High connected soil and the Disconnected soil), and soils whose redox potential become negative between 3 and 7 days' flooding (the Low connected mineral soil and the Low connected organic soil).

Effect on soil nitrogen changes

Available $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$ differed according to soils and flood durations (MANOVA, P -value < 0.05), but there was no significant effect of flooding conditions (MANOVA, P -value > 0.05) (Table 4.2). In the High connected soil (Fig. 4.2A' and A''), N dynamics responded rapidly to changes in the soil aeration status. $\text{NO}_3\text{-N}$ was the major form of N, 1.5-fold more than available $\text{NH}_4\text{-N}$. The initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ (below $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) decreased to approximately 0.32 and $0 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil after 14 days in PFA and PF conditions, respectively while it did not differ significantly after 14 days of flood duration in C soils (Fig. 4.2A''). Conversely, the initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ $\sim 4 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil) decreased to $0 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil in all treatments after 14 days (Fig. 4.2A').

In the Low connected mineral soil, available $\text{NO}_3\text{-N}$ was the major form of N. Initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ $\sim 22 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil decreased rapidly to approximately 0.7, 0.2 and $0.7 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil after 14 days in C, PFA and PF, respectively (Fig. 4.3B''). The initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ $\sim 14 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil decreased to approximately 0, 3.1, and $3.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil after 14 days in C, PF and PFA, respectively (Fig. 4.3B').

In the Disconnected soil, the initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ $\sim 10 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil decreased to approximately 5.7, 1.38, and $2.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil after 14 days in C, PF and PFA, respectively (Fig. 4.3C''). The initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ $\sim 4 \mu\text{g.g}^{-1}$ dry soil

decreased to approximately 0.17, 0, and 0.16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil after 14 days in C, PF and PFA, respectively, (Fig. 4.3C').

In the Low connected organic soil, $\text{NO}_3\text{-N}$ was the major form of nitrogen, ~3-fold more than available $\text{NH}_4\text{-N}$ (Fig. 4.3D' and D''). The initial concentration of available $\text{NO}_3\text{-N}$ ~ 17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil rose rapidly to approximately 45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil after 14 days in C soils while it did not differ significantly after 14 days under flooding conditions (PF and PFA soils) (Fig. 4.3D''). In C, PF, and PFA, the initial concentration of available $\text{NH}_4\text{-N}$ was ~ 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil; it decreased to approximately 0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil after 7 days, followed by a sharp increase up to approximately ~ 7, 7, and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil after 14 days' flooding, respectively (Fig. 4.3D'). The Low connected mineral soil displayed the highest available $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration, more than ~4-, ~3-, ~2.5-fold greater than the amounts measured in the Disconnected soil, the High connected soil, and the Low connected organic soil, respectively. Additionally, the mean initial soil $\text{NO}_3\text{-N}$ content below 23 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil in the Low connected mineral soil was more than 2 / 2 / 1.5 times greater in the High connected soil / Disconnected soil / Low connected organic soil, respectively.

Effect on soil denitrification rates

Soil denitrification rates differed among soils, treatments and flood durations (MANOVA, P-value < 0.05) (Table 4.2). In the High connected soil, $\text{N-N}_2\text{O}$ emission did not differ significantly after 14 days of flood duration in all treatments (Fig. 4.3A). In the Low connected mineral soil, $\text{N-N}_2\text{O}$ emission decreased from 0.045 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil at the beginning to approximately 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil in all treatments at the end (Fig. 4.3B).

In the Disconnected soil, initial $\text{N-N}_2\text{O}$ emission ~0.005 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil rose rapidly up to approximately 0.035, and 0,045 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry soil after 7 days' flooding in PF, and PFA soils,

Figure 4.2. Changes in redox potential values and inorganic nitrogen contents (mean \pm SEM, n=3) due to flooding over the flood duration in the experimental mesocosms. C, PF, and PFA correspond to the different treatments. Redox potential values (A, B, C, and D), N-NH₄ content (A', B', C', and D') and N-NO₃ content (A'', B'', C'', and D'') patterns measured in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.

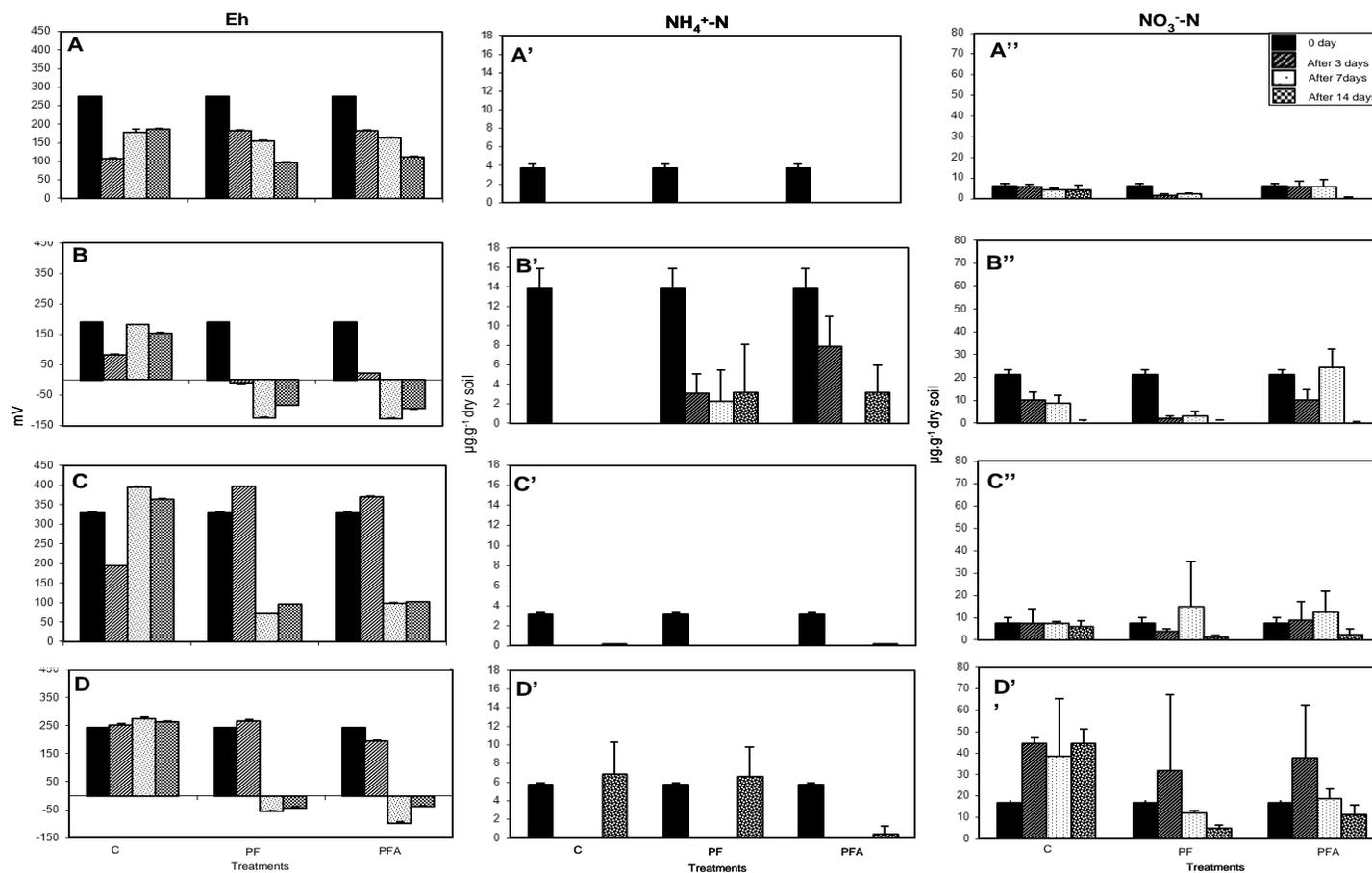
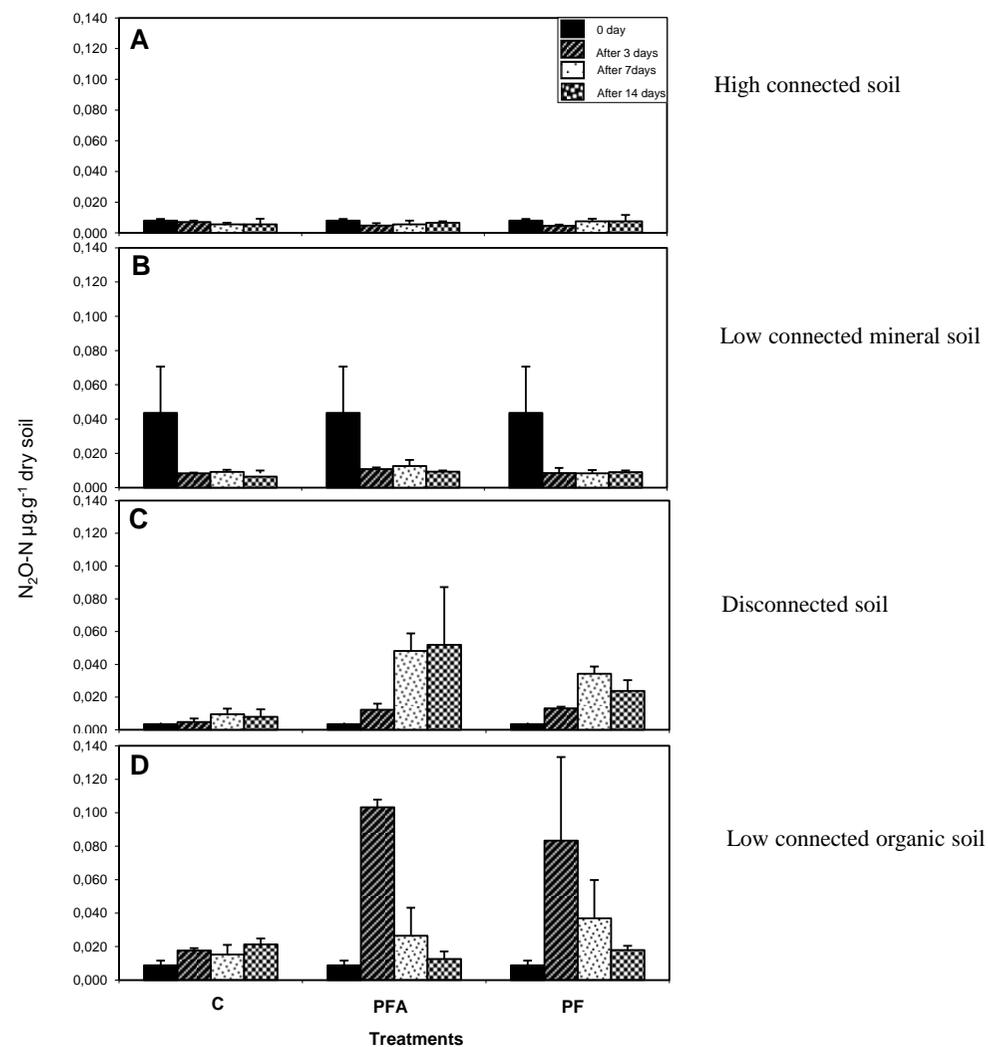


Figure 4.3. Denitrification rates (mean \pm SEM, n=3) depending on flood duration and treatment in the experimental wetlands. A, B, C, and D represent the changes in denitrification rates in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.



respectively while it did not differ significantly throughout flood duration in C soil. Later on, it kept increasing in PFA conditions (Fig. 4.3C). In the Low connected organic soil (Fig. 4.3D), N-N₂O emission varied widely over the whole flood duration. After 3 days' flooding, initial N-N₂O emission (below 0.01 µg.g⁻¹ dry soil) rose rapidly up to approximately 0.02, 0.08, and 0.11 µg.g⁻¹ dry soil in C, PF and PFA, respectively. After 3 days' flooding, N-N₂O emission measured in PF conditions ~0.08 µg. g⁻¹ dry soil hr⁻¹ was more than 4 times greater than in C soils. After 14 days' flooding, N-N₂O emission measured in the Disconnected soil in PF conditions was more than 3, 3, and 1.5 times greater than in the High connected soil, the Low connected mineral soil and the Low connected organic soil, respectively. Finally, denitrification rates exhibited similar patterns in C, PF, and PFA conditions in the High connected and Low connected mineral soils, while flooding conditions stimulated the denitrifying activity in the Disconnected soil and the Low connected organic soil. Soil redox potential exhibited a significant difference along C and PF conditions in all soils, except in the connected soil and the Low connected mineral soil (Table 4.3).

3.2 Effect of flooding duration on the soil bacterial community structure

16Sr RNA gene abundance varied between 2*10⁸ and 1.5*10⁹ copies per gram of soil (Fig. 4.4). For most of the experiments, in all the soils and for all durations, the results obtained for C, PF and PFA conditions showed that the abundance of total bacteria remained constant. Indeed, only one significant difference was observed for the Low connected organic soil in PFA conditions after 3 days (Fig. 4.4D). *NosZ* gene abundance in all the samples analyzed varied between 4*10⁶ and 8*10⁷ copies per gram of soil (Fig. 4.4). As for 16S rRNA gene abundance, no significant changes were observed between C on the one hand and PF and PFA conditions on the other hand, except in both soils (the Disconnected and the low connected organic soils). *DsrB* gene abundance varied between 10⁵ and 7*10⁷ copies per gram of soil in all the samples analyzed (Fig. 4.4). Similarly to the other two genes, PF and PFA conditions did not significantly differ from C. However, a significant difference was observed for the *dsrB* gene in the Disconnected soil: its abundance significantly increased on day 14 (Fig. 4.4C) (Table 4.3). Conversely, *dsrB* gene abundance slowly decreased in the Low connected mineral soil on day 3 (Fig. 4.4B).

Concerning ratios (Fig. 4.5), the maximum value for denitrifying bacteria (12%) was observed in the Low connected mineral soil under PF conditions on day 14. The lowest value was observed in the Disconnected soil under PFA conditions on day 7. For sulfate-reducing bacteria, the maximum value (6%) was observed under PFA conditions in the Low connected

organic soil on day 14 (Fig. 4.5D). Comparing the different ratios showed that denitrifying bacteria were still significantly more abundant than sulfate-reducing bacteria (Fig. 4.5). Few significant changes were observed among the different ratios: the most significant change was observed for sulfate-reducing bacteria in the Disconnected soil under PF conditions on day 14 (0.5% in C compared to 2.6% under PF conditions on day 14).

4. Discussion

4.1 Effect of flooding duration on N removal

Two groups of soils can be distinguished according to denitrification rate variations throughout the experiment: one group where flood conditions stimulate the denitrifying activity (Low connected organic soil and Disconnected soil), and another group where flood conditions have no effect or a negative effect on the denitrifying activity (High connected soil and Low connected mineral soil).

The first group of soils is characterized by a very low denitrification rate in the beginning compared to the rate measured after flooding. After flooding, some micro-anaerobic zones in the soils might still have denitrification activity and nitrification may have occurred in the aerobic zones. Nitrate diffusion from aerobic to anaerobic micro-sites may have enhanced denitrification. In the Disconnected soil, redox potential values decreased slowly from approximately +350 mV at the beginning of the experiment down to +100 mV after 14 days' flooding for PF and PFA conditions, and thus promoted nitrate-reducing processes (Faulwetter et al., 2009,2013). This is likely due to the fact that Disconnected soil is characterized by lower concentrations of organic matter. Hargrave (1972) report that the magnitude of the decrease of redox potentials is correlated to the amount of organic carbon available in the soils. Trimmer et al. (2003) also report that most of the initial oxygen consumption was attributed to the oxidation of organic carbon and ammonium. Ammonium was totally converted to nitrate after 3 days' flooding, likely due to the redox potential status. Despite flooding, this soil remained aerobic throughout the flooding period, with increasing rates of NO_3^- production through nitrification. Therefore, the high level of NO_3^- observed in this soil was likely due to the oxidation of NH_4^+ . In the Low connected organic soil, in addition to anaerobic conditions, two other factors may have contributed to the high denitrification rate observed during flooding conditions, i.e. organic matter and nitrate content.

Figure 4.4. Changes in the patterns of *16S rRNA* gene copy numbers, *nosZ* gene copy numbers and *dsrB* gene copy numbers (mean \pm SEM, n=3) due to flooding over the flood duration in the experimental mesocosms. C, PF, and PFA correspond to the different treatments. *16S rRNA* gene copy numbers (A, B, C, and D), *nosZ* gene copy numbers (A', B', C', and D') and *dsrB* gene copy numbers (A'', B'', C'', and D'') patterns measured in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.

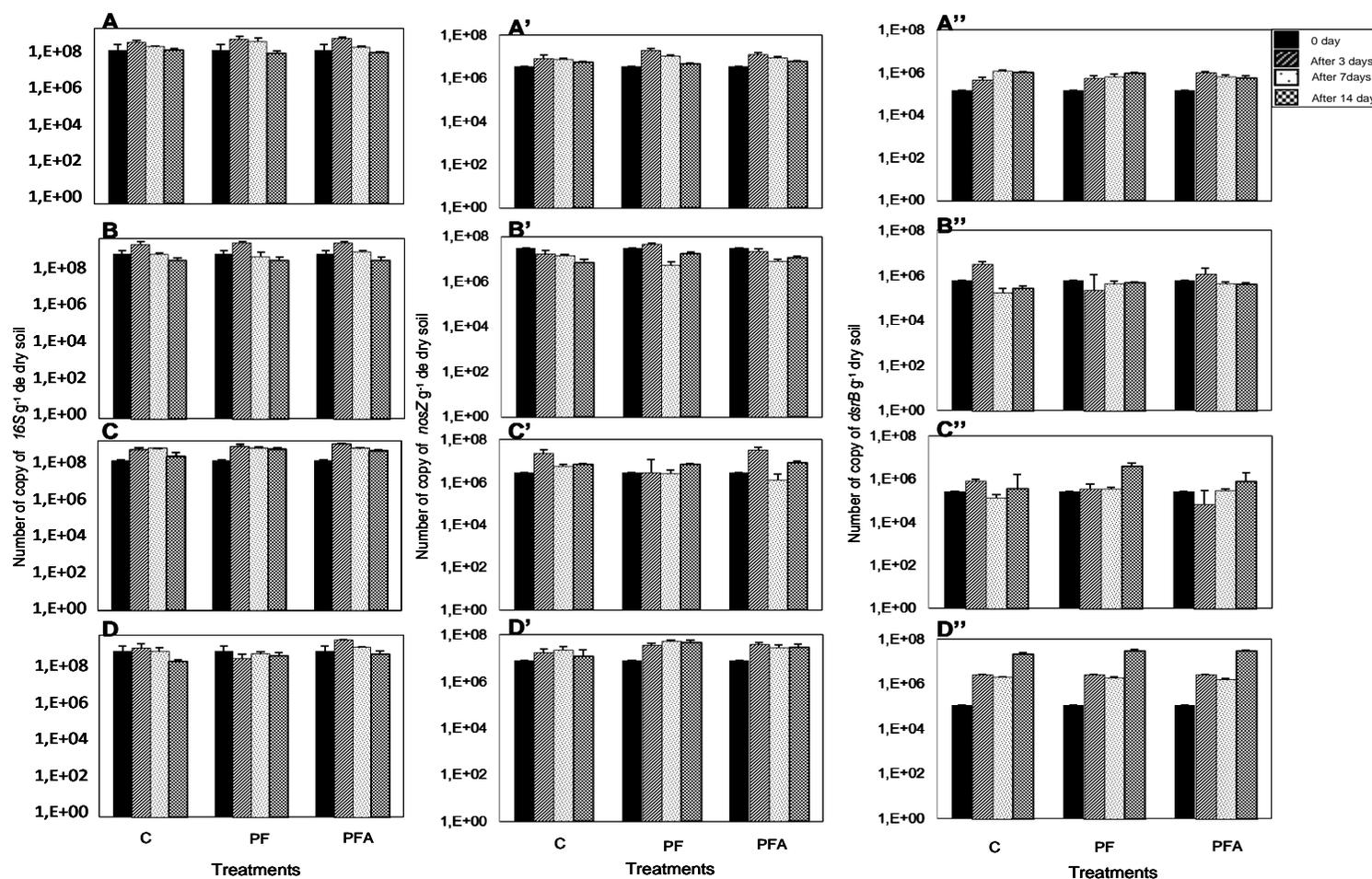


Figure 4.5. Changes in the patterns of denitrifying bacteria / total bacteria ratios (A, B, C and D), and sulfato-reducing bacteria / total bacteria ratios (A', B', C' and D') with different hydrological pulsing events (C, and PF) over the whole flooding period (mean \pm SEM, n=3) in four different soils (High connected soil (A and A'), Low connected mineral soil (B and B'), Disconnected soil (C and C') and Low connected organic soil (D and D')).

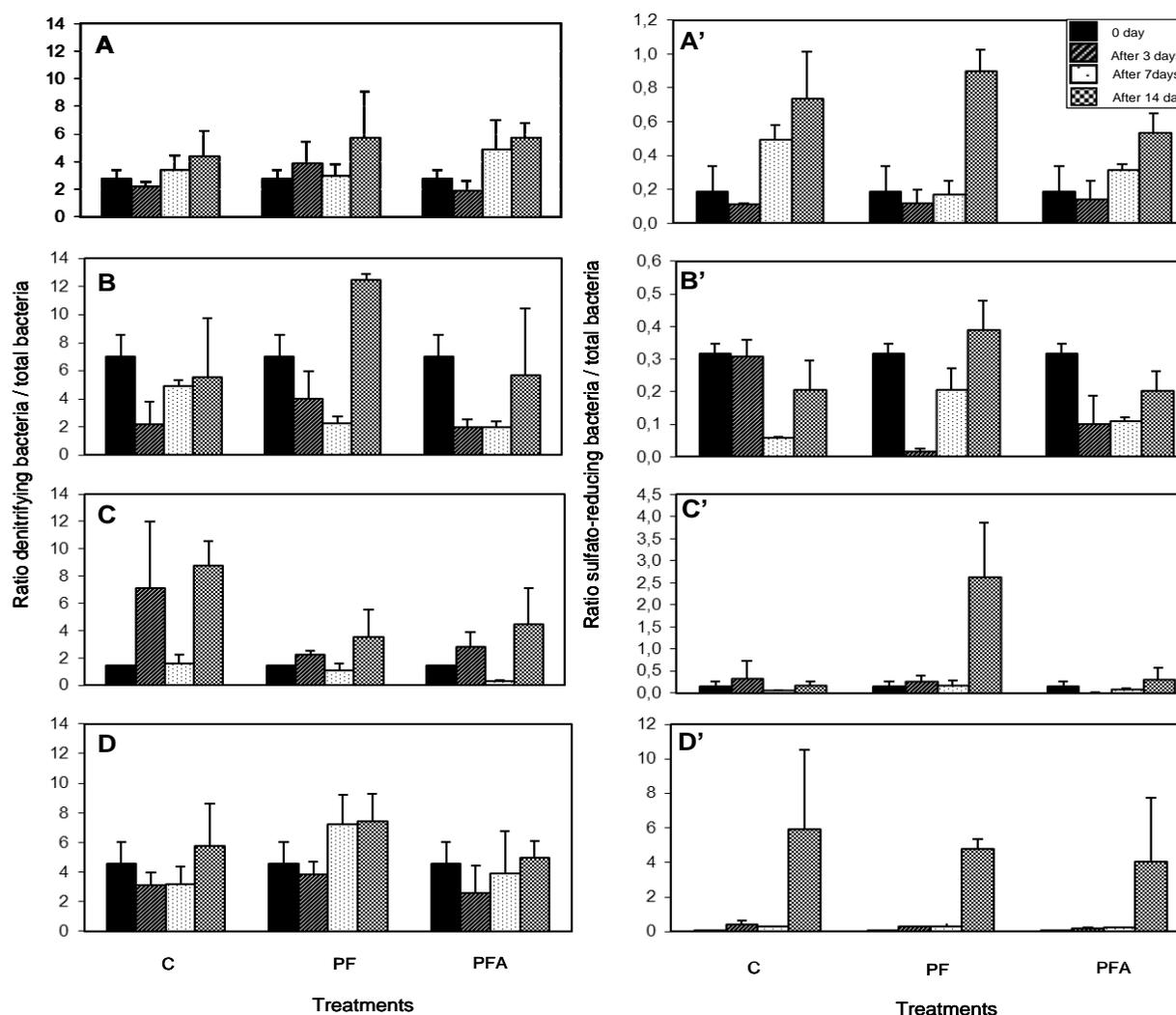


Table 4.2. Results (F-values and significance) of MANOVA testing for the degree of connectivity, flood duration and treatments (C, PF, and PFA) on ecological functions and bacterial community structure.

Treatment	DF	F values								
		Eh	NH ₄ -N content	NO ₃ -N content	Denitrification	16S	Denitrifying bacteria	SRB	R nosZ/16S	R dsrB/16S
Degree of connectivity (DC)	3	59900***	146,5***	17,4***	67,69***	1,57	2,2	174,3***	6,158**	6,158**
Treatment (Trt)	2	40700***	3,9*	1,8	25,07***	1,40	1,1	8,4***	0,46	0,46
Flood duration (Date)	3	52400***	462,2***	16,1***	57,45***	1,15	1,2	28,1***	4,028*	4,028*
DC * Trt	6	5044***	3,9**	1	9,94***	1,09	1,2	13,5***	0,42	0,42
DC * Date	9	3896***	58,9***	5,5***	9,62***	1,03	1,0	13***	4,348***	4,348***
Date * Trt	6	19700***	4,3***	0,6	3,56***	0,90	0,8	1,9**	0,19	0,19
DC * Date * Trt	18	1915***	4,3***	0,6	1,69**	0,86	0,9	4,3***	0,22	0,22

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 4.3. Summary of statistically significant effects of flooding time (0, 3, 7, 14 days), flooding conditions (DD and PF treatments), and their interactions (NS = P -value > 0.1).

Parameter		Eh	Nitrate	Ammonium	Denitrification	Denitrifying bacteria	SRB	Ratio nosZ/16S	Ratio dsrB/16S
Petiville	Date	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001
	Trt	<0.001	0.013	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Date * trt	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.02
TB	Date	<0.001	0.0034	<0.001	NS	<0.001	0.03	0.01	NS
	Trt	<0.001	NS	0.02	NS	NS	NS	NS	NS
	Date * trt	<0.001	NS	0.003	NS	NS	0.05	NS	NS
TD	Date	<0.001	0.02	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	<0.001
	Trt	<0.001	NS	NS	<0.001	0.003	<0.001	NS	<0.001
	Date * trt	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001
Yville	Date	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001
	Trt	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001	NS	0.04	NS
	Date * trt	<0.001	NS	NS	0.01	0.0421	NS	NS	NS

Figure 4.6. Correlation matrix (Pearson) performed on soil physico-chemical and bacterial parameters. Values in bold are significantly different from 0 at $P < 0.05$. *Eh* soil redox potential, *N-NH₄* ammonium content, *N-NO₃* nitrate content, *nosZ* gene encoding Nitrous Oxide Reductase (denitrifying bacteria), and *dsrB* gene encoding dissimilatory Sulfite Reductase (sulfate-reducing bacteria).

Eh									
N-NO ₃	0.31 **								
N-NH ₄	0,15		0.22 *						
N-N ₂ O	-0.32 **	-0,07	-0.17 †						
16S	0,13	0,02	-0,13	0.22 *					
<i>NosZ</i>	-0,05	0.21 *	0.19 †	0.60 ***	0.25 *				
<i>DsrB</i>	0,05	-0,13	-0,16	0.52 ***	0.28 **	0.33 **			
Ratio <i>NosZ</i> /16S	-0,05	0,10	0.51 ***	0.18 †	-0.19 †	0.49 ***	0,02		
Ratio <i>DsrB</i> /16S	0,02	-0.18 †	-0,14	0.38 ***	-0,05	0,14	0.75 ***	0,11	
	Eh	N-NO ₃	N-NH ₄	N-N ₂ O	16S	<i>NosZ</i>	<i>DsrB</i>	Ratio <i>NosZ</i> /16S	Ratio <i>DsrB</i> /16S

Pearson method

*, **, *** & † = $P = 0.05, 0.01, 0.001$ and 0.10 respectively

The Low connected organic soil had the highest organic matter (Table 4.1) and nitrate (Fig. 4.2) contents in its topsoil. Organic C content was more than six times higher in the Low connected organic soil than in the Disconnected soil (Table 4.1). Flooding conditions can cause a rapid increase of microbial activity (e.g., denitrifying bacteria) and nutrient cycling processes that result in high denitrification rates. Using Pearson method, we found that denitrification rates were generally not correlated with nitrate content. However, redox potential appears to be a major factor influencing both N dynamics and denitrification process with the correlation observed between Eh and both nitrate content and denitrification rates (Fig. 4.6).

In the beginning of the experiment, the second group of soils was characterized by a high denitrification rate in the Low connected mineral soil and a low one in the High connected soil. The Low connected mineral soil was extensively disturbed when dykes were built, which reduced river flood frequency and consequently promoted organic matter accumulation in the topsoil (Table 4.1). This can explain the high denitrification rate found at the beginning of the experiment. High organic matter contents can increase $\text{NO}_3\text{-N}$ consumption by fuelling denitrifying bacteria and stimulating their inorganic N uptake. Thus, organic matter decomposition can supply dissolved organic carbon (DOC) to microbes. Flood duration conditions slow down oxygen diffusion to the systems and promote the rapid development of reducing conditions. The Low connected mineral soil was aerobic at the beginning of the experiment (Eh ~ 175 mV), but it became anaerobic after 3 days' flooding (PF and PFA conditions), and highly reducing after 7 days' flooding. Our results suggest that prolonged saturation and anoxic conditions reduce nitrate concentrations, decrease redox potentials and reduce denitrification. After 7 days' flooding, the redox potential measured in both PF and PFA conditions was approximately -150 mV, which corresponds to changes in the processing rate and availability of sulfur (Faulwetter et al., 2013). This could explain the decreasing denitrification rates that we observed after 7 days' flooding. In the High connected soil, a positive redox potential (nitrate-reducing conditions) was maintained throughout the flood events, and the denitrification rate remained stable. In addition to the redox potential status, the low denitrification rates observed in that soil can be explained by its low organic carbon content (Table 4.1) and its low initial NO_3^- and NH_4^+ concentrations. Denitrification is affected by many factors, including organic carbon (Taylor et al., 2011). Lu et al. (2009) showed that an additional carbon source can remarkably improve the nitrate removal capacity of constructed wetlands through denitrification.

4.2 Effect of flooding duration on the soil bacterial community structure

A comparison of denitrifying bacteria and sulfate-reducing bacteria ratios showed that denitrifying bacteria were in significantly higher numbers than sulfate-reducing bacteria. The abundance of sulfate-reducing bacteria was significantly higher in the Low connected organic soil than in the other soils and increased with time, especially on day 14 in the Disconnected soil. The abundance of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the Low connected organic soil is related to the redox potential; indeed, redox potentials were lower in the Low connected mineral soil than in the other soils and correspond to values that allow for sulfato-reduction metabolism. According to Faulwetter et al. (2009), microbial respiration types follow predictable sequences within specific redox potential ranges.

As far as denitrifying bacteria are concerned, their abundance decreased in the Low connected mineral soil; this is the only case of a decrease in the abundance of denitrifying bacteria throughout the flooding period. Indeed, a slight change in microbial community composition was observed on day 3. The initial effects of this modification were observed at the next two time-points, on day 7 and day 14. The stress-induced changes in N cycling described above may be a direct result of the alteration of the bacterial community structure following exposure to flooding conditions.

The different results of the quantification of soil microbial communities reveal that there exists a certain time-lag before a modification of the microbial community composition and thus a restoration of its ecological function can be observed. Indeed, a slight change in microbial community composition was observed on day 3. The initial effects of this modification were observed at the next two time-points, on day 7 and day 14. The stress-induced changes in N cycling described above may be a direct result of alterations to bacterial community structure following exposure to flooding conditions. These results indicate that 14-day long flooding has a major impact on N cycling (e.g., N changes and denitrification processes), and no impact on the soil bacterial community structure. This finding is in agreement with the study of Unger et al. (2009) and Song et al. (2010) who report that there is no relationship between denitrification rate, community structure and denitrifier quantity. This suggests that changes in denitrification rates during flooding conditions are not caused by changes in microbial community structure, but more by physico-chemical factors such as substrate availability and hydrological conditions.

It then appears that the results obtained from the molecular tools used in this study do not correlate with the functioning results we obtained (inorganic nitrogen contents and specific denitrification rates). However, all the molecular techniques used in this study were based on DNA extraction, which does not reflect the metabolic activity of the communities. It could then be possible in the future to monitor bacterial community activity by also extracting RNA.

4.3 Implications for the restoration of soil N removal function in human-impacted floodplains

One of the objectives of this paper is to discuss implications for the restoration of the N removal function, a microbe-mediated soil function, in the soils of human-impacted floodplains. We hypothesized that the flooding conditions we tested would not improve the level of expression of the denitrification process or the microbial community structure in the soils directly or indirectly connected to the Seine River. This hypothesis was confirmed for the directly connected soil (i.e. the High connected soil) but it was not confirmed for the indirectly connected soils (i.e. the Low connected mineral and organic soils). These soils are usually subject to flooding regimes that permit soil waterlogging conditions that favor soil denitrification. But surprisingly, in this experiment, the lowest denitrification level was obtained in the soil directly connected to the Seine river (i.e. nearest to the river) and the highest level was obtained in the soil indirectly connected to the Seine river (i.e. furthest from the river). This result may be partly explained by the multiple factors that can account for the denitrification process. Denitrification is a microbial process that occurs only under anaerobic conditions (caused by waterlogged conditions) but waterlogging is not sufficient to explain denitrification levels because there are other factors involved in the denitrification process that are related to organic matter, the energy source for microbes.

In fact, although neither the denitrification level nor the microbial community structure changed in the directly connected soil (i.e. High connected soil) throughout the experiment, including in prolonged waterlogged conditions, that soil also exhibited the lowest denitrification level. The low denitrification rates observed in that soil can be explained by its location nearby the river that does not promote a significant input of particulate organic matter in its topsoil. Indeed, directly connected soils are under the effect of flood events and consequently organic matter does not accumulate in their topsoil. However, we know that organic matter decomposition can supply dissolved organic carbon to microbes, so organic matter can increase $\text{NO}_3\text{-N}$ consumption by fuelling denitrifying bacteria and stimulating their inorganic N uptake.

We also observed a relatively high denitrification rate in the Low connected organic soil after flooding, promoted by waterlogged conditions and the changes in microbial community structure. Indeed, indirectly connected soils are not under the effect of flowing water, so that organic matter can accumulate in their topsoil (Table 4.1). Under prolonged flooded conditions, high organic matter contents promote O₂ consumption by fuelling microbes. Correlatively, high organic matter contents also trigger the rapid development of reducing conditions (rapid decrease of redox potentials) favorable to C storage, another function of flooded soils. Mitsch and Gosselink (2002) report that wetland soils are large carbon pools and play important roles in global carbon cycles as natural carbon sinks.

We also hypothesized that the flooding conditions we tested would increase the level of expression of the denitrification process by modifying the microbial community structure in disconnected soils. This hypothesis is confirmed; indeed, the relatively high denitrification rates we observed in the Disconnected soil by testing different flood durations suggest that there is potential for restoring or recreating the N removal function in this riparian soil. This hypothesis is also validated because a change was observed in the microbial community structure as shown by the ratio values for denitrifying bacteria and sulfate-reducing bacteria in that soil. Our results are consistent with the possibility to restore the N removal soil function by recreating a disturbance regime related to flooding in riparian soils currently disconnected from the river in human-impacted floodplains. Our experiment suggests that between 3- and 7-day long waterlogging is needed in the Disconnected soil for it to exhibit a significant denitrification level.

These results show that the restoration of disturbance regimes due to flood events is necessary but not sufficient to restore all microbe-mediated soil functions in human-impacted floodplains; indeed, the restoration of disturbance regimes due to flood events should be conducted on soils located in diverse topographic locations, with a wide range of organic matter contents.

5. Conclusion

Human activities in the floodplains along rivers have resulted in drastic deviations from their natural status over the centuries. Once dykes are built, river flooding frequency is often reduced. Better knowledge of the ecological consequences of changes in water regimes on

nitrogen cycling in riparian zones raises several new scientific challenges. These challenges relate the possibilities of restoration and rehabilitation of degraded riparian ecosystems.

The results of this study show that:

- Increasing flood duration conditions decreased nitrate concentrations, lowered redox potential values, and decreased denitrification rates except in the Disconnected soil and the Low connected organic soil.
- Analysis of the soil microbial community revealed few changes in community structure after flood events, especially in the Disconnected soil.
- The sharp increase in denitrification rate observed in the Disconnected soil after 7 days' flooding suggests that there is a potential for restoring or creating riparian $\text{NO}_3\text{-N}$ removal functions in degraded floodplains by restoring hydrology systems if we can reconnect riparian zones to streams, either by restoring subsurface flow or by creating wetlands. Restoring or creating sinks is considered as a more promising approach for reducing $\text{NO}_3\text{-N}$.
- Future investigations could focus on the study of other microorganisms involved in other biochemical cycles such as Fe, Mn that can play a key role in the restoration of these soils. The cycles analyzed in our study could be studied at greater depths and in other horizons.
- Bacterial community activity could be studied by extracting RNA in addition to DNA and could be of great interest.

Acknowledgements

We would like to thank the Platform for Chemical Analysis in Ecology of the “SFR 119 Montpellier Environnement Biodiversité”, at the “Centre d’Écologie Fonctionnelle et Évolutive CNRS, Montpellier, France). We are also grateful to Philippe Delporte and Vincent Guiot for help with field sampling and laboratory analyses and Ludovic Henneron for statistical analyses. Financial support for this research was provided by the REBEBAS (SA IV 2008) project funded by the “Groupement d’Intérêts Public Seine Aval (GIP Seine-Aval).

Conclusion partielle

Dans le deuxième chapitre de ce travail de thèse, l'objectif était de diagnostiquer l'état actuel du sol des écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine afin de voir si ces sols remplissent actuellement certaines de leurs fonctions spécifiques (stockage de C, épuration de l'N). Pour répondre à cet objectif, nous avons employé une démarche qui consiste à combiner une approche descriptive (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) et une approche fonctionnelle des sols (mesures *in situ* et tests en conditions contrôlées au laboratoire) sur des sols représentatifs d'un degré de connectivité au fleuve des écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de la Seine. Les résultats de ces suivis ont montré que:

- L'approche descriptive des sols a permis d'établir un diagnostic préliminaire de zone humide. En effet, la majorité des sols rencontrés sur les berges de la Seine appartiennent à la catégorie des REDUCTISOLS, et sont conditionnés par une durée plus ou moins prolongée d'engorgement en eau. Cette approche permet donc de délimiter les zones humides, mais ne permet pas de faire la différenciation entre les sites rivulaires selon leurs degrés de connexion.
- L'approche fonctionnelle des sols (mesures *in situ* et tests en conditions contrôlées au laboratoire) semble fournir de bons indicateurs pour différencier les sols déconnectés des sols connectés. A partir de ces résultats, il est possible de dire que notre hypothèse de départ a été infirmée : le fonctionnement des sols est modifié par la déconnexion au fleuve et il est possible de différencier les sols déconnectés des sols connectés par la mesure des processus de dénitrification et de stockage de C pas seulement sur les sites connectés directement mais aussi sur les sites indirectement connectés. Le degré de perturbation et d'anthropisation estimé par ces mesures fonctionnelles pourrait alors servir d'outil de décision dans le choix des sites de restauration en indiquant quels sont ceux possédant encore des potentialités suffisamment proches des sols du site de référence.

Cependant, le suivi fonctionnel réalisé *in situ* (1 fois par mois) des sols des écosystèmes rivulaires choisis n'est pas suffisant pour comprendre et quantifier l'expression de certaines fonctions emblématiques des sols d'écotones rivulaires (puits et stocks de C et épuration de l'N), notamment dans les périodes d'engorgement prolongé en eau. Il était donc nécessaire de mettre en place une expérimentation en conditions contrôlées pour tester le comportement des sols choisis en cas d'engorgement en eau. Dans le troisième chapitre, l'objectif était donc de

tester expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation constante attribuable aux crues du fleuve (perturbations) *versus* les variations journalières de niveau d'eau liées aux marées (contraintes) sur la fonction épuratrice vis-à-vis de l'azote des sols d'écosystèmes rivulaires en connexion directe avec la Seine (système de référence). Nous avons employé une démarche qui consiste à combiner la mesure de l'activité biologique (via les communautés bactériennes) avec la mesure de différents descripteurs fonctionnels (potentiel redox, dénitrification et minéralisation) pour évaluer le succès de cet essai expérimental de restauration. Les résultats ont montré que :

- La dénitrification varie en fonction du régime d'inondation (variations journalières de niveau d'eau *versus* durée d'inondation constante) et du type de sol. Les sols, utilisés pour cette expérimentation, ont été échantillonnés sur un gradient d'engorgement en eau (gradient topographique en fonction de l'éloignement au cours principal du fleuve). Nous avons constaté que les sols échantillonnés dans la zone la moins fréquemment inondée mais soumise expérimentalement à des variations journalières de niveau d'eau dénitrifient le plus.
- Le régime d'inondation et le type de sol ont un effet significatif sur le changement des communautés bactériennes (dénitrifiantes *vs* sulfato-réductrices). Nous avons constaté que les sols échantillonnés dans la zone la moins fréquemment inondée favorisent plutôt l'installation d'une communauté bactérienne dénitrifiante. Alors qu'on trouve une communauté bactérienne sulfato-réductrice, sur les sols échantillonnés dans la zone la plus fréquemment inondée.

Dans le quatrième chapitre, nous avons employé la même démarche que le deuxième chapitre pour tester expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation constante sur la même fonction épuratrice et sur les communautés bactériennes (dénitrifiante et sulfato-réductrice) de sols représentatifs d'un gradient de connexion au fleuve allant des sols directement connectés (site de Petiville) aux sols déconnectés (prairie exondée du site de Trou Deshaye) en passant par des sols connectés indirectement par la nappe (site de Trou Buquet). Les résultats ont montré que la durée d'inondation constante :

- N'avait pas un effet significatif sur la capacité épuratrice de l'N et l'expression des communautés dénitrifiantes dans les sols connectés au fleuve (Petiville et Trou Buquet),
- Avait un effet significatif sur la capacité épuratrice d'N (via le processus de

dénitrification) ainsi que l'expression des communautés dénitrifiantes dans les sols déconnectés de fleuve (prairie exondée du site de Trou Deshayé).

- PARTIE 2 -

Restauration du compartiment sol par réaffectation : création d'un nouveau profil pédologique après destruction du profil existant. Cas du comblement de la ballastière d'Yville-sur-Seine par des sédiments de dragages.

La **plaine alluviale de la Basse Vallée de la Seine** ne fait pas exception à la disparition des zones humides (Mitsch & Gosselink, 2000) et constitue de ce fait, un bon modèle d'étude pour mesurer les possibilités de restauration écologique dans un contexte de forte anthropisation. En effet, depuis le milieu du 19^{ème} siècle, la plaine alluviale a fait l'objet d'aménagements pour permettre (1) l'utilisation agricole des sols (drainage) et (2) l'exploitation des matériaux alluvionnaires (extraction de granulats) impactant les écosystèmes de la plaine d'inondation et notamment **les marais alluvionnaires**.

Dans ce paysage de plaine alluviale fortement impactée, le maintien de la navigabilité de la Manche jusqu'à Rouen nécessite également un **entretien régulier du chenal de navigation**. Les sédiments de dragage ainsi collectés sont habituellement déposés à terre dans des chambres de dépôt le long de la Seine formant de nombreux « *tas* difficilement intégrables dans le paysage et dans l'environnement » (Philippe DEISS, directeur général du GPMR ; GPMR, 2012) ou rejetés en mer. Or, la capacité d'accueil des sites de dépôt à terre est aujourd'hui très limitée.

Parallèlement, la plaine alluviale fait l'objet d'une **importante exploitation de granulats** pour les besoins de l'industrie du bâtiment et des travaux publics. Cette activité d'extraction est aujourd'hui fortement implantée dans la basse vallée de Seine et notamment dans la boucle d'Anneville-Ambourville, localisée à l'ouest de Rouen. De plus, l'obligation légale de réaménager les sites après leur exploitation conduit le plus souvent les carriers à créer des plans d'eau de forte profondeur à vocation récréative (voile, pêche) ou écologique (réserves naturelles). La boucle d'Anneville-Ambourville présente ainsi près de 6 km² d'étangs qui résultent de l'extraction des sables et des granulats alluvionnaires par des entreprises comme Cemex, Lafarge ou Carrières et Ballastières de Normandie (CBN). Ces deux activités (dragages avec l'emprise des chambres de dépôt et extraction de granulats) ont été consommatrices de zones humides dans la plaine alluviale de la Basse Vallée de la Seine.

Dans ce contexte, le Grand Port Maritime de Rouen (GPMR) a mené une expérience originale (unique en France à notre connaissance) en collaboration avec la commune d'Yville sur Seine (située dans la boucle d'Anneville-Ambourville) et le Parc Naturel Régional des Boucles de la Seine Normande (PNRBSN) et en partenariat avec l'entreprise CBN : **combler une ballastière avec des sédiments de dragage dans le but de recréer un ensemble paysager typique de la plaine alluviale** comprenant un plan d'eau de faible profondeur, une mégaphorbiaie et une prairie humide sur une surface de 11 ha. Dans ce cas d'étude, le milieu initial étant complètement détruit puis restauré via la restauration d'un sol, ce projet s'inscrit donc dans une thématique de recréation des milieux correspondant au cas extrême de la restauration écologique. Ce type de restauration constitue une problématique d'actualité et un enjeu écologique important dans le cas de systèmes estuariens fortement anthropisés comme la basse vallée de la Seine.

La phase de comblement a été effectuée entre 2000 et 2008 après autorisation préfectorale prise au titre de la loi sur l'eau. 684 568 tonnes de sédiments de dragage, correspondant à 6 mètres d'épaisseur, ont ainsi été apportées, en plusieurs étapes, par voie hydraulique de la Seine à la ballastière. Pour chaque apport, le GPMR a analysé les sédiments afin (1) de déterminer leur niveau de contamination en polluants (métaux lourds, HAP et PCB) et (2) de ne sélectionner que les sédiments montrant un taux de contaminants inférieur au seuil d'acceptation préalablement fixé par le référentiel proposé par le groupe GEODE. L'innocuité des sédiments de dragage selon leur niveau de contamination reste, à ce jour, une question sensible dans le cadre de leur utilisation comme matériau de comblement. Suite au dépôt des sédiments de dragage, 10 centimètres de sable puis 70 à 80 cm de tourbe ont été déposés. Cette tourbe, apportée exclusivement par voie hydraulique, correspond à de la tourbe eutrophe naturellement présente au sein du marais alluvionnaire avoisinant sur des épaisseurs allant de 30 cm minimum à 9 mètres maximum.

Dans ce cadre, le laboratoire ECODIV de l'Université de Rouen a été sollicité par le GPMR afin de réaliser les suivis écologiques définis de manière concertée concernant le réaménagement de la ballastière d'Yville, dans le cadre de l'arrêté préfectoral du 15 janvier 1999. Une convention a ainsi été signée entre l'université de Rouen et le Grand Port Maritime de Rouen pour une durée de cinq années à compter du 1er juin 2008. Pour suivre le réaménagement de la ballastière, le laboratoire ECODIV a proposé une démarche basée sur les choix suivants :

1. Focaliser les travaux sur la prairie humide à restaurer en prenant comme « *témoin avant travaux d'extraction de granulats et de comblement* », une prairie fauchée et pâturée située à proximité du site à restaurer.
2. Réaliser une caractérisation écologique fine (végétation, faune du sol et caractéristiques édaphiques) de l'état initial du site afin de définir « *l'état zéro* » et de pouvoir suivre régulièrement la trajectoire de la prairie humide restaurée par rapport à la prairie témoin.
3. Laisser la colonisation spontanée (colonisation spontanée par la végétation et les invertébrés de la faune du sol) intervenir sur la majeure partie de la prairie à restaurer mais prévoir des expérimentations *in situ* permettant de tester d'autres modes de colonisation (semis composés de différents mélanges d'espèces prairiales, transfert de sol par banquettes d'écosystème de référence, fauche et exportation, ...).

Cette deuxième partie de la thèse s'inscrit précisément dans le cadre du projet « *Suivis écologiques du réaménagement de la ballastière d'Yville-sur-Seine* », financé par le GPMR, et se focalise plus particulièrement sur la **restauration du compartiment sol de la prairie humide**. Cette partie comporte deux objectifs :

- **Objectif 1 : évaluer le succès de la restauration du compartiment sol à l'aide de descripteurs pédologiques** (i.e. caractéristiques physico-chimiques courantes) et **biologiques multi-taxons** (i.e. Vers de terre, Collemboles et microorganismes) suite au comblement de la ballastière à l'aide de sédiments de dragages (chapitre 5) ;
- **Objectif 2 : évaluer le succès de la restauration du compartiment sol à l'aide de descripteurs fonctionnels** permettant d'appréhender les fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices vis-à-vis de l'azote et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides (chapitre 6).

A ces objectifs correspondent respectivement les hypothèses suivantes :

- **Hypothèse 1** : l'utilisation de sédiments de dragage comme matériaux de comblements peut permettre la recréation d'un profil de sol morphologiquement proche d'un profil de la plaine alluviale à condition que ces sédiments soient recouverts d'un matériel pédologique suffisamment riche en matière organique pour recréer une horizonation pédologique cohérente (gradient de matière organique du haut vers le bas du profil).

- Dans le même temps, on suppose que les descripteurs pédologiques habituels (i.e. morphologiques) ne sont pas suffisants pour quantifier les fonctions écologiques spécifiques associées à ces écosystèmes et qu'une approche fonctionnels (*in situ* et *ex situ*) relatifs notamment à la dynamique de la matière organique est nécessaire d'où l'**hypothèse 2** : l'utilisation de sédiments de dragage comme matériaux de comblements peut permettre la recréation d'un profil pédologique possédant des fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices en azote et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides à condition que les techniques de comblement permettent la mise en place d'une variabilité dans les conditions d'engorgement en eau du sol restauré.

Dans le **chapitre 5**, le suivi au cours des 3 premières années après le comblement de descripteurs pédologiques classiques (caractéristiques physico-chimiques des horizons reconstitués respectifs) combiné à des descripteurs biologiques multi-taxons (i.e. Vers de terre, Collemboles et microorganismes) permet de suivre la dynamique du sol reconstitué.

Le **chapitre 6** vise plus spécifiquement à suivre le fonctionnement du sol reconstitué pour diagnostiquer si ce compartiment de l'écosystème restauré acquière un fonctionnement typique de milieu humide dès ses premières années de mise en place. Le fonctionnement du sol reconstitué est appréhendé en combinant des mesures fonctionnelles *in situ* avec des mesures fonctionnelles *ex situ*. Ces mesures *in situ* et *ex situ* sont relatives à la respiration du sol, à la minéralisation du C et de l'N et à la dénitrification. Elles permettent de mesurer le niveau réel et potentiel des fonctions écologiques prospectées.

Chapitre 5

The use of dredged sediments for soil creation in the Seine Estuary (France): an alternative to conventional gravel-pit rehabilitation.

C. Mchergui¹, M. Chauvat¹, P. Margerie¹, A. Husté¹, E. Langlois¹, M. Aubert¹,
M. Akpa-Vinceslas¹, S. Samson², F. Bureau¹

¹ Normandie Univ, UR, ECODIV-EA 1293, Fédération de Recherche SCALE-FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.

² Service environnement du Grand Port Maritime de Rouen, 34 boulevard de Boisguilbert, F-76022 Rouen Cedex 3.

Cet article est en préparation pour *Restoration Ecology*.

Introduction

Wetlands are among the most important ecosystems on earth. They are discriminated on the basis of hydrology, soils, and vegetation (Neue *et al* 1997). They generally include swamps, marshes, bogs, fens, floodplains and shallow lakes. Mitsch and Gosselink (2000) underlines their following properties: as ecosystems providing substantial services to human societies and also as having important ecological and environmental functions that contribute to human well-being. Among their properties are support to high plant biodiversity (Van Roon 2012) and productivity (Coletti *et al* 2013), nitrogen (N) mitigation (Hernandez and Mitsch 2007; Keffala and Ghrabi 2005; Pinay *et al* 2002), greenhouse gas (GHS) mitigation (Jenkins *et al* 2010; Wylynko 1999), carbon (C) sequestration (Coletti *et al* 2013; Van Roon 2012; Wylynko 1999), and water quality improvement (Moreno *et al* 2007).

However, owing to human activities, more than half of the wetland ecosystems that existed in the early 20th century has currently been lost (Mitsch 2005; Neue *et al* 1997). The degradation and loss of these ecosystems all over the world, and the subsequent recognition of their ecological value, have led considering the restoration of wetlands as a top priority (MA 2003). According to the Society for Ecological Restoration (SER 2004), restoration attempts to return ecosystems to their historical dynamics trajectory. Nevertheless, the historical dynamics trajectory can prove hard or even impossible to determine with accuracy according to how deeply the ecosystem was impacted. So the use of reference sites/ecosystems that can serve as models for designing ecological restoration projects and later assessing restoration success is of primary importance (SER 2004). Reference sites should be located in the same edaphic, climatic and historical zone as the restoration project, and should be exposed to similar natural disturbances (SER 2004). Usually, ecosystems that require ecological restoration are degraded, damaged or transformed as a direct or indirect result of human activities. But when ecosystems have been entirely destroyed, one can wonder how to find the appropriate strategy for estimating restoration success?

Various authors suggest that restoration success could be based on the survey of one ecosystem component such as vegetation structure (Matthews *et al* 2009; Spieles 2005; Stefanik and Mitsch 2012), hydrological characteristics (Hohensinner *et al* 2007) or macro-invertebrate communities (Spieles *et al* 2006), while others promote a more integrated approach including many variables in order to provide a better assessment of restoration success (Andersen *et al* 2006; Hobbs and Norton 1996; Passoni *et al* 2009), with only few monitoring of the dynamics edaphic properties (soil changes) (Andersen *et al* 2006; Barton *et al* 2008; Harris 2003; L. Rousseau *et al* 2004; Moreno-Mateos *et al* 2008; Passoni *et al* 2009).

This study focuses on the ecological restoration of a gravel-pit in the low valley of the Seine estuary (France). Restoration consisted in filling the gravel-pit with dredged sediments from the Seine River and topping it with submetric alkaline peat layer extracted from adjacent meadows prior to their exploitation. The Seine is among the most densely navigated river connecting the seaport “le Grand Port Maritime du Havre” with the inland port “le Grand Port Maritime de Rouen” (Guézennec 1999; Samson *et al* 2002). Nevertheless, sediments in suspension brought from upstream by river currents are often deposited in downstream under the tidal action lead to a silting of estuaries or navigation channels (Van den Bosch 1988). Thus, dredging and disposal of dredged material constitutes one of the most important

concerns in the Seine river (Even *et al* 2007; Guézennec 1999; Samson *et al* 2002). Samson *et al* (2002) reported that over 5 million tons of materials are annually dredged to maintain the Seine river navigability. These dredged sediments are predominantly composed of silt, clay, and fine sand (Guézennec 1999; Samson *et al* 2002). In parallel, open-air mining activity is an important industrial activity in the Seine valley and plays an important role in terms of economic development (Guézennec 1999). Gravel extraction commonly causes gravel pit (Even *et al* 2007; Kondolf 1997; Samson *et al* 2002), which are usually converted into ponds dedicated to spare-time activities or habitats protection after exploitation. This experiment aimed at converting a gravel-pit with an objective to recreate wet meadows on the reconstituted soil.

This paper aims at (i) evaluating the evolution of soil properties in the reconstituted soil during the three first years and (ii) assessing the soil biota changes including earthworms, collembolan and microbial communities. To address these questions, the properties of the Reconstituted Soil (RS) were compared to those of an undisturbed soil corresponding to the initial soil before gravel extraction and considered in this case as a Control Soil (CS). We hypothesized that physico-chemical properties in the reconstituted soil did not change drastically during the three early years in contrast to properties related to soil biota.

Methods

Site description

The experiment was conducted in the gravel-pit of Yville-sur-Seine, North-West France (49° 29' 05" N; 00° 52' 31" E) (Fig. 5.1), with a temperate oceanic climate. Temperature increases from January (average minimum -5°C) to July (average maximum: $+27^{\circ}\text{C}$). The gravel pit located in the commune of Yville-sur-Seine (11 ha of area and one million cubic meter) was firstly filled with sediments dredged from the Seine between 2000 and 2007 (~ 684 568 Tons of dry mass). Sediments were, then covered with alkaline peat in February 2008 (considered as the time 0 **T0** i.e. the date of the end of the filling). The hydraulic dredge worked by sucking a mixture of dredged material and water from the channel bottom. In order to facilitate sediments pumping, the amount of water sucked up with the material was controlled to ensure the optimal mixture (90% water/10% sediments) for transport. This work was carried by a pipeline dredge, which sucked the sediments through one end of an intake

pipe, and then pushes it out the discharge pipeline directly into the gravel-pit. The excess water in the gravel pit was subsequently pumped back to the Seine River by another pipeline.

The CS was located under a meadow next to the RS (Fig. 5.3). It was an “HISTOSOL mésique recouvert” according to the “Référentiel Pédologique” (AFES 2009), or Hemic Histosol according to the World Reference Base for soil resources (WRB 2006). It was considered as a control because it is representative of the soil before the mining activity started. The CS profile is composed of a mineral Aca horizon in the top 10 cm (Aca horizon with 19.5% organic carbon (in weight?), 45% clay content, and 50% silt content), a thin layer of mineral GoGr characterized by hydromorphic features in its middle (with 9.3% organic carbon, 52.7% clay content within 20 cm depth) and a deep histic H horizon (30% organic carbon in weight) (Table 5.2).

Pedological monitoring

In December 2008, soil was sampled in the reconstituted soil (RS) and Control soil (CS) (e.g., representative of the former state of soil before extraction of gravel). The physico-chemical analyses were monitored in December 2008 (10 months after the end of operation; **T0 + 10**) and July 2011 (32 months after the end of operation; **T0 + 32**) on a regular grid made of 52 geo-referenced points (Fig. 5.2). All physico-chemical analyses were conducted on the soil surface layer (0-10 cm).

For chemical analyses, soil samples were placed in sterilised plastic bags and stored at 4°C in the dark until analysis. In the laboratory, soil samples were air dried and 2 mm sieved to remove roots, debris and stones. Soil pH was directly measured with a pH meter (Denver Instrument, model 215) in a 1:5 soil:water mixture which was prior to measuring shaken during 1 hour and then stabilized for 1 hour. A sub sample of the dried soil was ashed to determine the cationic exchange capacity CEC using the Metson method (standardised method AFNOR NF X 31-130). Total C and N content were determined following the CHN method, and finally the total P (TP) was determined according to the Joret-Hébert methods (standardised method AFNOR NF X 31-161).

Maps analyses using interpolation method were performed by ArcView 10.1 software (ESRI 2010; Korfel *et al* 2010) and the extension of Spatial Analyst (ESRI 2010). The interpolation method uses IDW (Inverse Distance Weighting) by manipulating the exponent

value, which relies on the hypothesis that the points near other are similar advantage as more distant points. Also, it is well adapted to data regularly distributed along sampling grids.

Soil biota monitoring

In order to understand the biological functioning of RS, we followed several biological groups (macrofauna, mesofauna and microorganisms). Known to have high dispersal abilities, macrofauna (Earthworms communities) and mesofauna (Collembola communities) were surveyed during the three first years. However, for practical and methodological reasons, soil microbial communities sampling was performed so only once during soil survey.

Earthworms communities

Soil samples were collected from RS and CS in spring 2008, 2009, 2010, and 2011 (Fig. 5.2). Earthworm communities were sampled using hand sorting methods in 0.0625 m² (25 * 25 cm) in 2008 for CS and in 2008, 2009, 2010, and 2011 for RS. In both sites, the earthworms communities were described in six points dispatched along two transects by site. The 0.0625 m² quadrats were marked on the soil surface and separated by a minimum distance of 15 m to avoid autocorrelation. Soil was then dug to a depth of 30 cm, and earthworms were hand stored, fixed in 4% formalin until identification in the laboratory, which was performed following Sims and Gerard (1999).

Collembola communities

6 cm diameter and 15 cm deep pitfall traps filled with ethylene glycol-based antifreeze (Six *et al* 2004) were used to collect surface dwelling springtails (Bengtsson *et al* 2003; Franzluebbers 2006; Six *et al* 2004). 12 pitfalls were placed in spring 2008 for CS and 9 pitfalls in spring 2008, 2009, and 2010 for RS with a distance of 20 meters between each trap (Fig. 5.2). Pitfall traps were emptied after 7 days of activation. Collected arthropods were washed before being stored in 70% ethanol. Surface-dwelling springtails were thus counted under a stereomicroscope and then determined to species level under a microscope (magnification X400) using the following keys (Gisin 1960; NIST 2005; Wiley 2009).

Pitfall traps are known to gather valuable information on activity and relative abundance of various groups of ground-dwelling arthropods but inaccurate data on their absolute abundance and density (Kinnunen *et al* 2001; Lang 2000). We thus expressed results (i.e. number of individuals per trap) as activity of surface-dwelling collembola. Furthermore, mean species richness were determined for a particular site of a particular year.

Microbial community

In the literature, several studies reported that restoration success can be quantitatively estimated by measuring the soil microbial community structure (Andersen *et al* 2006; Harris 2003; Izquierdo *et al* 2005). Among the methods available to study the composition and the structure of the soil microbial communities, the analysis of the soil micro-organisms phospholipid fatty acid (PLFA) is a biochemical method that has the advantage to not rely on culturing of micro-organisms (Merilä *et al* 2002). Based on the variability of fatty acids present in cell membranes of different organisms, this method provides information on the microbial community composition based on groupings of fatty acids (Merilä *et al* 2002). The PLFA analysis has been widely used to study community structure and is a widely accepted tool to detect the effect of various environmental stresses in the soil as it has been found to be more discriminatory than other methods such as culturing micro-organisms.

Soil samples were collected from RS and CS in December 2012. For RS, four sampling zones were distinguished taking into account the topographic gradient (waterlogged condition) : (i) The interstratified Histosol (i.e. South-Eastern part of RS) without waterlogged periods, annotated IH, (ii) The Hemic Histosol in the highest topographic level without waterlogged periods (i.e. South-West part of RS), annotated HH, (iii) The Hemic Histosol in the lowest topographic level with temporary waterlogged periods (i.e. North-West part of RS), annotated HH⁺ and (iv) The Hemic Histosol in the lowest topographic level with the longest waterlogged periods (i.e. North-Eastern part of RS), annotated HH⁺⁺ (Fig. 5.2). PLFA measurements were conducted on the topsoil layer (0-10 cm) in 5 zones (corresponding to 4 sub-plots in RS, and 1 plot in CS).

Microbial community structure was determined by analysis of group-specific phospholipid fatty acids (PLFAs) according to the protocol described by Fanin *et al* (2011). Briefly 5 g freeze dried soil weight of soil was extracted with a chloroform/methanol/phosphate buffer at pH 7.4 mixture (1:2:0.8 by vol) and the lipids separated into neutral lipids, glycolipids and phospholipids on a silicic acid column. The phospholipids were subjected to a mild alkaline methanolysis, and the fatty acid methyl esters were analyzed on a gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector (Agilent 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) with a 60 m x 0.25 mm x 0.15 µm DB-23 column (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) and by gas chromatography–mass

spectrometry (Shimadzu QP2010 plus, Shimadzu Corporation, Suzhou, China). FAMES were identified by spectra comparison and their identity was confirmed by comparing their mass spectrum with NIST (2005) and (Wiley 2009) databases. These comparisons were based on retention times available in the literature and by using a standard qualitative bacterial acid methyl ester-mix (BAME, Supelco, Supelco UK, Poole, Dorset, UK). For each sample, the abundance of individual PLFAs was expressed as $\mu\text{g PLFA g}^{-1}$ freeze-dried soil. Peak areas were quantified by adding methyl tridecanoate (C13:0) as an internal standard. Total microbial biomass (TotPLFA) was determined as the sum of all the extracted PLFAs. The sum of PLFAs considered to be predominantly of bacterial origin (i-C15:0, a-C15:0, i-C16:0, C16:1w9, C16:1w7t, i-C17:0, a-C17:0, C17:0, cyC17:0, C18:1w7 and cyC19:0) was used as an index of the bacterial biomass (BactPLFA) (Merilä *et al* 2002) (Table 5.1).

The quantity of C18:2w6 was used as an indicator of fungal biomass (FungPLFA), since 18:2w6 in soil is known to be of mainly fungal origin (Merilä *et al* 2002) and it is known to correlate with the amount of ergosterol (Merilä *et al* 2002) (Table 5.1), a compound found only in fungi. The ratio of FungPLFA/BactPLFA was used as an index of the ratio of fungal/bacterial biomass in the soil. The mol % is the individual PLFA area percentage of the total PLFA.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 2.10 (R Development Core Team. 2010). The standard errors and the means were calculated and were used to estimate variability of each parameter in the studies sites (RS and CS) and between dates (2008 and 2009-2010-2011). The normal distribution of the model residues (Shapiro-Wilk test) and the homoscedasticity of variance (Bartlett test) were checked and, in case of unconformity, data were transformed by $f(x) = \log_{10}(x+1)$. We used the analysis of variance (ANOVA) to test for site effects (the RS versus the CS) and time effect (post-restoration). Where significant differences between sites and time were indicated by ANOVA, we used a post hoc means separation test (Tukey's Honest Significant Difference) (P -value < 0.05) to determine which comparisons were significant. When non-homogeneity of variances appeared following log-transformations, non-parametric Kruskal-Wallis test were used to detect significant differences between sites or date.

Results

Pedological survey

Soil Type

The hydraulic infilling of gravel-pits has led to a spatial distribution of sediments that results in the formation of 3 types of reconstituted soils (RS) according to the “Référentiel Pédologique” (AFES 2009) (Fig. 3). An equivalent in World Reference Base for soil resources (WRB 2006) is given between brackets:

- (v) An “**ANTHROPOSOL RECONSTITUE / HISTOSOL mésique reconstitué sur sédiments de dragage**” (Hemic Histosol reconstituted on dredging sediment), the most represented soil which occupied 77 % of the recreated area: “HISTOSOL mésique”, mainly composed of organic soil material but the soil profile is composed of a histic H horizon on its surface (H horizon with 30% organic carbon in weight within a 55-cm depth), a thin layer of mineral Mca1 horizon in its middle (with 12% organic carbon, 83% sand content within a 25-cm depth) and a deep mineral Mca2 horizon (with 20% organic carbon, 31% silt content) (Table 5.2),
- (vi) An “**ANTHROPOSOL RECONSTITUE / HISTOSOL mésique interstratifié reconstitué sur sédiments de dragage**” (Interstratified Histosol reconstituted on dredging sediment) occupied 19 % of the recreated area: “HISTOSOL interstratifié”, characterized by a mineral Mca horizon in the top 10 cm (with 3.7% organic carbon in weight within a 10-cm depth) (Table 5.2). For this soil, the deeper horizons were similar to previous profiles, so for this reason only the topsoil has been analyzed.
- (vii) An “**ANTHROPOSOL RECONSTITUE / FLUVIOSOL sableux reconstitué sur sédiments de dragage**” (Fluvisol reconstituted on dredging sediment) that occupied only 4 % of the recreated area: ‘FLUVIOSOL reconstitué’, characterized by a mineral Mca horizon in the top 10 cm. Relatively to its small surface, this soil has not been analyzed.

Figure 5.1. (A) Map showing the location of RS in the Seine Estuary, (B) RS operation: stages of the filling.

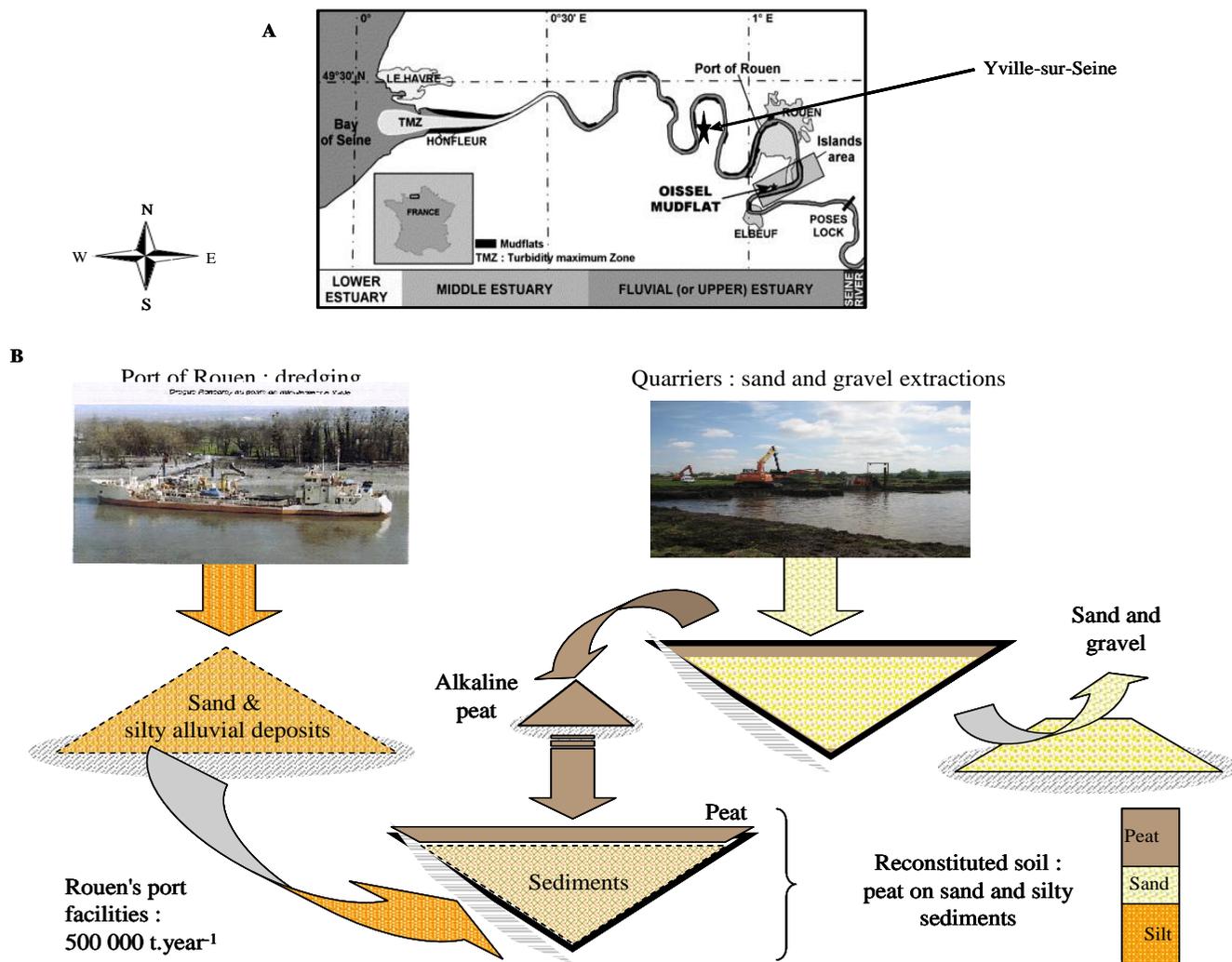


Figure 5.2. Sampling sites for soil properties, collembolan communities, earthworm communities, and PLFA in the RS and CS.

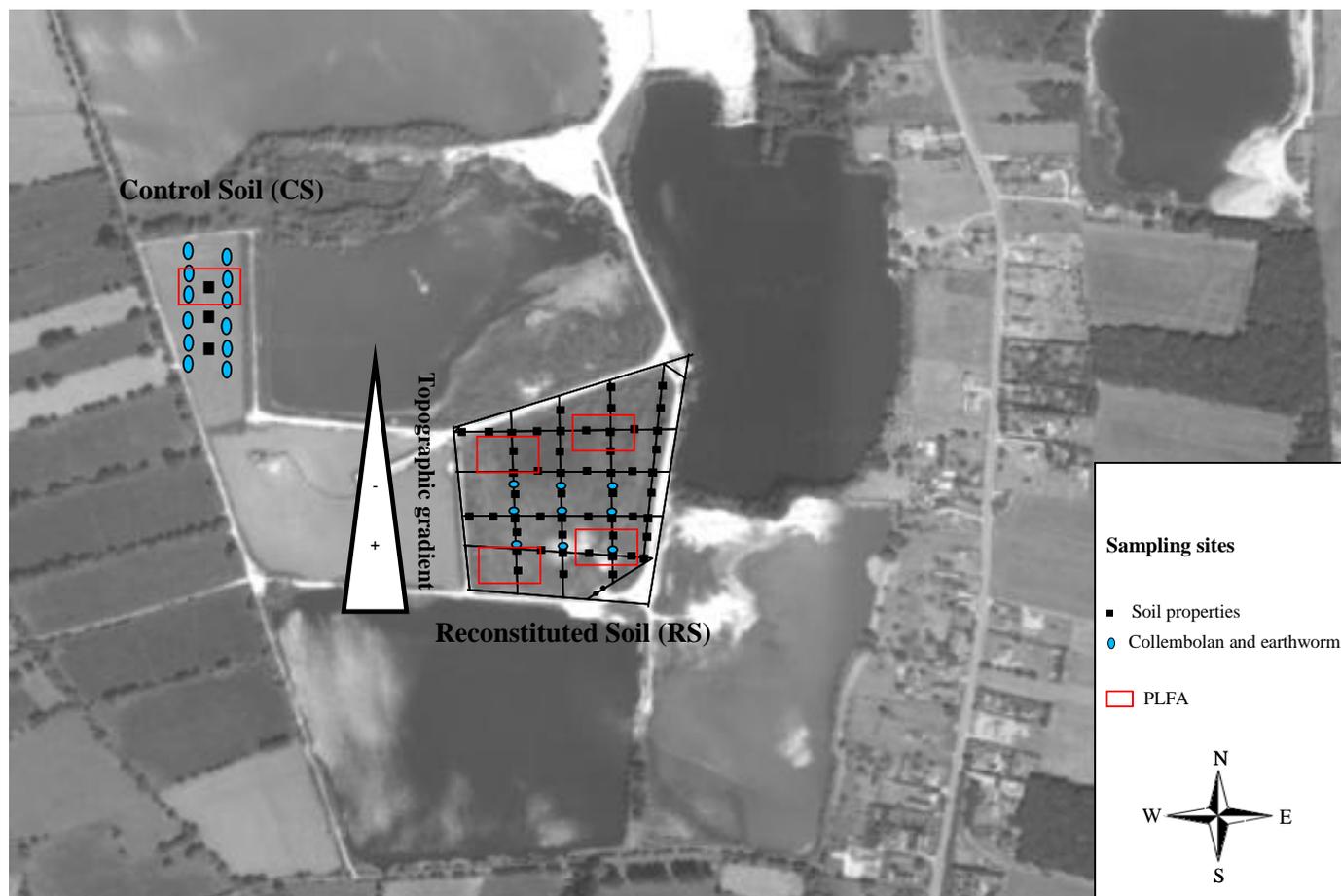


Table 5.1. Phospholipid fatty acids commonly used as biomarkers for specific groups of microorganisms.

PLFA type	Indicator for	Reference	Common PLFAs used as marker	Comments
Monoenoic unsaturated and cyclopropane unsaturated	Gram-negative bacteria	Merilä et al. (2002)	16:1w5c, 16:1w7c, 16:1w7t 16:1w9c, a16:0, cy17:0, 18:1w5c, 18:1w7c, 18:1w9c, cy19:0a	Occur in Gram-positive bacteria
Terminally branched and 10Me branched saturated	Gram-positive bacteria	Merilä et al. (2002)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, a17:0, i17:0, i18:0 10Me16:0	Occur in some Gram-negative bacteria (sulphate-reducers)
Saturated straight-chain (<20C)	Bacteria (non-specific)	Merilä et al. (2002)	14:0, 16:0, 18:0	
Polyenoic unsaturated	Fungi	Merilä et al. (2002)	18:2w6c (18:1w9c, 18:3w3)	Occur in other eukaryotes and in bacteria

Spatial distribution maps of soil properties

The spatial distribution was well structured (Fig. 5.4 and 5.5) for most of soil properties surveyed (i.e. topographic gradient, Organic carbon content, pH, CEC and C/N). 2 major areas can be distinguished in agreement with the soil type: (i) the first area characterized by high organic carbon content, C/N, CEC and acidic pH and (ii) the second area characterized by low organic carbon content, C/N, CEC and basic pH.

The spatial distributions of all soil properties have generally showed an increasing gradient from south to north, except for the pH which increased from north to south. The spatial distribution of soil organic carbon exhibited a gradient south to north (average organic carbon of 35 g.Kg⁻¹ in south to 350 g.Kg⁻¹ in north). These spatial distributions were the same in the CEC, where the average CEC was 14 Cmol⁺/Kg in south to 100 Cmol⁺/Kg in north. The highest soil C to N ratio was found in the north as a result of the high organic carbon content. Three years after restoration, however, no significant differences of spatial distribution of soil properties were apparent.

In 2008, topography exhibited a slope south down to north (from 6.6 m in north to 8.2 m in south) (Fig. 5.4). In 2011 (after 3-years restoration), the topographic gradient in RS was lowered from primary level (from 10 to 60 cm) (Fig. 5.5).

Biological survey

Earthworms communities

During the first two years of restoration (from mai 2008 to mai 2011), few earthworm were sampled in RS (3 ind.m⁻² in 2008). After 3 years of restoration (mai 2011), the density of earthworms was multiplied by 30 (from 3 in 2008 to 83 ind.m⁻² in 2011). Although, it was still significantly lower than that found in CS (276 ind.m⁻²). Earthworm density measured in CS was more than 3 times greater than RS (Fig. 5.6A). In 2011, a total of 3 earthworm species was identified in RS: the most frequently identified species were the *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826), *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) and *Lumbricus festivus* (Savigny, 1826) with 33%, 12% and 6% of abundance respectively (Table 5.3). The first species (*Allolobophora chlorotica*) is present in its typical variant of wet meadows, and appeared since 2008. The third species (i.e. *Lumbricus festivus*) is an uncommon species in wet meadow, and appeared only 2011 (3 years after restoration).

However, 3 years after restoration, the number of earthworms species in RS remains lower than in CS; Indeed, For the CS, the number of earthworms species measured in 2011 was more than twice greater than in RS (Fig. 5.6B).

Collembolan communities

The total number of collembolans increased since t0 (Fig. 5.7A). 2 years after restoration (2010), the density of collembolan was multiplied by 30 (ranging from 4.66 in 2008 to 145 ind.m⁻² in 2010). However, it still is significantly lower than in CS (274 ± 104 ind m⁻²). A total of 14 collembolans species was identified from soil samples in RS (Annexe 2). The most frequent identified species were *Lepidocyrtus cyaneus* and *Sminthurides aquaticus* with 29.5% and 24.1% of abundance (activity), respectively (Annexe 2). For the RS, the number of collembolan species listed 2-years after restoration (i.e. 2010) was more than 5 times greater than in 2008, which exceeds those measured in the CS (Fig. 5.7B)..

The Bray-Curtis Dissimilarity Index (similarity percentage) used to describe similarity between RS and CS showed an increasing value of similarity between RS and CS. The percentage of similarity measured in 2008 rose rapidly from 26.1 to approximately 42.6 in 2010 (Fig. 5.7C).

Microbial community structure

There were distinct differences in the relative abundance of PLFAs between CS and RS. The CS was characterized by relatively more PLFAs C16:1w9c and cyC19:0 whereas RS had more i-C15:0, a-C15:0, C16:0, cyC17:0, C18:2w6 and C18:1w9t (Table 5.4). Of these PLFAs, at least C18:2w6 can be attributed to fungi. It therefore seems that RS contains more fungi than CS, which in contrast contains more biomass of Gram-negative bacteria. Also, 3-years after restoration, the CS had the highest TotPLFA and BactPLFA concentration, while the lowest one was observed in the IH (Table 5.5). The TotPLFA value measured in the CS (43483 ng/g dry soil) was more than ~2, 10 and 2 times greater respectively, than the HH⁺⁺, the IH and the HH⁺. There were distinct differences in the relative abundance of PLFAs between the RSs (i.e. IH, HH, HH⁺, and HH⁺⁺) (Table 5.5). We observed that PLFAs for the IH were significantly lower than for the 3 others sampling zones, i.e., HH, HH⁺, and HH⁺⁺. FungPLFA values in the HH were significantly higher than other soils. The FungPLFA value measured in the HH (~ 3698 ng/g dry soil) was more than 2-3, 5 and 14 times greater respectively, than CS, the HH⁺⁺ and the IH. The HH⁺⁺ had the lowest FungPLFA and FungPLFA/BactPLFA ratio (Table 5.5).

Figure 5.3. Soils type

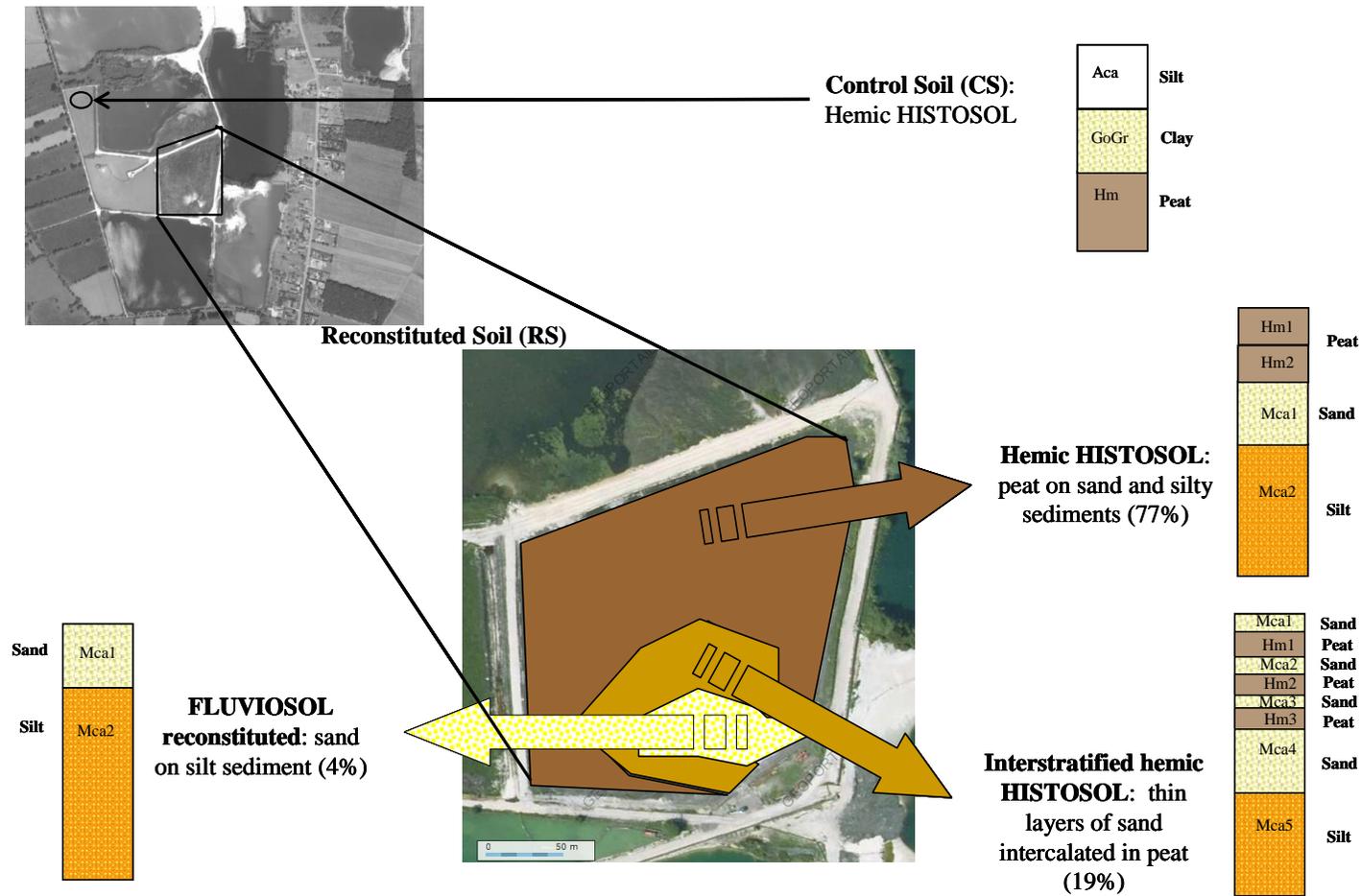


Table 5.2. Physico-chemical properties of the soils surveyed in this study. A symbol indicates used methods in physico-chemical analysis.

Sites	Soil type	Horizon (AFES, 2009)	Depth (cm)	pH ^a	Org ^b C (g/Kg)	Total N ^b (g/Kg)	C/N	CEC ^c (cmol+/Kg)
Recreated	Hemic Histosol reconstituted	Hm1	0 – 30	7.27	300	18.2	16.5	112
		Hm2	30 – 55	7.01	308	17.7	17.4	102
		Mca 1	65 – 90	8.02	11.6	0.612	19	5.3
		Mca 2	> 90	7.92	19.7	1.19	16.5	6.7
	Interstratified Histosol reconstituted	Mca	0-10	7.98	37	3,0	13	14,0
Control	Hemic Histosol	Aca	0-10	7.42	194.6	19	10	67
		GoGr	10-30	7.76	93.3	10	9	48
		Hm	30-50	7.16	304.3	21	15	119

(a) pH H₂O (1:2.5 soil/deionized water); (b) Organic carbon (after decarbonation) and total nitrogen were measured by CHN elementary analysis; (c) determination of the cationic exchange capacity by the metson method; (d) granulometry by the Robinson pipette method.

Figure 5.4. Spatial distribution of soil properties in 2008. Scale bar shows the extent of the estimated properties.

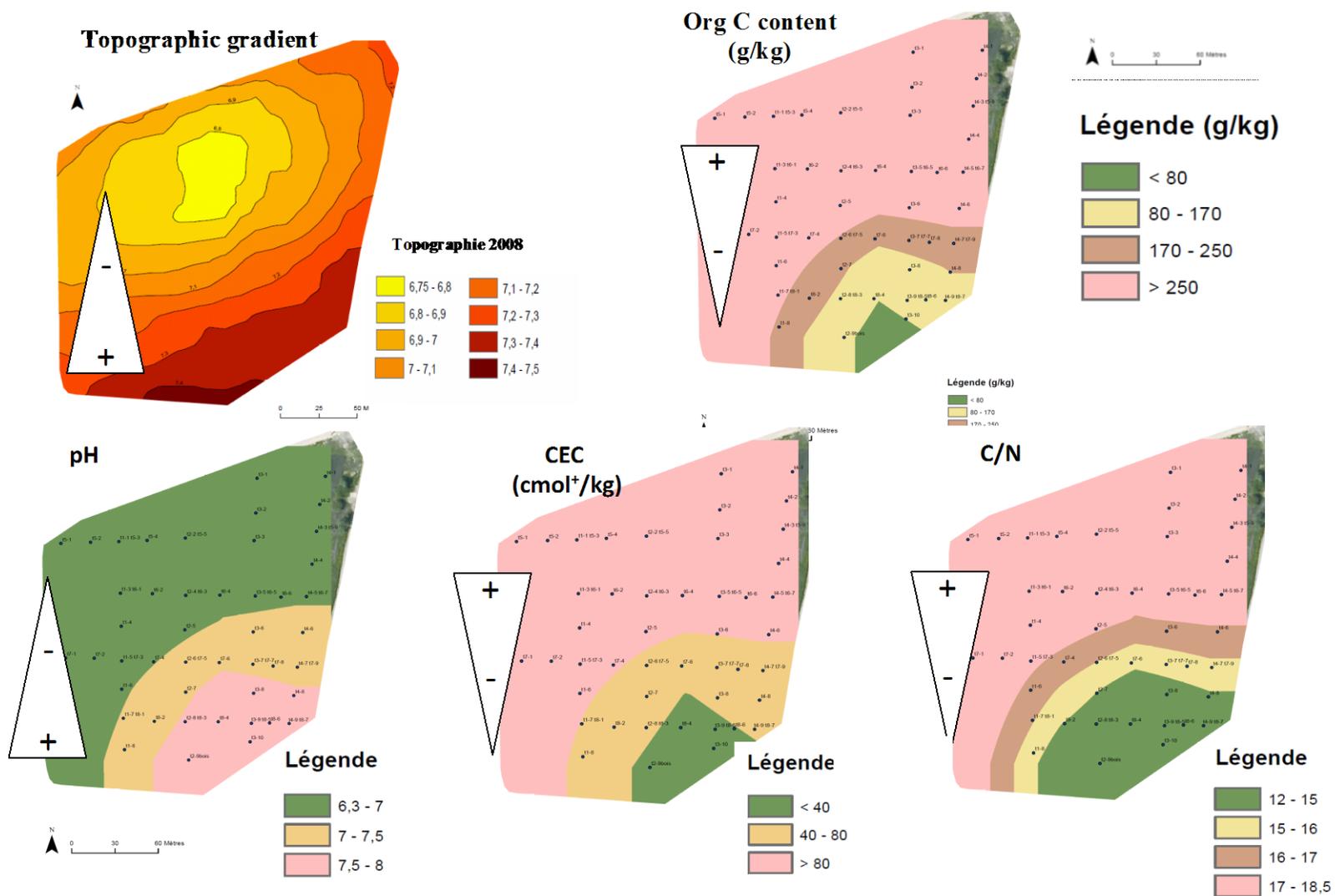


Figure 5.5. Spatial distribution of soil properties in 2011. Scale bar shows the extent of the estimated properties.

Discussion

Pedological survey

The results of this study of reconstituted soil (RS) with dredged sediments covered with alkaline peat in a gravel-pit of the Seine estuary represent to our knowledge the first documentation of soil and biological developmental rates in these conditions. Among RS, two major areas can be distinguished according to soil types: (i) a first area in the North and South-West characterized by high values of organic carbon content, C/N, CEC and acidic pH and (ii) a second area located exclusively in the South-East characterized by low values of organic carbon content, C/N, CEC and basic pH. This repartition is an obvious consequence of the hydraulic way that the gravel-pit was filled. During filling operation, the pipeline end was located in the South-Eastern part of RS. Sand heavier than peat remained at the bottom of the pipeline while peat was floating farther. This explains the formation of two major areas (peat material in North and sand in the South) with different topographic levels.

Three years after restoration, however, no significant difference of spatial distribution of soil properties has emerged. This may be attributed to the short-term survey. Our results are similar than the study of Craft (2000) which used soil physico-chemical survey to estimate restoration success. They studied the development of wetland soil characteristics and benthic invertebrate communities in created salt marshes in North Carolina ranging in age from 1 to 25-year-old, and reported that restoration of salt marsh vegetation requires 5 to 10 years, and restoration of soil C, N and bulk density over 25 years. Comin *et al* (2001) reported that vegetation restoration probably takes over 15 years, and restoration of soil characteristics may be even longer.

Biological survey

Earthworm communities

Earthworms are one of major contributors to ecosystem functioning and are crucial components of temperate soil invertebrate communities because they contribute in organic matter decomposition, mix and aerate the soil, contribute to local microbial activity, and aid nutrient cycling (Blouin *et al* 2013; Carrington and Diaz 2011).

For RS, our results showed that earthworm density did not change in the first 2 years following soil restoration. However, 3-years after restoration (i.e. 2011), a sharp clear increase

Figure 5.6. (A) Abundance of earthworms assemblages in RS and CS along the first three years of restoration and (B) earthworm species in CS and RS ; different letters indicate significant differences at $p=0.05$.

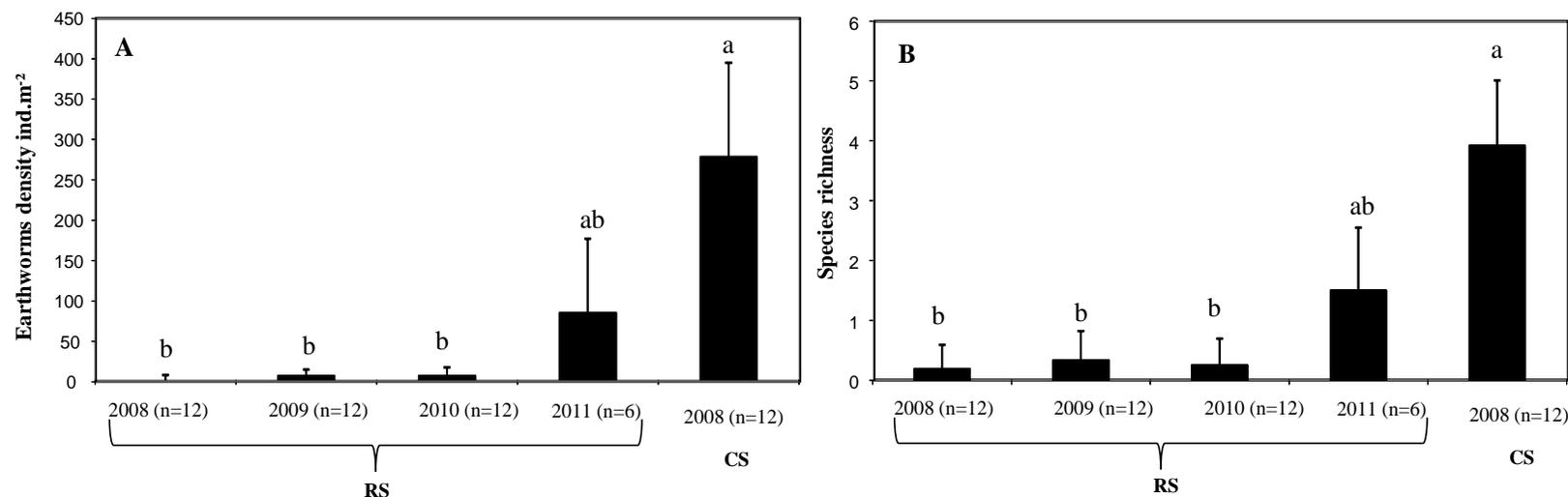
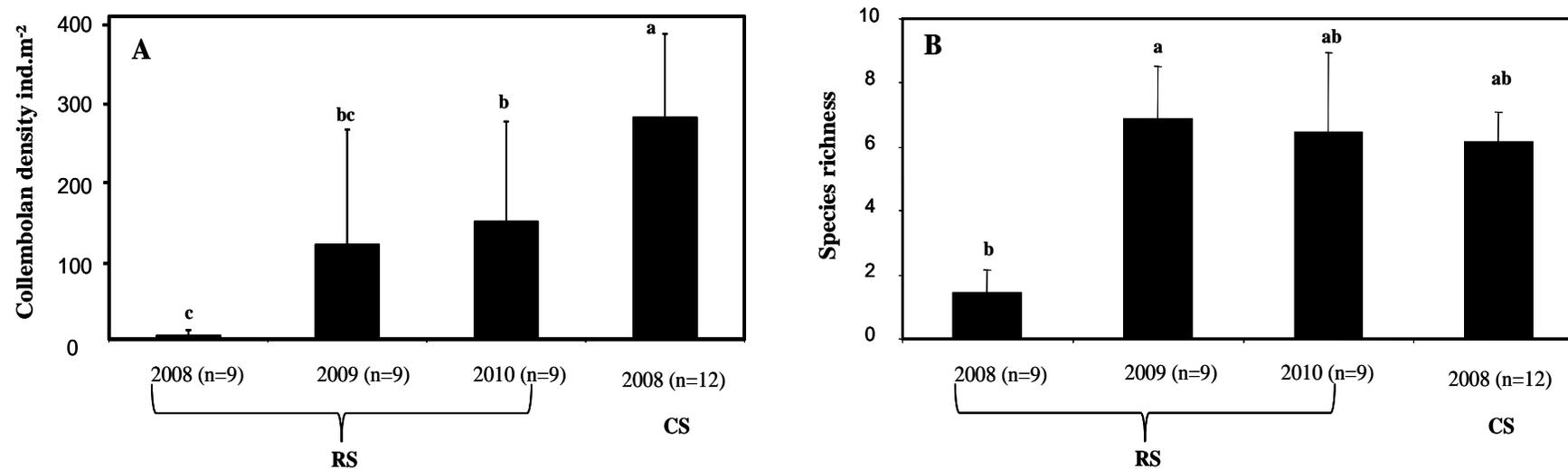


Table 5.3. List of earthworm species collected during the study.

Species name	CS		RS		
	Spring 2008	Spring 2008	Spring 2009	Spring 2010	Spring 2011
<i>Aporrectodea caliginosa</i> (Savigny 1826)	X				
<i>Allolobophora chlorotica</i> (Savigny 1826)	X	X		X	X
<i>Aporrectodea rosea</i> (Savigny 1826)	X				X
<i>Lumbricus festivus</i> (Savigny 1826)	X				X
<i>Lumbricus terrestris</i> (L. 1758)	X			X	
<i>Aporrectodea longa</i> (Ude 1885)	X				
<i>Dendrobaena pygmaea</i> (Savigny 1826)	X				

Figure 5.7. (A) Abundance of collembolan assemblages in RS and CS along the first three years of restoration, (B) mean collembolan species richness in CS and RS and (C) Similarity percentage (Bray-Curtis Dissimilarity Index) of collembolan assemblages between CS and RS ; different letters indicate significant difference at $p=0.05$.



C

	RS		
	2008	2009	2010
CS	26.1	38.5	42.6

Table 5.4. Mol % of phospholipid fatty acids (PLFA) in the different site types shown as means of the measurements.

Site	C12:0	C13:0	C14:0	i-C15:0	a-C15:0	C15:0	i-C16:0	C16:1w9c	C16:0	i-C17:0	cyC17:0	C17:0	C18:2w6,9	C18:1w9c	C18:1w9t	C18:0	cyC19:0	C19:0
IH	0,11	0,19	0,33	16,47	10,94	1,34	5,80	19,47	25,97	0,95	2,38	0,19	2,52	0,49	4,84	1,46	3,58	0,00
HH	0,00	0,01	1,72	9,30	8,15	0,82	2,64	12,54	15,49	2,69	6,18	1,09	5,29	1,45	11,88	3,49	12,30	0,00
HH ⁺	0,00	0,04	1,49	10,97	10,72	0,91	3,42	18,40	21,06	3,81	7,80	1,27	5,90	2,50	12,19	4,35	20,98	0,52
HH ⁺⁺	0,06	0,05	2,07	10,70	10,70	1,30	3,84	0,00	21,43	3,62	7,55	1,58	2,81	2,12	13,79	4,45	18,10	0,41
CS	0,05	0,02	0,88	7,19	5,73	0,54	2,61	13,82	10,70	2,52	3,49	0,57	2,38	1,43	6,63	2,48	13,97	0,20

Table 5.5. Mean and S.E. (n=3) for total, bacterial and fungal PLFAs and ratio of fungal and bacterial PLFAs in RS and CS. Letters indicates significant differences between zones according to kruskall-wallis and ANOVA Tukey's test (p<0.05, n=3).

	Reconstituted Soil (RS) after 3 years								Control Soil (CS)	
	IH		HH		HH ⁺		HH ⁺⁺		Mean	S.E
	Mean	S.E	Mean	S.E	Mean	S.E	Mean	S.E		
TotPLFA (ng . g⁻¹.dry soil)	4270,27 b	96,21	43815,38 a	6331,12	21652,41 ab	10182,51	27740,64 ab	11040,44	43483,05 a	17915,13
BactPLFA (ng . g⁻¹.dry soil)	2933,63 c	3114,44	28413,68 ab	3908,93	14538,25 b	6413,39	18467,98 b	6927,31	32141,64 a	13821
FungPLFA (ng . g⁻¹.dry soil)	259,16 b	214,3	3698,08 a	1227,52	1393,26 ab	1213,21	682,98 b	419,84	1410,27 ab	763,5
BactPLFA/TotPLFA	0,69	32,37	0,65	0,62	0,67	0,63	0,67	0,63	0,74	0,77
BactPLFA/TotPLFA	0,06	2,23	0,08	0,19	0,06	0,12	0,02	0,04	0,03	0,04
FungPLFA/BactPLFA	0,11	0,05	0,13	0,05	0,09	0,06	0,03	0,01	0,04	0,01

of their density of earthworms was observed. The density of earthworms was multiplied by 30. This was likely due to the direct and indirect effect of plant species on soil organisms. The direct effect of plant species on soil organisms are caused by the plant's inputs of organic matter above and below the ground, while indirect effect of plants on biota include soil protection and uptake of water and nutrients by the root. Vegetation survey (data not shown) shows a quick return and high species richness since the first years of restoration, which can increase the amount of plant debris (litter). Indeed, the quality of organic matter appears to be a major factor influencing earthworm communities (Chaudhuri *et al* 2003). They demonstrated that the quality of litter influences the size, the species composition and growth rate of earthworm population. (Chaudhuri *et al* 2008) studied the impact of age of rubber plantation (3, 10, 14, 20, and 25 year-old plantations) on earthworm communities in West Tripura (India), which reported that with aging of rubber plantations both the densities and biomasses of earthworms increased. More particularly, they found that the high level of polyphenol, flavonoids and lignin in the litters of 3 and 10 year-old rubber plantation through their effects on food quality probably resulted in low biomass of earthworms.

3-years after restoration, RS still provided less earthworm density than that found in CS. This can be attributed to several factors including soil characteristics (soil structuration and texture) (Blouin *et al* 2013; Carrington and Diaz 2011), litter (plant cover) (Chaudhuri *et al* 2003) and root density (Chaudhuri *et al* 2008).

Collembolan communities

Our study revealed significant changes in collembolan community during soil restoration. The two coarse collembolan parameters (abundance and mean species richness) had their highest values 2 years after restoration (2010). At that time, RS supported a much higher total richness (+ 75%) than CS. *Sminthurides aquaticus* is a typical species of wet meadow, which appeared since 2009 (i.e. 1-years after restoration), is absent in the CS. These results can be attributed to the fact that RS affected these communities through changes in the degree of opening. Indeed, in the RS each area is unique because the soil, the vegetation and the environment differ significantly from others areas. These differences are very likely to be causally linked to the filling way of the gravel-pit. It was filled hydraulically, hence the formation of 4 zones with different soils characteristics and topographic levels (i.e. waterlogging conditions). Therefore, habitat specialization and dispersal ability can strongly influence patterns of post-restoration succession in soil fauna (collembolan communities).

Microbial community structure

Among RS, the IH (i.e. the southern eastern part of RS) did not behave in quite the same way as the other reconstituted soils regarding TotalPLFA, FungPLFA, BactPLFA and FungPLFA/BactPLFA. This is might be the result of the way that the filling way of the gravel-pit, indeed the IH was characterized by low organic carbon concentrations, a high topographic level and a sandy texture.

The HH, HH⁺, and HH⁺⁺ soils were characterized by high organic carbon concentration (more than 30%) and only differed by their topographic level which ranked HH > HH⁺ > HH⁺⁺. FungPLFA values varied widely between RSs; indeed FungPLFA in HH was ~3 and ~5 times greater than respectively, HH⁺ and HH⁺⁺. The FungPLFA was consistently less abundant in flooded than non-flooded plots, agreeing with the assumption based on previous studies (Borga *et al* 1994; Bossio and Scow 1998) that fungi are less important under submerged conditions. Bossio and Scow (1998) studying the effect of carbon and flooding on soil microbial communities found that flooding resulted in a decrease in monounsaturated fatty acids and the fungal fatty acid 18:2w6.

FungPLFA values were significantly higher in the HH than the CS. The effect of soil organic matter quality on microorganisms structure has been discussed in the literature (Ananyeva *et al* 2006; Andersen *et al* 2006). Andersen *et al* (2006) demonstrate that the high concentration in humic acids and other recalcitrant compounds in restored sites influence microbial activity.

Among RSs, the IH soil did not behave the same way as the other soils regarding Mol % of phospholipid fatty acids (PLFA). PLFA results allowed us to evidence a great variability within RSs between IH, HH, HH⁺, and HH⁺⁺. This is due to several factors such as the way that the gravel-pit was filled, the topographic gradient (i.e. waterlogging conditions), and plant cover. New ecosystem development such as vegetation and nutrient changes and water table level could lead to the colonization and succession of microbial community structure with soil development. Harris *et al* (2006) reported that we can assess the success of restoration by measuring characteristics of the microbial community. They also suggests that the measurements of the soil microbial community coupled with functional profiles yield sufficient data upon which to base management decisions.

Conclusion

In this article, we showed that the diachronic monitoring of soil and biological characteristics is efficient to assess if typical wetland soil and biological characteristics are reached in RS. The results of this study are following:

- It appears that soil physicochemical properties in RS need long time (more than 3 years) to change.
- Three years after restoration started, the survey of earthworm communities revealed a sharp increase of earthworms density in RS, but it remains less than the CS. Typical earthworm specie (i.e. *Allolobophora chlorotica*) of wet meadow were restored in RS since 2008. 3-years after restoration, the abundance and species composition of earthworm communities remain lower than the CS.
- A significant change of collembolan communities during soil restoration was observed. Our results clearly indicate that RS support a higher total richness (+ 75%) than CS. Typical collembolan species (i.e. *Sminthurides aquaticus*) of wet meadow appeared in RS since 2009 (i.e. 1-year after restoration), which are absent in the CS.
- Three years after restoration started, the survey of microbial communities revealed that the CS was characterized by relatively more Gram positive bacteria whereas the RS had more species of microorganisms (Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, and Fungi).

Acknowledgements

We would like to thank the Platform for Chemical Analysis in Ecology of the “SFR 119 Montpellier Environnement Biodiversité”, at the “Centre d’Écologie Fonctionnelle et Évolutive” (CNRS, Montpellier, France). We are also grateful to Philippe Delporte and Jordan Guiz for help with field sampling and laboratory analyses and Ludovic Henneron for statistical analyses. Financial support for this research was provided by the Yville project funded by the “Grand Port Maritime de Rouen (GPMR). We would also like to thank Ghazi Abu Rumman and Mounia Ahmed for their language corrections of the manuscript.

Chapitre 6

The use of dredged sediments for soil creation in the Seine Estuary (France): importance of a soil functioning survey to assess the success of wetland restoration in floodplains.

C. Mchergui¹, M. Aubert¹, B. Buatois³, M. Akpa-Vinceslas¹, E. Langlois¹, C. Bertolone², R. Lafite⁴, S. Samson², F. Bureau^{1*}.

¹ *Normandie Univ, UR, ECODIV-EA 1293, Fédération de Recherche SCALE-FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.*

² *Service environnement du Grand Port Maritime de Rouen, 34 boulevard de Boisguilbert, F-76022 Rouen Cedex 3.*

³ *CEFE 1919, route de Mende, campus du CNRS, 34293 Montpellier 5.*

⁴ *Normandie Univ, UR, UMR 6143 M2C, Fédération de Recherche SCALE-FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France.*

Cet article est soumis le 14 Janvier à *Ecological Engineering*.

1. Introduction

Wetlands are among the most important ecosystems on earth. They are broadly defined by Mitsch and Gosselink (2000) as ecosystems providing substantial ecosystem services to human societies and also as having important ecological and environmental functions that contribute to human well-being. These include water quality improvement (Moreno et al.,

2007), biological productivity (Van Roon, 2012), and carbon (C) sequestration (Coletti et al., 2013; Wylynko, 1999). Nitrogen (N) cycling in wetlands has received considerable attention because of the potential of wetlands for decreasing Nitrogen inputs (Chen et al., 2009; Pinay et al., 2007). Nitrogen in wetlands is removed by both denitrification (Bachand and Horne, 1999; Mander et al., 2008) and plant uptake processes (Gottschall et al., 2007; Tan et al., 2013). Pinay et al. (2007) report that denitrification is one of the important processes occurring in the wetlands, which uses nitrogen oxides as alternative electron acceptors when oxygen is limited. Denitrification is the reduction of NO_3^- to nitrogen gaseous forms such as N_2O , and the main process responsible for the buffering capacity of riparian zones against diffuse nitrate pollution. Wetlands also play an important role in global C cycling by acting as natural C sinks (Bernal and Mitsch, 2008; Bridgham et al., 2006; Davidson and Janssens, 2006; Trettin et al., 2011). High C accumulation rates are related to their typically high vegetation productivity (Mitsch and Gosselink, 2000; Zhang et al., 2011) and low organic C decomposition (Coletti et al., 2013). Low C decomposition rates are promoted by waterlogged conditions that limit oxygen (O_2) diffusion through the soil, thus decreasing the efficiency of decomposition pathways (Mitsch and Gosselink, 2000).

However, owing to human activities, more than half of the wetland ecosystems that existed in the early 20th century have been lost (Mitsch, 2005; Neue et al., 1997). The degradation and loss of these ecosystems all over the world, and the subsequent recognition of their ecological value, has led to considering the restoration of wetlands as a top priority (MA, 2003). According to the Society for Ecological Restoration (SER, 2004), restoration attempts to return ecosystems to their historical dynamics trajectory. Nevertheless, the historical dynamics trajectory can prove hard or even impossible to determine with accuracy according to how deeply the ecosystem was impacted. So the use of reference sites/ecosystems that can serve as models for designing ecological restoration projects and later assessing restoration

success is of primary importance (SER, 2004). Reference sites should be located in the same edaphic, climatic and historical zone as the restoration project, and should be exposed to similar natural disturbances (SER, 2004). Usually, ecosystems that require ecological restoration are degraded, damaged or transformed as a direct or indirect result of human activities. However when ecosystems have been entirely destroyed, questions arise, such as (1) how to define a reference site in this case and (2) how to find the appropriate strategy for estimating restoration success. Various authors suggest that restoration success could be based on the survey of one ecosystem component such as vegetation structure (Matthews et al., 2009; Spieles, 2005; Stefanik and Mitsch, 2012), hydrological characteristics (Hohensinner et al., 2007) or macro-invertebrate communities (Spieles et al., 2006), while others promote a more integrated approach including many variables in order to provide a better assessment of restoration success (Andersen et al., 2006; Hobbs and Norton, 1996; Passoni et al., 2009). Nevertheless, few authors have attempted to use soil functioning as an indicator of wetland restoration success, although soils perform multiple ecological functions such as being a carbon sink and a nitrogen remover (Mitsch and Gosselink, 2000).

This study focuses on the ecological restoration of a gravel-pit in the low valley of the Seine estuary (France). Restoration consisted in filling the gravel-pit with dredged sediments from the Seine valley and covering it with alkaline peat from adjacent meadows. More than 5 million tons of materials are dredged annually to maintain and improve navigation within the Seine estuary. Consequently, dredging and disposal of these materials has become an important issue in the Seine Valley (Samson et al., 2002). In parallel, sand and gravel extraction is one of most important economic activities in the Seine floodplain (Guézennec, 1999). After their exploitation, extraction pits are commonly converted into ponds dedicated to spare-time activities or habitat protection. Extraction is the second cause for wetland loss in the Seine floodplains after damming. In the early 1990's, the "Grand Port Maritime de

Rouen’’, in collaboration with the ‘‘Parc Naturel Régional des Boucles de la Seine Normande’’, started considering the use of dredged sediments to fill borrow-pits as a promising solution to recreate soils aimed at supporting the development of terrestrial wetland ecosystems such as wet meadows or grasslands.

In this context, this paper aims to (i) survey the functions of recreated soil 3 years after the gravel-pit was filled and assess whether it regained typical wetland functionality and (ii) determine which soil functioning parameters are the most efficient for assessing restoration success. To address these questions, an approach combining analyses of *in-situ* and *ex-situ* soil functioning was used. For *in-situ* soil functioning measurements, we investigated soil respiration, soil net N-mineralization and soil denitrification, using soil CO₂ efflux measurement technique, the buried bag method and the acetylene inhibition technique, respectively. For *ex-situ* soil functioning measurements, we used heterotrophic respiration, potential C and N mineralization and potential soil denitrification using Substrate-Induced Respiration (SIR), laboratory incubations and Denitrification Enzyme Activity (DEA) methods, respectively.

We hypothesised that the speed with which the recreated soil reaches the functioning level of reference soils depends on (1) the nature of the materials used to reconstitute the soil (local dredged sediment and alkaline peat) and (2) the topographic position of the recreated soil within the floodplain system (waterlogging conditions and water-table fluctuations). A control soil corresponding to the soil before borrow extraction was used as reference soil to assess the recreation success.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The experiment was conducted in the gravel-pit of Yville sur Seine, North-West France (49° 29' 05' N; 00° 52' 31" E) (Fig. 6.1), located under a temperate oceanic climate. Temperatures increase from January (average minimum -5°C) to July (average maximum: $+27^{\circ}\text{C}$). The gravel-pit (11 ha surface and 1 million m^3 volume) was filled by pumping dredged sediments between 2000 and 2007 ($\sim 684\,568\,\text{m}^3$ of dry sediments), and then covered with characteristic alkaline peat from adjacent wet meadows in 2008. Mechanical dredges remove material by scooping it out from the channel bottom and then placing it onto a disposal area. Hydraulic dredges suck a mixture of dredged material and water from the channel bottom. The amount of water sucked up with the material is controlled to make the best mixture (90% of water and 10% of dredged sediments). Such work is carried out by pipeline dredges. A pipeline dredge sucks dredged material through one end (the intake pipe), and then pushes it out through the discharge pipeline directly into the disposal site. Excess water in the disposal area (the gravel-pit) is subsequently pumped back to the Seine River *via* another pipeline.

The hydraulic filling of gravel-pits leads to a spatial distribution of sediments that results in the formation of 3 types of recreated soils (RS) according to the “Référentiel Pédologique” (Association Française pour l'Etude du Sol AFES, 2009). An equivalent in World Reference Base for soil resources (IUSS Working Group WRB, 2006) is given between brackets:

- (i) An “ANTHROPOSOL RECONSTITUE / HISTOSOL mésique reconstitué sur sédiments de dragage” (Hemic Histosol reconstituted on dredging sediment) occupied 77 % of the recreated area: alkaline peat on sand and silty sediments,
- (ii) An “ANTHROPOSOL RECONSTITUE / HISTOSOL mésique interstratifié reconstitué sur sédiments de dragage” (Interstratified Histosol reconstituted on dredging sediment) occupied 19 % of the recreated area: thin layers of sand intercalated in alkaline peat,
- (iii) An “ANTHROPOSOL RECONSTITUE / FLUVIOSOL sableux reconstitué sur sédiments de dragage” (Fluvisol reconstituted on dredging sediment) occupied 4 % of the recreated area): sand on silty sediments.

2.2. Soil sampling strategy

Our study was conducted on recreated soil (RS) as compared to control soil (CS). The CS was characterised by a deep organic horizon (histic horizon H) covered by 30 cm of alluvial clay (Table 6.1). It was located under a meadow next to the RS (Fig. 6.1). It was an “HISTOSOL mésique recouvert” according to the “Référentiel Pédologique” (Association Française pour l'Etude du Sol AFES, 2009), or Hemic Histosol according to the World Reference Base for soil resources (IUSS Working Group WRB, 2006). It was considered as a control because it is representative of the soil before the extraction activity started. Indeed, it constitutes a reference standard for assessing the potential functional gains or losses of the recreated soil. A soil functioning survey was conducted at the same period in the RS (between May 2009 and March 2011).

For the RS, only the 2 spatially representative soil types are considered in this study: Hemic Histosol (HH) and Interstratified Histosol (IH). Four sampling zones were distinguished to take into account the topographic gradient and, correlatively, waterlogging conditions (Fig. 6.1) (i) Hemic Histosol in the highest topographic level without waterlogged periods, annotated **HH** (ii) Hemic Histosol in the lowest topographic level with temporary waterlogged periods, annotated **HH⁺** (iii) Hemic Histosol in the lowest topographic level with the longest waterlogged periods, annotated **HH⁺⁺** and (vi) Interstratified Histosol without waterlogged periods, annotated **IH**. All soil measurements were conducted on the topsoil layer (0-10 cm) in 5 zones (corresponding to 4 sub-plots in RS, and 1 plot in CS) (Fig. 6.1D).

2.3. Soil functioning: field survey

2.3.1. Soil respiration

Once a month, soil respiration rates were measured in 3 randomly selected locations in each plot (Fig. 6.1) from May 2009 to February 2011, using an EGM-4 environmental gas monitor (PP systems version 4.15) for CO₂ measurements. Monthly CO₂ measurements are expressed in g of CO₂ per m² per hr.

2.3.2. Inorganic N content and net N mineralization

Once a month, 3 randomly-taken soil replicates were sampled from each zone to measure inorganic N (NH₄⁺-N and NO₃⁻-N). Subsamples of 20 g of fresh soil from each soil sample were extracted with 100 ml 0.5 M K₂SO₄ solution and filtered through Whatman filter papers

n°42. Concentrations of inorganic N in the K₂SO₄ extract were determined colorimetrically (AA3, Bran + Luebbe, Norderstedt, Germany) (Anderson and Ingram, 1993).

Net N mineralization is the soil capacity to transform organic N from soil organic matter into inorganic N. Soil net N mineralization was measured *in situ* using the buried polyethylene bag method (Anderson and Ingram, 1993). Topsoil (0-10 cm) samples sealed in PVC bags were incubated *in situ* for 4 to 5 weeks. At the beginning and at the end of incubation, a subsample of 20 g of fresh soil from each soil sample was extracted with 100 ml of 0.5 M K₂SO₄ solution, and shaken at 100 rpm for 1 hr. The extraction products were filtered through Whatman filter papers n°42 and frozen (Hart et al., 1994). Filters were pretreated with 0.5 M K₂SO₄ in order to avoid any ammonium and/or nitrate contamination. NH₄⁺-N and NO₃⁻-N concentrations were determined colorimetrically (AA3, Bran+Luebbe, Norderstedt, Germany). Sub-samples (~30 g) were dried at 105°C for 24 hrs to obtain the gravimetric water content. The difference between final and initial levels of total inorganic N (NH₄⁺-N and NO₃⁻-N) is the rate of net nitrogen mineralization. Monthly net nitrogen mineralization rates are expressed as µg of N *per* g of dry soil.

Figure 6.1. (A) Localization of the restored gravel-pit in the Seine Estuary, (B) Aerial picture of the Recreated Soil (RS) at Yville (11ha), and Control Soil (CS), (C) schematic enlargement of RS, and illustration of the sampling methodology, and (D) sampling plots (RS and CS plots).

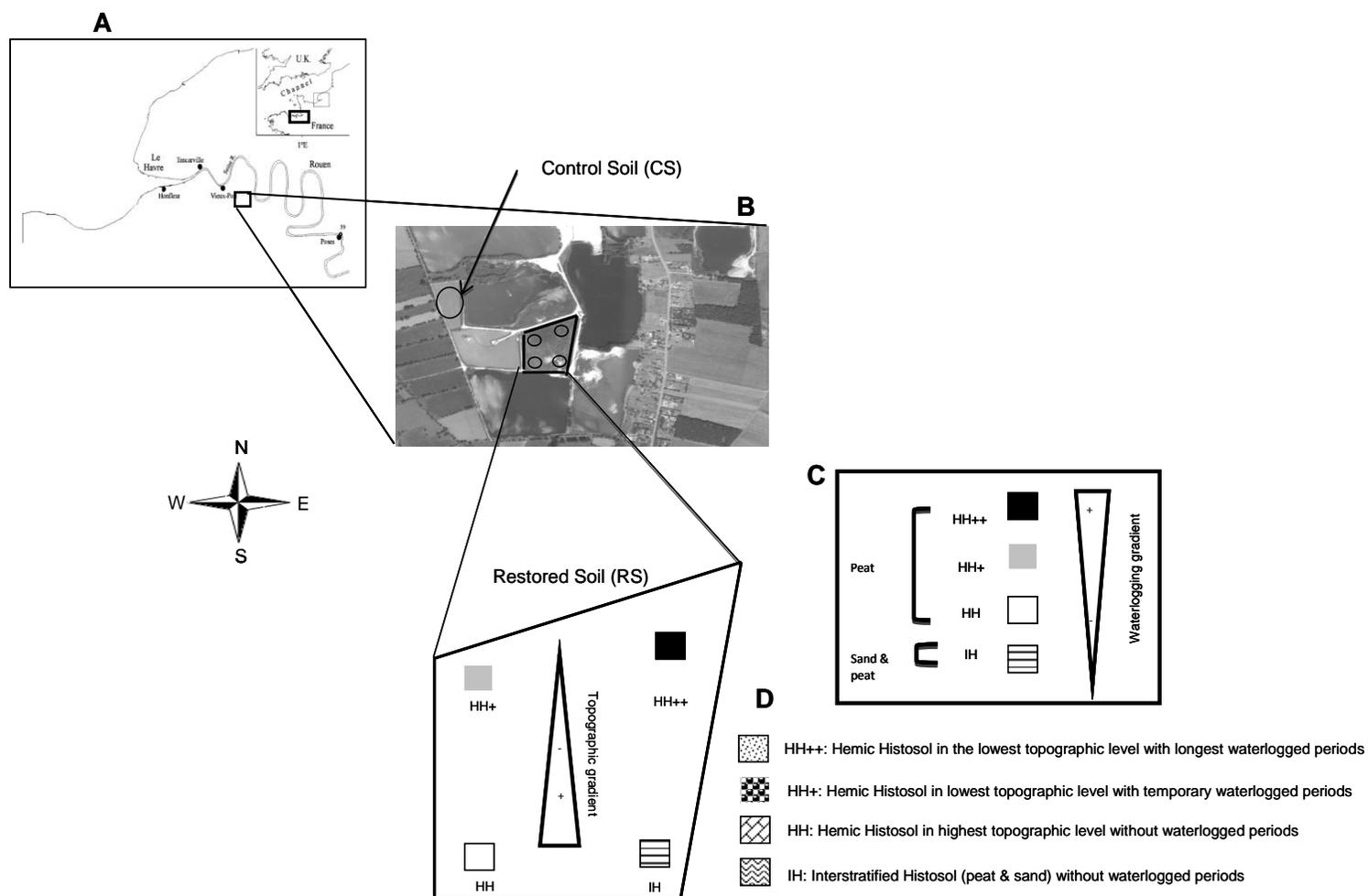


Table 6.1. Means value (and standard deviations, n = 3) of the physico-chemical analyses performed on each different soil profile.

Sites	Soil type	Horizon (AFES, 2009)	Depth (cm)	pH ^a	Org ^b C (g/Kg)	Total N ^b (g/Kg)	C/N	CEC ^c (cmol+/Kg)	Clay ^d (g/Kg)
Recreated	Hemic Histosol reconstituted	Hm1	0 – 30	7.27	300	18.2	16.5	112	nd
		Hm2	30 – 55	7.01	308	17.7	17.4	102	nd
		Mca 1	65 – 90	8.02	11.6	0.612	19	5.3	54
		Mca 2	> 90	7.92	19.7	1.19	16.5	6.7	86
	Interstratified Histosol reconstituted	Mca	0-10	7.98	37	3,0	13	14,0	nd
Control	Hemic Histosol	Aca	0-10	7.42	194.6	19	10	67	455
		GoGr	10-30	7.76	93.3	10	9	48	527
		Hm	30-50	7.16	304.3	21	15	119	nd

(a) pH H₂O (1:2.5 soil/deionized water); (b) Organic carbon and total nitrogen were measured by CHN elementary analysis; (c) determination of the cationic exchange capacity by the Metson method; (d) granulometry by the Robinson pipette method.

2.3.3. *In situ* soil denitrification

Denitrification is the reduction of nitrogen oxides, *i.e.* nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) that leads to the formation of nitric oxide (NO), nitrous oxide (N_2O) and dinitrogen (N_2) gases. The process mainly results from the activity of facultative anaerobic organisms that normally use oxygen (O_2) to accept electrons during respiration but can use nitrogen oxides as electron acceptors in the absence of oxygen (Groffman et al., 1998). *In situ* soil denitrification measurements were conducted from February 2010 to February 2011 on intact soil cores (2 cm diameter * 15 cm length, approximately 30 g) using the acetylene inhibition technique (Yoshinari et al., 1977). Soil cores were placed into serum bottles and sealed with rubber serum stoppers crimped with aluminium caps. The cores were incubated and then amended at 25°C for 2 hrs with 20 mL of acetylene to bring the soil atmosphere pressure to 10 KPa (10% V/V). All incubations were done on the same day the cores were taken (Yoshinari et al., 1977). Denitrification rates were calculated as the rates of nitrous oxide (N_2O) accumulation in the head space over a 2-hour period. At the end of the incubation, a 5-mL gas sample was taken from the head space and injected into a Shimadzu gas chromatograph (Varian 3400, Middelburg, Netherlands) equipped with an Electron Capture Detector. Nitrous oxide was quantified with external standards made with pure N_2O in bottles (N45, Air Liquide, France) and expressed as mg of N- N_2O per m^2 per hour.

2.4. Soil functioning: laboratory survey

2.4.1. Substrate-Induced Respiration (SIR)

For Kuzyakov (2006), Substrate-Induced Respiration (SIR) represents the state of the enzyme pool involved in respiration (*e.g.* the heterotrophic microbial community) at the time of sampling. The same author also reports that SIR is considered as more relevant than actual *in situ* soil respiration. SIR is used as an indicator of soil microbial functioning. The SIR

measurement technique consists in adding a substrate such as glucose to the soil, and measuring the respiration resulting from the stimulated metabolic activity in the experimental soil sample. SIR was measured using the procedure described by Beare et al. (1990) on two sampling dates (February 2010 and February 2011). Ten g of soil (dry weight) were placed in a sealed plasma flask of 150 ml. A solution of glucose (1.5 mg C g^{-1} of dry soil) was added to reach 80% of field capacity.

The flasks were sealed with rubber stoppers using crimp tops and incubated at 25°C for 6 hrs, a time span that is considered short enough to avoid enzyme synthesis. Two hundred μl of air samples from the headspace of each flask were analysed for CO_2 concentration after 2 and 6 hrs incubation, using a Shimadzu gas chromatograph (Varian 3400, Middelburg, Netherlands) equipped with a catharometer. The amount of CO_2 released during incubation made it possible to calculate SIR, expressed in mg of C- CO_2 per kg of dry soil per hour. Total soil respiration (*in situ* measurements) was determined at the same periods as SIR (*i.e.*, February 2010 and February 2011) in order to evaluate the SIR/Total respiration ratio. This ratio was used as an indicator of soil microbial functioning changes. In fact, variations in SIR/Total respiration ratios can reflect modifications in heterotrophic respiration due to microbial activity during restoration.

2.4.2. C & N potential mineralization

Soil was sampled from the top layer (0-10 cm) of RS and CS, sieved ($< 5 \text{ mm}$) and kept at 4°C for no more than 5 days. Soil samples were incubated in aerobic and anaerobic conditions on two sampling dates (April 2008 and April 2011).

In aerobic conditions, the amounts of mineralized C & N were determined according to the method proposed by Robertson et al. (1999), where by CO_2 is trapped in 0.2 M sodium

hydroxide (NaOH) and produces Na_2CO_3 . Fresh soil mixtures (50 g) were placed into jars connected to vials containing 20 ml of 0.2 M NaOH. The jars were sealed and incubated in the dark at 28°C for up to 28 days. The NaOH traps were changed every 7 days. C mineralization after 0-, 7-, 14-, 21- and 28-day periods was determined as total CO_2 evolved, measured from the change in NaOH electrical conductivity. Inorganic N ($\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$) was determined for each sample after 0 and 28 days of incubation. Twenty-g subsamples (fresh soil) were extracted with 100 ml of 0.5 M K_2SO_4 . Inorganic N concentrations in the extracts were determined by colorimetry (AA3, Bran&Luebbe, Norderstedt, Germany). Potential N mineralization rates were calculated as the differences in inorganic N between T0 and T28 days (Robertson et al., 1999), and expressed as the percentage of total N mineralized daily.

In anaerobic conditions, mineralized N was estimated from $\text{NH}_4\text{-N}$ produced during incubations carried out in waterlogged conditions, as reported by Robertson et al. (1999). Soil mixtures (50 g) were placed into jars containing distilled water, sealed and incubated in the dark at 40°C for up to 7 days. Inorganic N ($\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$) was determined for each sample at T0 and T7 days of incubation. Twenty-g subsamples (fresh soil) were extracted with 100 ml of 0.5 M K_2SO_4 . Ammonium and nitrate concentrations in the extracts were measured by colorimetric methods. Potential N mineralization was calculated as the difference in inorganic N between T0 and T7 days and expressed as the percentage of total N mineralized daily.

2.4.3. Denitrifying Enzyme Activity (DEA)

DEA provides information about the maximum activity of the biomass of enzymes present in the soil at the time of sampling. DEA was measured using the acetylene-inhibition technique

described by Tiedje et al. (1984) on two sampling dates (January 2011 and January 2012). Fresh soil samples were homogenized and sieved (2 mm). Between 5 and 20 grams of dried soil were placed in 150-ml plasma flasks sealed with rubber stoppers, crimped with aluminium caps. An oxygen-free headspace was then established by alternately vacuuming and flushing with helium (He) 3 times, with a fourth flush to establish a He headspace for incubation. Bottles were amended with 15 ml of acetylene. To assess DEA, the soil samples were incubated under anaerobic conditions with a nutrient solution containing excess nitrate ($15 \text{ mg NO}_3^- \text{-N l}^{-1}$), 72 mg Ca l^{-1} , 10 mg Mg l^{-1} , 27 mg Na l^{-1} , 39 mg K l^{-1} and $2.3 \text{ mg PO}_4\text{-P l}^{-1}$. The plasma flasks were incubated for 6 hours in the dark at 25°C . Gas samples were analyzed for N_2O using a Shimadzu gas chromatograph (Varian 3400, Middelburg, Netherlands) equipped with an Electron Capture Detector. Nitrous oxide was quantified with external standards made with pure N_2O in bottles (N^{45} , Air Liquide, France) and expressed in mg of N- N_2O per kg of dry soil per hour.

2.5. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using Statistica 6.1 (Statsoft, with 95% confidence intervals). All the results are the means of three replicates ($n=3$). The standard errors of the means were calculated and were used to estimate the variability of each parameter in the study sites (RS and CS) and at the different dates. The normal distribution of the model residues (Shapiro-Wilk test) and the homoscedasticity of variance (Bartlett test) were checked and, in case of unconformity, data were transformed by $f(x) = \log_{10}(x+1)$. We used multivariate analysis of variance (MANOVA) to test for the effects of site (different soils) and time (post-restoration). When MANOVA yielded significant differences between sampling zones and times, we used a *post hoc* means separation test (Tukey's HSD (Honest Significant Difference) (P -value < 0.05)) to determine which comparisons were significant.

3. Results

3.1. Soil functioning: field survey

3.1.1. Soil respiration

Soil respiration varied significantly among RS and CS plots and between sampling dates (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 2). Our results demonstrate a number of features that are common to all soils that undergo clear seasonal variation (fig 2.B). We also observed that RS (IH and HH soils) displayed great variability (fig 2.B) between soil types, with soil respiration rates ranking $HH^{++} > HH^+ > HH > IH$.

RS soils (IH and HH) displayed a seasonal pattern similar to CS. However, soil respiration was highest in CS. The highest rates were observed in July when soil temperatures were high, while the lowest rates were observed in January when soil temperatures were minimal. In July 2010 and February 2011, soil respiration in HH^{++} was more than 1.5 - 2 times greater than in CS.

3.1.2. Inorganic N content

Available soil NH_4 -N and NO_3 -N differed significantly among sampling dates and sampling zones (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 2).

Available NO_3 -N concentrations increased sharply in summer (fig 3.A) and were significantly higher in summer than in winter. IH and HH soils displayed the greatest variability. Soil NO_3 -N concentrations ranked $HH > HH^+ > HH^{++} > IH$. RS-HH and RS-IH soils displayed a seasonal pattern similar to CS. However, soil NO_3 -N concentrations were higher in CS than in RS (fig 3.A). As expected, available NO_3 -N concentrations in IH were significantly lower than in all HH soils, *i.e.* HH^{++} , HH^+ , and HH.

Conversely, soil $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations increased similarly in all soils after a waterlogging period (the autumn and winter seasons), with RS displaying the greatest variability (fig 3.B). Soil $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations ranked $\text{HH}^{++} > \text{HH}^+ > \text{HH} > \text{IH}$ (fig 3.B). In the same seasons, available $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations in the soil were higher in HH^{++} than in CS.

3.1.3. Net N mineralization

Net N mineralization displayed a significant temporal pattern (fig 3.C). In the first year of the survey (between June 2009 and March 2010), the mean daily net N mineralization rate was significantly greater in RS than in CS; but in the second year of the survey, net N mineralization was higher in CS than in RS. Additionally, net N mineralization increased between spring and summer and decreased between autumn and winter. During the wet season (fall and winter), negative daily rates of net N mineralization (*i.e.*, immobilization by microorganisms or denitrification) occurred in CS. In June 2010 and from January to February 2011 (~ 3 years after restoration), negative daily rates of net N mineralization were also measured in RS.

3.1.4. *In situ* soil denitrification

Denitrification rates varied widely between sampling zones and dates (MANOVA, P -value < 0.05) (Table 2). The highest denitrification activity was measured in spring and autumn, which correspond to the wet period. Spatial variability was higher between RSs (IH and HH soils) (fig 4.B). *In situ* soil denitrification rates ranked $\text{HH}^{++} > \text{HH}^+ > \text{HH} > \text{IH}$. In spring and summer, denitrification rates showed seasonal patterns similar to CS. However, *in situ* soil denitrification was higher in CS than in RS. The highest denitrification rates were observed in CS ($116 \pm 6 \text{ mg N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{hr}^{-1}$) and in HH^{++} ($100 \pm 7 \text{ mg N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{hr}^{-1}$) (fig 4.B). *In situ* IH soil denitrification rates were lower than in all other soils. In June 2010 (2 years after

restoration) the denitrification rate measured in HH^{++} was more than two times greater than in CS.

Figure 6.2. (A) SIR, and (B) monthly respiration rates in RSs and CS from June 2009 to February 2011 (means \pm s.e). Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$, $n=3$).

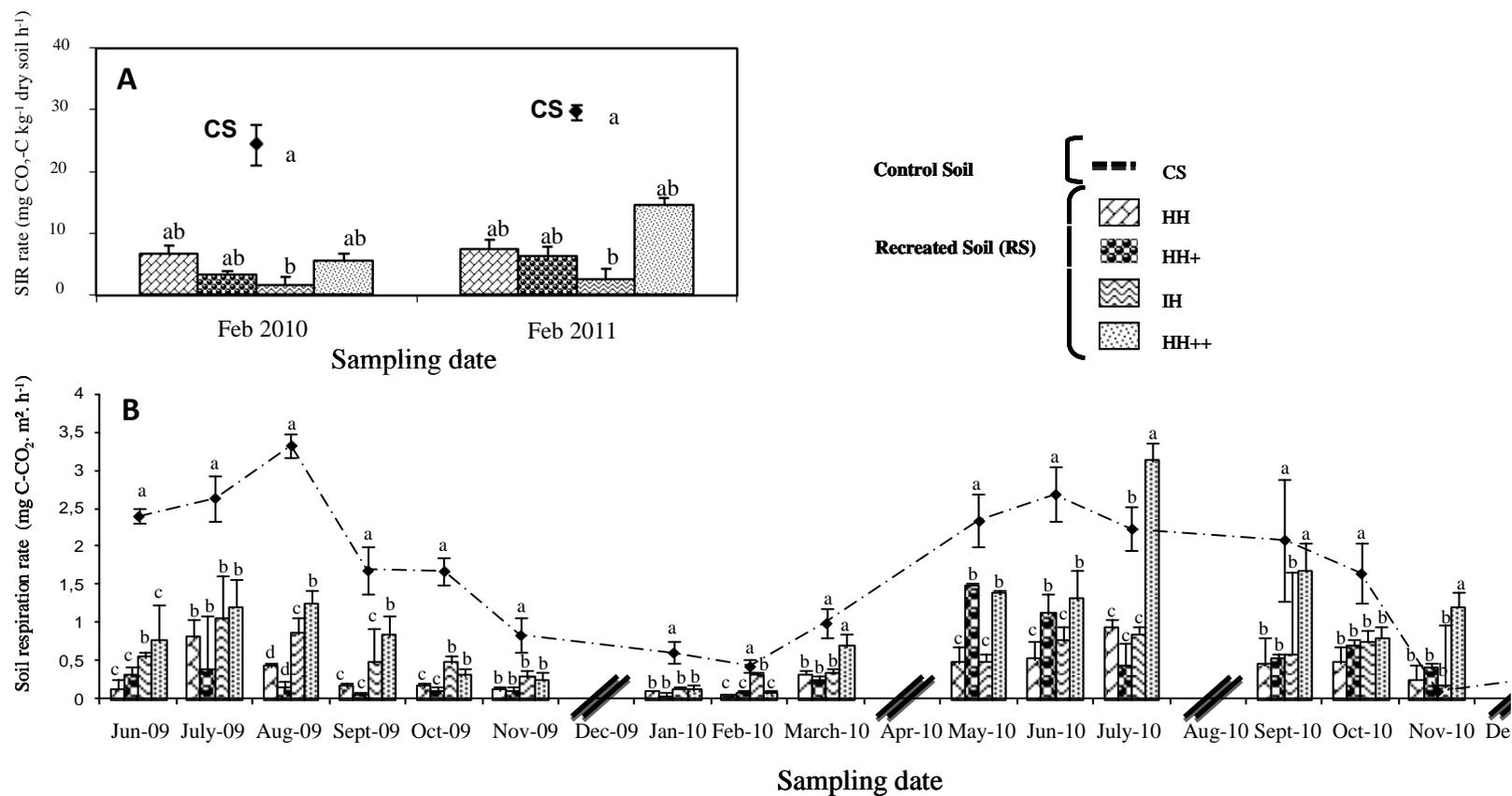


Figure 6.3. (A) DEA, and (B) Denitrification rates in RSs and CS from February 2010 to April 2011 (means \pm s.e) between April 2011 and March 2012. Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$, $n=3$).

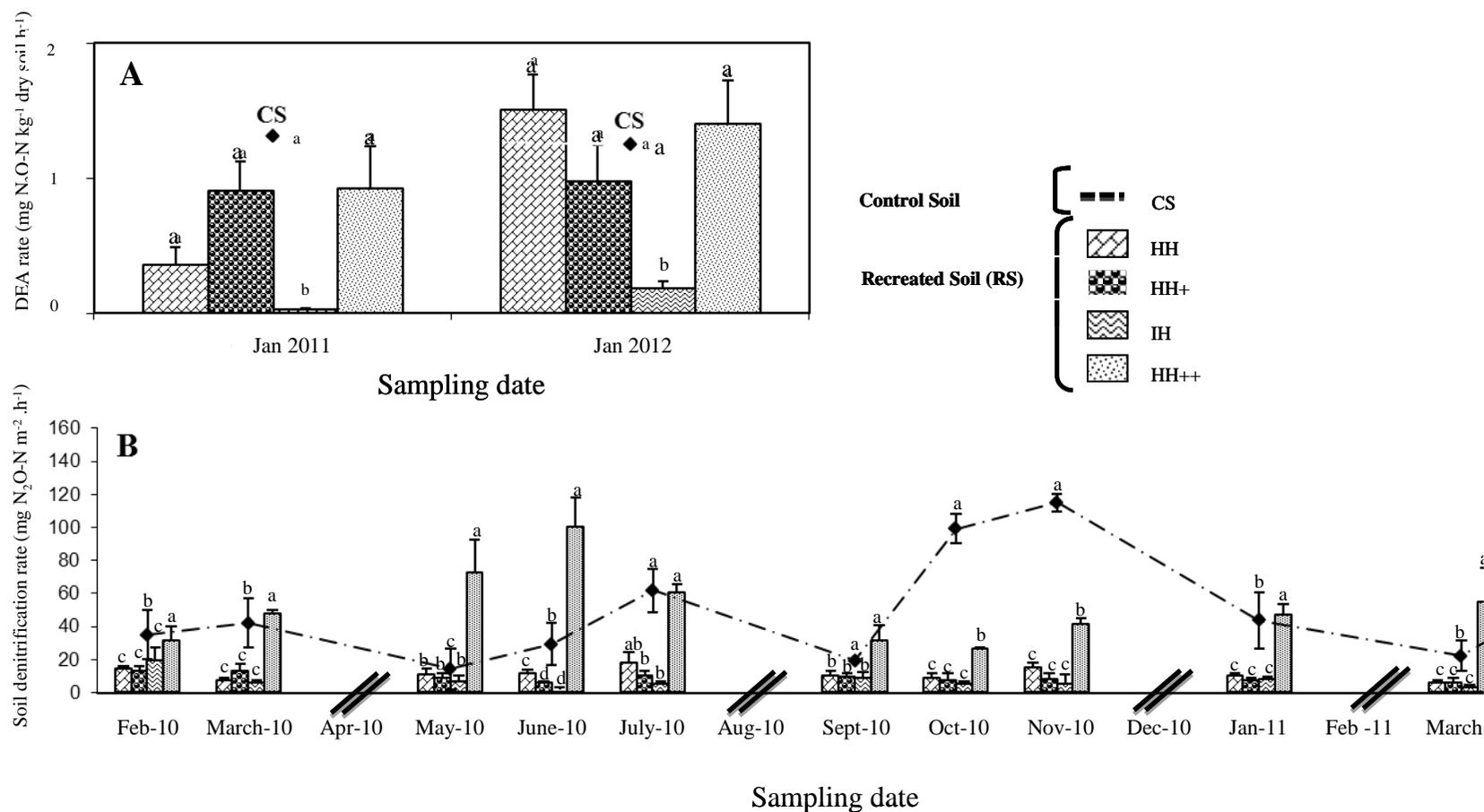
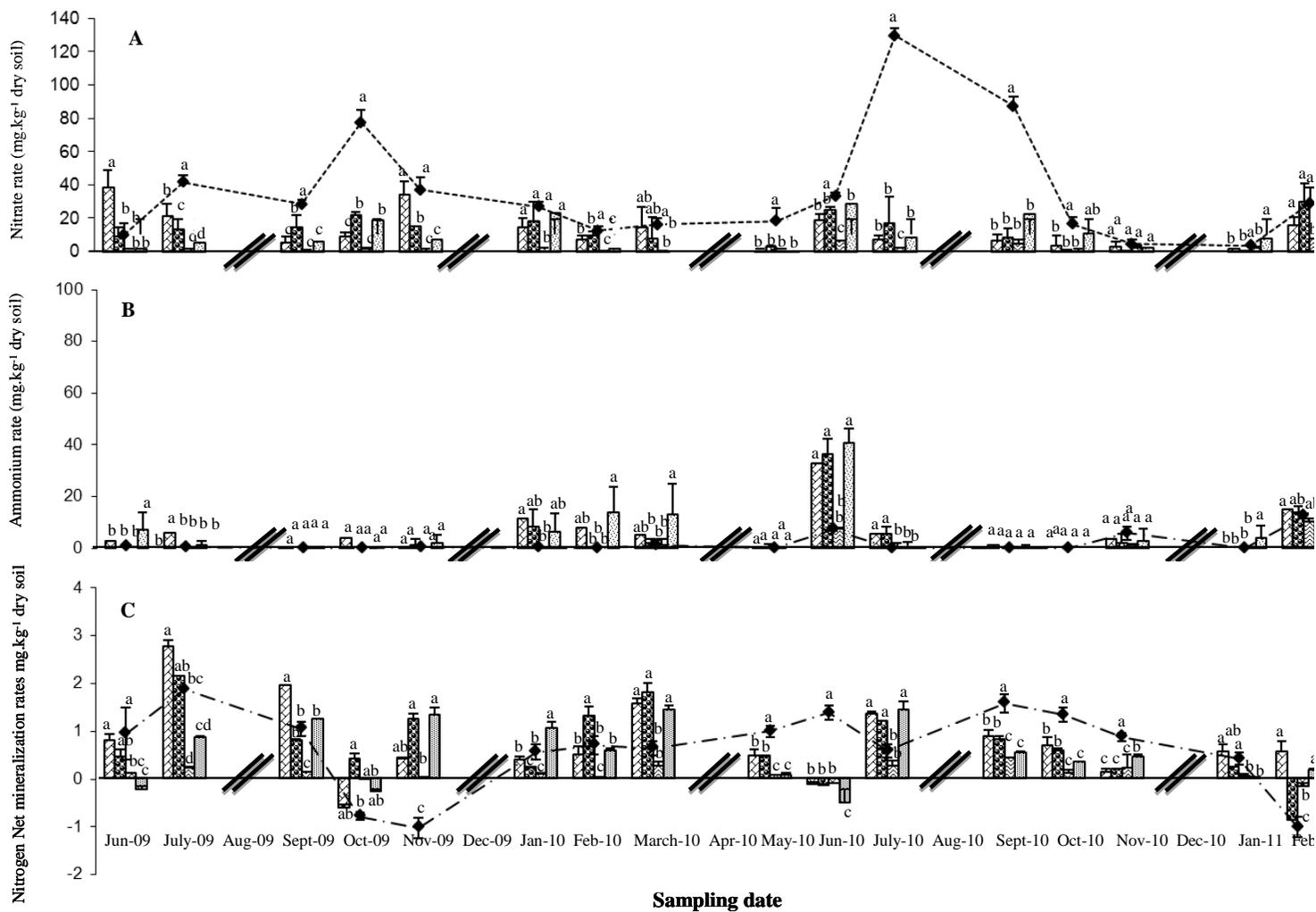


Figure 6.4. Nitrate (A), Ammonium (B), and Nitrogen Net mineralization rates (C) in RSs and CS from June 2009 to February 2011 (mean \pm SEM, n=3).



3.2. Soil functioning: laboratory survey

3.2.1. Substrate-Induced Respiration (SIR)

SIR varied between RSs (Table 3). We observed that SIR values for the IH soil were significantly lower than for the 3 HH soils, *i.e.*, HH⁺⁺, HH⁺, and HH, and CS (ANOVA Tukey's test, P -value > 0.05). There was no significant difference in SIR between the 3 HH soils in 2010 and 2011 (ANOVA Tukey's test, P -value > 0.05). The highest SIR was measured in CS (24.23 and 29.47 mg C kg⁻¹ dry soil hr⁻¹ in 2010 and 2011, respectively).

The SIR/Total respiration ratio varied widely between sampling zones and dates (ANOVA Tukey's test, P -value < 0.05) (Table 3). SIR/Soil respiration values altogether varied between 0.11 and 0.71 and between 0.10 and 0.69 in February 2010 and February 2011, respectively. For RS soils, SIR percentages ranged between 11% and 71% and between 10% and 30% of total soil respiration in February 2010 and February 2011, respectively.

3.2.2. C & N potential mineralization

In RSs, potential C and N mineralization changed between April 2008 and 2011 (Table 4): C mineralization and N mineralization both increased with time. Regarding potential C mineralization rates, means ranged from 0.027 to 0.070 % total org C.day⁻¹ in April 2008 and from 0.048 to 0.074 % total org C.day⁻¹ in April 2011. There were significant differences between the C mineralization rates of the IH and HH soils in 2011 (ANOVA Tukey's test, P -value < 0.05) (Table 4). Potential C mineralization rates ranked IH soil > HH soils. We also observed that the potential C mineralization rates in RSs were significantly lower than those in CS.

In RSs, the N mineralization rates in aerobic conditions ranged from 0.008 to 0.013 % total N.day⁻¹ in April 2008 and from 0.011 to 0.021 % total N.day⁻¹ in April 2011. There was no significant difference between the 4 types of soil in 2011 (ANOVA Tukey's test, *P*-value < 0.05) (Table 4). The potential N mineralization rates in aerobic conditions ranked IH < HH < HH⁺ < HH⁺⁺. The N mineralization rates in anaerobic conditions ranged from 0.009 to 0.054 % N tot.day⁻¹ in April 2008 and from 0.040 to 0.080 % N tot.day⁻¹ in April 2011. There were significant differences between the IH and HH soils (ANOVA Tukey's test, *P*-value < 0.05) (Table 4). The potential N mineralization rates in anaerobic conditions ranked IH < HH < HH⁺ < HH⁺⁺. The potential N mineralization rates (in aerobic and anaerobic conditions) were significantly lower in RSs than in CS.

3.2.3. Denitrifying Enzyme Activity (DEA)

DEA varied widely across soils (ANOVA Tukey's test, *P*-value < 0.05) (fig 4.A). Significant differences were shown between the HH soils (HH⁺⁺, HH⁺, and HH) and the IH soil (ANOVA Tukey's test, *P*-value < 0.05): DEA rates were significantly lower in the IH soil than in the HH soils in 2008 and 2011 (fig 4.A). DEA increased with time in RSs: mean DEA rates were 0.7 and 1.20 mg N₂O-N.kg⁻¹ dry soil.hr⁻¹ in January 2011 and January 2012, respectively. DEA values in the HH and CS soils were similar. DEA rates were significantly lower in the IH soil than in the CS (ANOVA Tukey's test, *P*-value < 0.05).

4. Discussion

4.1. C storage function

The highest soil respiration rates were observed in July when soil temperatures were high, while the lowest rates were observed in January when soil temperatures were minimal. Increased temperature and decreased soil moisture content simulated the decomposition of

plant debris and soil organic matter. Moreover, Moore and Dalva (1993) report that soil respiration in wetlands is positively correlated with water table depth. When water table depth decreases in summer, soil aeration increases, the oxygen limitation for soil organisms is therefore lifted, and the soil respiration rate increases.

Table 6.2. Results (F-values and significance) of MANOVA testing the effects of zones and dates on soil processes (respiration, denitrification, net N mineralization) and soil inorganic N content (ammonium and nitrate).

Treatment	<i>F values</i>				
	Soil respiration	NH ₄ -N content	NO ₃ -N content	Denitrification	Net N mineralization
Date	35.9***	42.77***	18.2***	18.66***	57.5***
Zone	172.1***	20.18***	109.6***	78.93***	59.8***
Date*Zone	8.3***	4.38***	12.1***	23.05***	17.67***

* P < 0.05. ** P < 0.01. *** P < 0.001

Table 6.3. Means \pm S.E. (n=3) of total soil respiration, substrate-induced respiration (SIR), and SIR/soil respiration ratios in RSs and CS. According to ANOVA Tukey's HSD test (rejection level 0.05) the sites labelled with the same letter do not differ significantly.

	February 2010					February 2011			
	RS				CS	RS			
	IH	HH	HH ⁺	HH ⁺⁺		IH	HH	HH ⁺	HH ⁺⁺
SIR (mg C.kg ⁻¹ dry soil hr ⁻¹)	1.56 b	4.2 ab	3.26 ab	5.41 ab	24.23 a	2.51 b	7.29 ab	6.21 ab	14.49 ab
	(1.31)	(1.42)	(0.66)	(1.3)	(3.32)	(1.73)	(1.68)	(1.65)	(1.13)
Soil respiration (mg C kg ⁻¹ dry soil hr ⁻¹)	13.6 ab	5.9 b	14.7 ab	8.8 ab	24.9 a	8.4 b	24.4 ab	34.8 ab	144 a
	(0.06)	(0.04)	(0.02)	(0.05)	(0.09)	(0.1)	(0.04)	(0.04)	(0.21)
SIR/Soil respiration	0.11	0.71	0.22	0.62	0.54	0.3	0.3	0.18	0.1

Table 6.4. Summary of mean values (and standard deviations, $n = 3$) for potential C and N mineralization in CS and RSs between 2008 and 2011. Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to ANOVA Tukey's test (P -value < 0.05 , $n=3$).

	April 2008			April 2011		
	mean	SD		mean	SD	
C mineralization rate (% Org C/day)						
IH	0.027	0	b	0.040	0.019	b
HH	0.036	0	ab	0.073	0.012	a
HH ⁺	0.040	0.003	ab	0.056	0.019	a
HH ⁺⁺	0.070	0.003	a	0.048	0.012	a
CS	0.105	0.003	a	0.069	0.007	a
N mineralization rate (aerobic conditions) (% N total/day)						
IH	0.008	0.003	b	0.018	0.007	b
HH	0.013	0	ab	0.018	0.003	b
HH ⁺	0.013	0.001	ab	0.010	0.001	b
HH ⁺⁺	0.007	0.004	b	0.021	0.007	b
CS	0.047	0	a	0.035	0.001	a
N mineralization rate (anaerobic conditions) (% N total/day)						
IH	0.009	0	b	0.039	0.043	b
HH	0.015	0.005	ab	0.083	0.010	ab
HH ⁺	0.032	0.006	ab	0.073	0.013	ab
HH ⁺⁺	0.054	0.004	a	0.060	0.004	ab
CS	0.060	0.007	a	0.191	0.023	a

Among RSs, the IH soil did not behave in quite the same way as the HH soils regarding soil respiration, SIR and potential C mineralization. This might be the result of the way that the gravel-pit was filled. It was filled hydraulically, hence the formation of 4 zones with different topographic levels corresponding to four different kinds of soils, *i.e.* IH, HH, HH⁺ and HH⁺⁺. The IH soil was characterized by low organic carbon concentrations, a high topographic level and a sandy texture; the HH soils (HH, HH⁺ and HH⁺⁺) were characterized by high organic carbon concentrations (more than 30%) and only differed by their topographic level which ranked HH > HH⁺ > HH⁺⁺. The results show that soil respiration in HH⁺⁺ was highest. Indeed, that plot displayed punctual flush respiration from July 2010 to February 2011 that were probably induced by flooding/drying fluctuations. Drying increases oxygen diffusion within the soils and promotes the development of aerobic organic matter decomposition, while flooding simulates nutrient leaching from that same organic matter. Therefore, according to the oxygen status within the soil, the pulse of nutrients and readily bioavailable carbon can cause a rapid increase in microbial activity and organic matter decomposition through mineralization. Indeed, Coletti et al. (2013) and Pacific et al. (2008) demonstrated that water level fluctuations impact the structure and function of wetlands. More particularly, the frequency, duration, and periodicity of floods are among the most important factors influencing carbon cycling. Soil respiration was significantly higher in CS than in RSs. Soil respiration is the sum of root respiration (autotrophic respiration) and decomposition of soil organic matter by soil foodwebs (heterotrophic respiration) (Pacific et al., 2008). Autotrophic respiration was not directly measured in this study, but we can get an idea of heterotrophic respiration from SIR measurements. SIR values were higher in CS than in RSs. We can therefore assume that the highest respiration rate in CS was partly due to a larger contribution of heterotrophic respiration in CS. In February 2011, SIR/soil respiration ratios supported this hypothesis as the SIR/soil respiration ratio in CS was 69% and no value in RSs exceeded that

percentage. In contrast, the ratio was 54% in CS in February 2010, vs. values ranging between 11 and 71% in the IH and HH soils, respectively. Moreover, the low soil respiration values in RSs compared to CS were probably due to the low soil organic matter quantity in IH (less than 40 g/kg of organic C) and the soil organic matter quality in HH soils (more than 300 g/kg of organic C but a high C/N ratio equal to 18). When the C/N ratio is too high (nitrogen limitation), decomposition slows down; conversely, when the C/N ratio is too low (decreasing nitrogen limitation), decomposition increases. According to our soil respiration, SIR and C mineralization measurements, RSs yielded lower values than CS. Low soil respiration, SIR and C mineralization values promote C storage, a major function of wet meadows.

4.2. Nitrogen transformation

Seasonal patterns of nitrate content were similar in RSs and in CS. Soil nitrate contents were significantly higher in the dry seasons (spring and summer) than in the wet seasons (autumn and winter). Rainfall and high water table levels in the wet seasons can impact the activity of nitrifying bacteria, as reported by Groffman et al. (2002), as a lower water table creates a more aerobic soil profile and thus increases the rates of nitrate production by nitrification. Pinay and Decamps (1988) and Bai et al. (2010) report that flood frequency and duration can drive soil nitrogen dynamics. Conversely, when nitrate levels increase in the dry season (spring and summer), ammonium-nitrogen content decreases. NH_4^+ -N levels increase in the wet season (autumn and winter) when anaerobic conditions increase due to the quasi-permanent waterlogging. These findings are similar to those observed by Pinay and Decamps (1988) and Reddy and Patrick (1975) who report that under such conditions, organic nitrogen is only mineralized into the ammonia form. This could explain the ammonium content ranking in our different soils: $\text{IH} < \text{HH} < \text{HH}^+ < \text{HH}^{++}$.

As expected, *in situ* N mineralization increased between spring and summer and decreased between autumn and winter because net N mineralization is usually strongly influenced by soil temperature and moisture (Rychnovska 1993; Bai et al., 2005). The net N mineralization patterns in RSs were equal to or exceeded those in CS in the first year of restoration, while the opposite trend was observed from the second year. This low mineralization activity in RSs may be attributed to the fact that flooding conditions can cause a rapid increase in bulk density and thus support anaerobiosis (*i.e.*, anaerobic nutrient cycling processes). Andersen et al. (2006) report that the compaction of peat increases bulk density and thus might limit the diffusion of gases like O₂, which is essential for aerobic processes such as mineralization. Moreover, *in situ* and potential net N mineralization values were greater in the HH soils (HH, HH⁺ and HH⁺⁺) than in the IH soil. This can be due to the oxidation of organic matter. Indeed, Organic C contents in HH soils was more than 10-fold greater than in the IH soil. So the high *in situ* and potential net N mineralization rates observed in the HH soils suggest that organic matter contributes hugely to maintaining mineralization processes that provide NO₃-N easily assimilated by plants (Bardgett, 2005).

In situ and potential net N mineralization was significantly higher in the CS than in the RS plot. In a similar study, Andersen et al. (2006) demonstrate that the high concentrations in humic acids and other recalcitrant compounds in restored sites influence microbial activity.

One of the ecosystem services provided by wet meadows is the supply of NO₃-N easily assimilated by plants. It appears that 3 years after restoration, RSs still provided less assimilable NO₃-N than CS.

4.3. NO₃-N removal function

In situ denitrification results are in line with those of other studies conducted at a global scale (Table 5). Throughout our monthly monitoring, *in situ* denitrification was significantly higher in CS than in RSs, except during the following two periods: May 2010-July 2010 and January 2011-April 2011. The denitrification patterns varied widely between sampling sites and dates. Denitrification rates increased from spring to autumn and decreased from autumn to spring in agreement with the study by Song et al. (2010), who demonstrate that denitrification rates are strongly affected by hydrologic conditions, temperature, and nitrate concentrations. The mean denitrification rates in RSs (1 to 100 mg N₂O-N m⁻² hr⁻¹) were also approximately in the same order as those in OS (Objective Soil) (10 to 150 mg N₂O-N.m⁻².hr⁻¹) (unpublished data) and CS (15 to 116 mg N₂O-N.m⁻².hr⁻¹). These findings are similar to those from other studies (Hernandez and Mitsch, 2007; Pinay et al., 2007) (Table 5).

The combination of our *in situ* soil denitrification and DEA results allowed us to evidence a great variability within RSs between the IH and HH soils. This was probably due to the hydraulic sediment-filling process, which led to the formation of 4 zones with different topographic levels. HH⁺⁺, which was permanently inundated, had the highest mean denitrification rate between June and August. In June 2010, the soil denitrification rate was more than 2-3 times greater in HH⁺⁺ than in CS. Denitrification was an important process because it consumed 65 % and 44 % of daily nitrate production (daily average values from June-July 2010) in the HH⁺⁺ and CS soils, respectively. Indeed, in addition to anaerobic conditions, two other factors may have contributed to the high denitrification rate in HH⁺⁺: organic matter content and nitrate content. As described in Table 1, organic C content was approximately more than 1.5 times greater in HH⁺⁺ than in CS. Organic matter content increases NO₃-N consumption in soils by fueling denitrifying bacteria and stimulating the uptake of inorganic N by denitrifying bacteria. Thus, organic matter may supply dissolved organic carbon (DOC) to microbes. Lu et al. (2009) report that an additional carbon source (glucose) can remarkably improve the nitrate removal ability of a constructed wetland. They demonstrate that the nitrate removal rate can increase from 20% to more than 50% in summer and from 10% to 30% in winter. Bai et al. (2014) also found that denitrification rate was

significantly correlated with organic matter, as organic matter would control denitrification capacity when moisture and nitrate were not limiting. This percentage of N loss by denitrification in RSs is in the same order as the N losses found by both Chiu et al. (2004) and Aulakh et al. (1992), in mangrove soil and flooded rice soil, respectively. Chiu et al. (2004) report that N loss through denitrification in mangrove soil measured using a ^{15}N tracer technique was between 55 and 76%. The sharp increase in the denitrification rate in HH^{++} suggests that flooding conditions and organic matter content contribute hugely to maintaining the $\text{NO}_3\text{-N}$ removal functions of RSs.

1. Conclusion

This study revealed that the combination of *in-situ* and *ex-situ* soil functioning is efficient to rapidly assess whether a typical wet meadow functioning is reached in a recreated system. The results of soil respiration and SIR measurements revealed that a recreated wetland can sequester C in the soil 3 years after restoration. This suggests the potential positive role of wetlands in the attenuation of global warming. Our results also highlight the prevailing importance of the effect of waterlogging duration and organic matter content on N losses through denitrification. Therefore, *in situ* denitrification rates and SIR/soil respiration ratios could represent interesting indicators to monitor restoration from its start and to compare restored or created sites to reference sites. Investigating how carbon sinks and denitrification rates are modified with different waterlogging durations could also be of great interest. We also suggest to create a soil with similar characteristics to a soil from unexploited floodplains, i.e. a “HISTOSOL mésique recouvert” characterised by a deep organic horizon covered by an horizon of alluvial clay.

Table 6.5. Comparison of denitrification rates in various created and natural wetlands.

Wetland Type	Location	Denitrification rate (mg N m⁻² h⁻¹)	Reference
Created wetlands	Illinois, USA	2.2-12	Xue <i>et al.</i> (1999)
Riparian wetlands	USA (Pennsylvania)	0.28 -3.64	Seitzinger (1994)
Constructed Wetland	South Korea	0.13-0.30	Song <i>et al.</i> (2011)
Created riverine wetlands	Ohio, USA	0.1-0.5	Song <i>et al.</i> (2010)
Created riverine wetlands	Ohio, USA	0.2-1.8	Hernandez <i>et al.</i> (2007)
Riparian wetlands	Mont St. Michel Bay, France	6.4-10.9	Pinay <i>et al.</i> (2002)
European alluvial soils	Seven rivers in Europe (NICOLAS Project)	43	Pinay <i>et al.</i> (2007)
Restored riparian wetland	USA	23.6	Lowrance <i>et al.</i> (1995)
Forest buffer zone	Netherlands	3.2-70	Hefting <i>et al.</i> (1998)
Riparian woods	France (The Garonne Valley)	up to 2.5	Pinay and decamps (1988)
Managed grassland	Netherlands	1.1-2.54	Velthof <i>et al.</i> (1996)
Riparian areas	Georgia, USA	0.042-0.11	Watts <i>et al.</i> (2000)
Constructed wetlands	Hamilton, New Zealand	100-200	Van Oostrom and Russell (1994)
Created wetland	North Carolina, USA	0.7-9.2	Poe <i>et al.</i> (2003)
Created wetland	Tartu, Estonia	0.3-17.0	Teiter and Mander (2005)

Acknowledgements

We would like to thank the Platform for Chemical Analysis in Ecology of the “SFR 119 Montpellier Environnement Biodiversité”, at the “Centre d’Écologie Fonctionnelle et Évolutive” (CNRS, Montpellier, France). We are also grateful to Philippe Delporte, Jordan Guiz, Lucie Michel and Benjamine Faucon for help with field sampling and laboratory analyses and Ludovic Henneron for statistical analyses. Financial support for this research was provided by the Yville project funded by the “Grand Port Maritime de Rouen (GPMR). We would also like to thank to Ghazi Abu Rumman and Mounia Ahmed for their language corrections of the manuscript.

Conclusion partielle

Dans le cinquième chapitre de ce travail de thèse, nous avons employé une démarche qui consiste à combiner de **descripteurs pédologiques** (i.e. caractéristiques physico-chimiques courantes) et **biologiques multi-taxons** (i.e. Vers de terre, Collemboles et microorganismes) pour évaluer le succès de la restauration écologique du compartiment sol suite au comblement de la ballastière à l'aide de sédiments de dragages et du matériel tourbeux. Les résultats de ces suivis ont montré que :

- La prairie restaurée présente 3 types de sol reconstitué : un **HISTOSOL mésique reconstitué** occupant 77% de la surface et, plus localement dans la partie sud-est de la ballastière, un **HISTOSOL interstratifié reconstitué** occupant 19% de la surface et un **Fluviosol reconstitué** occupant 4% de la surface. Ce résultat est à mettre en relation avec la variabilité des conditions de mise en place, par voie hydraulique, du matériel tourbeux ayant servi dans la dernière phase des travaux de comblement.
- Trois ans après les travaux de restauration, on n'observe aucun changement dans les caractéristiques physico-chimiques des sols reconstitués. Cependant, on note un affaissement du niveau topographique de la ballastière comblée de 10 à 60 cm. Cet affaissement a énormément contribué à l'établissement d'un gradient d'engorgement en eau au sein de site restauré,
- La colonisation par les vers de terre des sols reconstitués reste faible (8% de la valeur observée dans le sol de contrôle en 2011). En terme de richesse spécifique, on note également des valeurs qui sont en dessous de ce qu'on trouve dans le sol servant de témoin (i.e. prairie humide fauchée et pâturée à proximité du site restaurée sur HISTOSOL recouvert),
- La colonisation en collemboles des sols reconstitués est rapide. Dès la première année de suivi, on voit l'apparition d'une espèce typique des zones humides dans ces sols (i.e. *Sminthurides aquaticus*), qui est absente dans le sol témoin. On note également que la richesse spécifique dans les sols reconstitués dépasse celle mesuré dans le sol de contrôle (+ 75%),
- La colonisation en microorganismes révèle plus de biodiversité dans les sols reconstitués que le sol témoin.

Ces résultats nous ont amenés à nous interroger sur l'efficacité de ces descripteurs pour évaluer le succès d'une expérience de restauration écologique.

Dans le sixième chapitre, l'objectif était d'**évaluer le succès de la restauration du compartiment sol à l'aide de descripteurs fonctionnels** permettant d'appréhender les fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices vis-à-vis de l'azote et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides. Pour répondre à cet objectif, la démarche employée consistait à combiner des mesures *in situ* avec des mesures en laboratoire en conditions contrôlées. Ces mesures sont relatives à la respiration du sol, à la minéralisation du C et de l'N et à la dénitrification. Les résultats ont montré que durant les trois années de suivi:

- Les patrons de variation du dégagement de CO₂ *in situ* (respirométrie) des sols reconstitués suivent toujours le même patron de variations que celui du sol témoin : une augmentation progressive du dégagement de CO₂ au printemps, un niveau de dégagement maximum en période estivale, une diminution progressive à l'automne et un niveau minimum en période hivernale. On retrouve ainsi en janvier et février 2011 des valeurs de dégagement d'un ordre de grandeur identique à celles mesurées en 2010 sur la même période. Donc, la minéralisation de la tourbe est globalement restée assez faible sur la période de suivi, malgré le positionnement du matériel tourbeux en surface du sol. Ces résultats ont été confirmés avec l'utilisation du ratio SIR/respiration totale développé dans ce chapitre pour distinguer les émissions de CO₂ provenant de la respiration hétérotrophe (activité des micro-organismes décomposeurs de la matière organique) des émissions de CO₂ provenant de la respiration autotrophe (respiration des racines des végétaux et des micro-organismes rhizosphériques). Par conséquent, nous pouvons déduire que la remise en surface de la tourbe ne risque pas d'accélérer la dégradation de la matière organique.
- Les valeurs de dénitrification *in situ* dans l'horizon de surface (0-10 cm) des sols reconstitués varient fortement selon la localisation du prélèvement. Pour l'HISTOSOL mésique reconstitué, les valeurs de dénitrification sont les plus élevées dans la zone où la durée d'engorgement en eau est la plus longue. Les patrons de variation de la dénitrification dans les horizons de surface (0-10 cm) des sols reconstitués ne suivent pas forcément ceux de l'HISTOSOL recouvert de la prairie témoin adjacente et sont très dépendants des conditions locales d'engorgement en eau.

Conclusion générale

En conclusion générale de ce travail, nous pourrions tout d'abord déterminer si les résultats obtenus ont permis de remplir les objectifs que nous nous étions fixés au départ et nous essaierons de mettre en évidence les apports de cette étude à la connaissance en écologie de restauration, sur le plan conceptuel et décisionnel. Enfin, de nouvelles perspectives expérimentales seront proposées.

Partie I : Etude des possibilités de restauration du compartiment sol par modification du régime de perturbations et de contraintes liées aux crues : cas des écosystèmes rivulaires des secteurs intermédiaire et amont de l'estuaire de Seine.

1. Diagnostic de l'état écologique actuel des écosystèmes rivulaire des secteurs intermédiaire et amont de l'estuaire de Seine

La première partie de cette thèse était structurée en deux objectifs. Le premier était de diagnostiquer l'état actuel (morphologie et fonctionnement) des sols des écosystèmes rivulaires de la basse vallée de la Seine en fonction de leur degré de connectivité au fleuve. Pour cela, nous avons utilisé une démarche combinant une approche descriptive (description des horizons constitutifs des profils de sol et de leurs propriétés physico-chimiques respectives) avec une approche fonctionnelle des sols (mesures *in situ* et tests en conditions contrôlées au laboratoire).

Nous avons trouvé que la majorité des sols rencontrés sur les écosystèmes rivulaires de la basse vallée de la Seine appartiennent à la catégorie des **REDUCTISOLS** fluviatiques. Ces sols sont les plus représentés spatialement sur l'ensemble des sites prospectés. Cette approche descriptive des sols des écosystèmes rivulaires a permis d'établir un diagnostic préliminaire de zone humide. L'hypothèse de départ selon laquelle, compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale sont fortement dégradés, ne semble pas être validée sur la base des descripteurs morphologiques et physico-chimiques habituels. Par contre, on voit bien que ces descripteurs morphologiques et physico-chimiques habituels ne sont pas suffisants pour évaluer le fonctionnement actuel des sols des écosystèmes rivulaires et corrélativement, les fonctions écologiques spécifiques associées à ces sols. A ce niveau, dans le cas des sols seulement connectés par la nappe ou dans celui des sols déconnectés par exhaussement, on peut se poser la question de savoir si

ces sols subissent actuellement des régimes de contraintes et de perturbations qui leur permettent de remplir avec un niveau suffisant les fonctions écologiques qui sont habituellement attribuées au compartiment sol des écosystèmes rivulaires. Ce résultat justifie pleinement la nécessité d'une approche complémentaire basée sur des descripteurs fonctionnels.

Les résultats du suivi fonctionnel ont mis en évidence l'important rôle écologique des deux types de sites (directement et indirectement connecté). En effet ces sites abritent des sols qui remplissent différemment leurs fonctions écologiques. Les sols du Trou Buquet et du Trou Deshayé s'organisent préférentiellement selon leur niveau d'enrichissement en MO alors que les sols du site de Petiville s'organisent préférentiellement selon leur niveau d'engorgement en eau. Le site directement connecté de **Petiville**, abritent des sols assurant le plus les fonctions écologiques habituellement associées au compartiment sol de ce type d'écosystèmes (effet filtre vis-à-vis de l'N et stockage de carbone). Ce site suit un gradient d'engorgement en eau allant des sols les plus fréquemment inondés (en position topographique basse et proche de la Seine) aux sols les moins fréquemment inondés (en position topographique haute et les plus éloignés de la Seine). Les sols les plus éloignés de la Seine, les moins fréquemment touchés par les perturbations (les crues), favorisent l'accumulation de la matière organique dans l'horizon de surface qui contribue de manière indirecte l'acquisition d'une structuration et à la stabilité du fonctionnement biologique de ces sols. Aussi, nous avons mis en évidence que la capacité épuratrice vis-à-vis de l'N (dénitrification) est supérieure dans les sols éloignés de la Seine par rapport aux sols les plus fréquemment inondés. Malgré son importance écologique, les systèmes stables anciens (forêt alluviale) manquent au site Petiville.

Quant aux sols échantillonnés dans le site de **Trou Buquet**, un site indirectement connecté, ont plutôt tendance à stocker plus de matière organique. Ces sols qui se trouvent dans une position topographique basse derrière une digue ne subissent plus les processus d'érosion et/ou de sédimentation mais restent connectés au fleuve par le battement de la nappe. Ces sols fonctionnent plus souvent en conditions anaérobies ce qui conduit à une augmentation de la teneur en matières organiques du sol par diminution de la vitesse de décomposition en phase d'engorgement en eau (Chen et al., 2009; Coletti et al., 2013; Zhang et al., 2011). Dans un contexte de réchauffement climatique, la fonction puit de carbone de ces écosystèmes indirectement connectés a été renforcée. L'importance des zones humides

dans la séquestration de carbone ne fait pas l'objet d'un consensus dans la littérature (Chen et al., 2009; Coletti et al., 2013; Hopkinson et al., 2012; Zhang et al., 2011). La digue est à l'origine de fonctionnements hydriques très différents de ces sols, cependant on trouve que ces derniers ont pu conserver une fonction essentielle voire vitale.

Les résultats du **chapitre 2** (ACP) ont également révélé que le site de **Trou Deshayé** (site indirectement connecté) présente un fonctionnement très intéressant de point de vue écologique. Ce site, qui se trouve également derrière une digue, suit un gradient d'engorgement en eau ; allant des sols les plus fréquemment inondés (position topographique basse), aux sols les moins fréquemment inondés où les plus stables (position topographique haute). Ce positionnement (gradient topographique) permet à ce site d'assurer les deux fonctions écologiques habituellement associées au compartiment sol de ce type d'écosystèmes (puits de carbone et effet filtre vis-à-vis de l'N). Les sols échantillonnés dans les zones les plus fréquemment inondées présentent des teneurs en matière organique importante (stockage de carbone). Quant aux sols échantillonnés dans les zones les moins fréquemment inondées, ils présentent des valeurs de dénitrifications élevées (effet filtre vis-à-vis de l'N). Le gradient topographique a permis à ce site indirectement connecté de se distinguer de celui de **Trou Buquet** et de se rapprocher plus du site de **Petiville**.

Les résultats sur la morphologie et le fonctionnement (*in situ* et *ex situ*) des sols des écosystèmes rivulaires montrent donc que les sites étudiés ne peuvent pas être regroupés selon leur degrés de connectivité, et de ce fait ne permettent pas de valider l'hypothèse de départ selon laquelle, compte tenu du degré d'anthropisation de l'estuaire de la Seine, les sols des écosystèmes rivulaires de la plaine alluviale sont fortement dégradés et, corrélativement, que les fonctions écologiques prospectées sont altérées et ne peuvent se maintenir que localement sur des sites toujours en connexion directe avec le fleuve n'est pas validée. En effet, sur la base de descripteurs fonctionnels mesurés saisonnièrement *in situ*, nous avons démontré que sur les sites indirectement connectés au fleuve et correspondant à des dépressions (niveau topographique bas) peuvent favoriser l'expression de la fonction de stockage du C par enrichissement progressif en MO des sols suite à l'élimination du régime de perturbation lié aux crues. De même, dans les sites indirectement connectés au fleuve et présentant des variations topographiques (dépressions et zones exhaussées) peuvent être favorables à la fois à l'expression de la fonction de stockage de C mais aussi à la dénitrification.

2. Expériences de restauration du compartiment sol des écosystèmes rivulaires par modification du régime de perturbations et de contraintes liées aux crues

Le second objectif de la première partie était de suivre les potentialités du compartiment sol des écosystèmes rivulaires en terme de capacités épuratrices vis-à-vis de l'N. Compte tenu qu'aucun cas de restauration *in situ* du compartiment sol n'est actuellement réalisé sur les écosystèmes rivulaires de la Basse Vallée de Seine, nous avons décidé de réaliser des expériences de restauration en cosmes visant à simuler l'effet des variations de niveau d'eau liées au régime d'inondations sur des sites représentatifs des écosystèmes rivulaires. En effet, on suppose que la meilleure possibilité de restaurer les fonctions écologiques habituellement portées par le compartiment sol de ce type d'écosystème (dénitrification) serait de ramener un régime de perturbation et de contraintes liée aux variations de niveau d'eau en cohérence avec le régime hydrologique typique d'un estuaire intertidale. Pour cela, nous avons employé une démarche qui consiste à combiner des descripteurs fonctionnels (potentiel redox, dénitrification et minéralisation) avec des descripteurs liés aux acteurs biologiques responsables de l'effet épurateur vis à vis de l'N (communautés bactériennes) pour évaluer le succès de ces essais expérimentales de restauration. Les résultats de ces essais expérimentales se retrouvent donc au cœur des chapitres 3 et 4.

Dans le chapitre 3, nous avons testé expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation constante attribuable aux crues du fleuve (perturbations) *versus* les variations journalières de niveau d'eau liées aux marées (contraintes) sur la fonction épuratrice vis-à-vis de l'azote des sols d'écosystèmes rivulaires en connexion directe avec la Seine. Les résultats ont permis de mettre en évidence l'effet des fluctuations journalières (régime de contrainte lié aux marées) sur l'augmentation de l'effet épurateur vis-à-vis de l'N des sols. Dans une expérience comparable à la nôtre, Reddy and Patrick (1975) avaient obtenu des résultats similaires en montrant que les variations fréquentes des conditions d'oxydo-réduction des sols accentuent le processus de dénitrification et entraîne une disparition d'azote plus rapide. En effet, ils ont observés l'évolution de potentiel redox, des formes d'azote minéral et de la dénitrification pendant plusieurs types d'inondation et ont montré que plus la fréquence d'inondation augmente, plus le potentiel redox diminue lentement et plus la dénitrification est importante.

Les résultats du chapitre 3 ont également mis en évidence l'effet de régime d'inondation et du type de sol sur le changement des communautés bactériennes (dénitrifiantes vs sulfato-

réductrices). Nous avons constaté que les variations journalières de niveau d'eau favorisent le développement d'une communauté bactérienne dénitrifiante sauf dans les sols échantillonnés dans la zone la plus fréquemment inondée. Tandis que, sous un régime d'inondation constante, on observe plutôt le développement d'une communauté bactérienne sulfato-réductrice. Une explication possible à cette différence est que le développement d'une communauté bactérienne dépend énormément de l'évolution du potentiel redox. La fluctuation journalière du niveau d'eau a un effet crucial sur le changement des communautés bactériennes (dénitrifiantes et sulfato-réductrices) et l'abondance des groupes fonctionnels (*nosZ* et *dsrB*).

Le quatrième chapitre de ma thèse a permis de tester expérimentalement l'effet d'une durée d'inondation constante sur la même fonction épuratrice et sur les communautés bactériennes (dénitrifiante et sulfato-réductrice) de sols représentatifs d'un gradient de connexion au fleuve allant des sols directement connectés (**Petiville**) aux sols déconnectés (prairie exondée du site **Trou Deshayé**) en passant par des sols connectés indirectement par la nappe (**Trou Buquet** et **Yville**). Les résultats ont montré que les conditions d'engorgement en eau n'ont pas développé la capacité épuratrice vis-à-vis d'N et l'expression des communautés dénitrifiantes dans les sols échantillonnés dans les sites directement connectés (**Petiville**) ou indirectement connectés par la nappe (**Trou Buquet**). Les résultats font également apparaître l'effet significatif des conditions d'engorgement en eau sur la capacité épuratrice vis-à-vis d'N et l'expression des communautés dénitrifiantes dans le sol déconnecté de la prairie exondée du site **Trou Deshayé**. On en déduit alors que les sols déconnectés peuvent retrouver leur fonctionnement caractéristique d'un écosystème rivulaire (effet filtre vis-à-vis de l'N) avec la remise en place d'un régime d'inondation.

Partie II : Restauration du compartiment sol par réaffectation : création d'un nouveau profil pédologique après destruction du profil existant. Cas du comblement de la ballastière d'Yville-sur-Seine par des sédiments de dragages.

Dans un contexte global de perturbations anthropiques toujours croissantes des écosystèmes localisés au sein des plaines alluviales des grands fleuves, est née une volonté grandissante de restauration écologique. La restauration peut conduire au retour vers un état stable alternatif proche de l'écosystème préexistant (réhabilitation) ou vers un nouvel écosystème (réaffectation). Une étape cruciale d'un projet de restauration est l'évaluation de

succès. Le projet de restauration mené à Yville démontre qu'il est possible d'intégrer différents aspects fonctionnels au suivi à long terme. Il propose un suivi détaillé de la dynamique de la morphologie ainsi qu'une caractérisation sans précédent de l'aspect fonctionnel réalisé dans une zone humide restaurée dans un système estuarien. Le projet mené à Yville correspond, en effet, à un cas extrême de dégradation du sol dans la plaine alluviale de l'estuaire de Seine est sa disparition totale dans le cas de l'exploitation de matériaux alluvionnaires par les carriers. Dans le contexte de l'Estuaire de Seine, nous avons posé l'hypothèse que l'utilisation de sédiments de dragage comme matériaux de comblements peut permettre la recréation d'un profil pédologique possédant des fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides.

1. Evaluation de succès à l'aide d'une approche pédologique et écologique

Cette deuxième partie de travail de thèse était structurée en deux objectifs (chapitre 5 et 6). Le premier était d'évaluer le succès de la restauration du compartiment sol à l'aide de descripteurs pédologiques (i.e. caractéristiques physico-chimiques courantes) et biologiques multi-taxons (i.e. Vers de terre, Collemboles et microorganismes) suite au comblement de la ballastière à l'aide de sédiments de dragages. Notre hypothèse de travail était que l'utilisation de sédiments de dragage comme matériaux de comblements peut permettre la recréation d'un profil de sol morphologiquement proche d'un profil de la plaine alluviale à condition que ces sédiments soient recouverts d'un matériel pédologique suffisamment riche en matière organique pour recréer une horzontation pédologique cohérente (gradient de matière organique du haut vers le bas du profil).

Dans le chapitre 5, nous avons montré qu'aucun changement dans les caractéristiques physico-chimiques des sols reconstitués n'a été observé trois ans après les travaux de restauration. Cependant, on note un affaissement du niveau topographique de la ballastière comblée de 10 à 60 cm. Cet affaissement a énormément contribué dans l'établissement d'un gradient d'engorgement en eau au sein de site restauré. Dans une expérience comparable à la nôtre, Craft (2000) avait obtenu des résultats similaires en montrant que les variations des descripteurs pédologiques étaient relativement faibles. Une explication possible à l'absence de variations est qu'il faut un suivi à long terme pour que ces descripteurs morphologiques montrent une différence.

Les résultats du chapitre 5 font également apparaître des différences d'amplitude de réponse des descripteurs biologique. En effet, nous avons noté une faible colonisation des vers de terre par rapport à la prairie de référence (8% de la valeur observée dans les prairies de

référence). Ceci ne semble pas être le cas des collemboles édaphiques qui montrent une colonisation rapide de sol reconstitué. Un an après la fin des travaux de restauration, nous avons observé l'apparition d'une espèce typique des zones humides dans ces sols (i.e. *Sminthurides aquaticus*), qui est absente dans le sol de contrôle. Nous avons noté également que la richesse spécifique dans les sols reconstitués dépasse celle mesurée dans le sol de contrôle (+ 75%). Mes résultats peuvent être simultanément expliqués par une approche : la qualité de matière organique (Chaudhuri *et al*, 2003). Dans leurs travaux, Chaudhuri *et al* (2003) et Chaudhuri *et al* (2008) montrent que la qualité de matière organique influence la taille, la richesse spécifique ainsi que la croissance de communautés de vers de terre.

Ce chapitre a révélé que l'étude des descripteurs morphologiques et physico-chimiques habituels n'est pas suffisante pour évaluer le succès d'une expérience de restauration écologique. Ces descripteurs pédologiques sont nécessaires pour comprendre et identifier les types de sol mise en place dans la perspective d'un suivi à long terme, mais il est nécessaire de leur adjoindre des descripteurs fonctionnels pour appréhender le niveau des fonctions écologiques.

2. Evaluation de succès à l'aide d'une approche fonctionnelle

Le second objectif de la deuxième partie était d'évaluer le succès de la restauration du compartiment sol à l'aide de descripteurs fonctionnels permettant d'appréhender les fonctionnalités écologiques (capacités épuratrices vis-à-vis de l'azote et stockage de carbone) typiques des sols de zones humides. Dans le chapitre 6, à la suite d'une première partie d'évaluation de succès de notre projet de restauration, nous avons utilisé une démarche combinant des mesures fonctionnelles *in situ* avec des mesures fonctionnelles *ex situ* permettant de quantifier les fonctions écologiques qui revêtent une importance particulière dans les sols périodiquement inondés (stockage/déstockage de carbone organique, effet épurateur vis-à-vis de l'N). C'est une approche prometteuse pour le suivi à moyen terme d'attributs fonctionnels pour les écosystèmes restaurés, particulièrement en présence de références naturelles. Ce chapitre a révélé que l'approche fonctionnelle présente un grand intérêt pour le suivi temporel du succès de la restauration.

Le sixième chapitre de mon doctorat a permis d'évaluer pour la première fois l'évolution fonctionnelle d'un sol reconstitué dans un contexte estuarien fortement anthropisé. Une autre particularité de ce chapitre de thèse repose sur l'utilisation d'une séquence de trois années consécutives : c'est en effet une des rares études à utiliser une aussi longue séquence

temporelle de données de fonctionnement *in situ* pour le suivi d'une expérience de restauration centrée sur le sol.

Les résultats de chapitre 6 montrent que trois ans après la fin des travaux de restauration, le niveau de minéralisation de la tourbe dans le sol reconstitué est toujours plus faible que celui de la prairie témoin malgré sa remise en surface. En effet, les patrons de variation du dégagement de CO₂ *in situ* (respirométrie) des sols reconstitués suivent toujours le même patron de variations que celui du sol de contrôle. On retrouve ainsi en janvier et février 2011 des valeurs de dégagement d'un ordre de grandeur identique à celles mesurées en 2010 sur la même période. Donc, la minéralisation de la tourbe est globalement restée assez faible sur la période de suivi, malgré le positionnement du matériel tourbeux en surface du sol. Cela a été confirmé avec l'utilisation du ratio SIR/respiration totale développé dans ce chapitre pour distinguer les émissions de CO₂ provenant de la respiration hétérotrophe (activité des micro-organismes décomposeurs de la matière organique) des émissions de CO₂ provenant de la respiration autotrophe (respiration des racines des végétaux et des micro-organismes rhizosphériques). Ces résultats confirment l'idée qu'une remise en surface de la tourbe ne risque pas d'accélérer la dégradation de matière organique.

Les résultats du chapitre 6 font apparaître des différences d'amplitude de dénitrification des sols reconstitués. En effet, les valeurs les plus fortes ont été observées dans les sols échantillonnés dans la zone en position topographique basse (la plus fréquemment inondé). Trois ans après la fin des travaux de restauration, nous avons également montré que le niveau de dénitrification mesuré dans le sol reconstitué échantillonné dans la zone la plus fréquemment inondée dépasse celui qu'on trouve dans le sol de contrôle. Une explication possible à ces valeurs est que la dénitrification ne peut avoir lieu qu'à partir du moment où 3 facteurs sont réunis (i) une source de nitrates sans laquelle la dénitrification n'a pas lieu de se produire (Lu *et al*, 2009), (ii) des conditions d'oxydoréduction favorable, e.g. un potentiel redox allant de +100 à +400 mV (Faulwetter *et al*, 2009), et enfin (iii) un substrat carboné facilement utilisable comme source d'énergie pour les bactéries hétérotrophes (Curie, 2006). La zone la plus fréquemment inondée présente les conditions les plus favorables pour le maintien de ce processus.

L'hypothèse de départ selon laquelle on suppose que les descripteurs pédologiques habituels (i.e. morphologiques) ne sont pas suffisants pour quantifier les fonctions écologiques spécifiques associées à ces écosystèmes et qu'une approche fonctionnelle (*in situ* et *ex situ*) relative notamment à la dynamique de la matière organique est nécessaire a été

validée.

Perspectives :

Ce travail de thèse ouvre sur de nombreuses perspectives de recherche. Tout d'abord le diagnostic de l'état actuel (descripteurs morphologiques et fonctionnels) des sols des écosystèmes rivulaires de **l'estuaire fluvial de la Seine** a apporté de nouveaux éléments de connaissance des sols des écosystèmes rivulaires et marais alluvionnaires. Il sera maintenant intéressant de mettre au point un indice d'alluvialité sur la base des paramètres décrits dans ce projet. La validité de cet indice devra ensuite être testée sur un pool de 3 à 5 sites différents de ceux testés dans cette première phase. Notre étude a également soulevé des questions importantes à propos de l'état actuel des sols de quelques sites représentatifs de **l'estuaire fluvial de la Seine**. Il serait donc intéressant d'étudier ou de diagnostiquer l'état actuel des sols des écosystèmes rivulaires à l'échelle de l'estuaire dans son ensemble.

Dans la deuxième partie de la thèse, la combinaison d'une approche pédologique est une approche fonctionnelle a permis d'apparaître le fonctionnement initial du sol recrée. L'expérience de restauration de la ballastière à Yville sur Seine a également soulevé des questions sur les opérations de comblement. Il serait donc pertinent de recréer un sol aux caractéristiques proches des sols non exploités de la plaine alluviale, à savoir un sol tourbeux recouvert (HISTOSOL recouvert) de prairie agricole (Thèse en cours A. Boigny, Laboratoire Ecodiv). Une autre perspective à ce travail serait de restaurer le fonctionnement des sols par forçage biologique (introduction des vers de terre).

Références bibliographiques

- AFES. Référentiel pédologique 2008. Baize D., Girard M.-C. (editors). Éditions Quae:406 p; 2009b
- Alard, D. Zones humides de la basse vallée de la Seine Programme scientifique Seine-Aval; 2002
- Allen, B.P. Vegetation dynamics and response to disturbance of floodplain forest ecosystems with a focus on lianas. Dissertation, The Ohio State University; 2007
- Amoros, C.; Bornette, G. Connectivity and biocomplexity in waterbodies of riverine floodplains. *Freshwater Biology*. 47:761-776; 2002
- Amoros, C.; Petts, G.E. Hydrosystèmes fluviaux 24:300; 1993a
- Amoros, C.; Petts, G.E. Hydrosystèmes fluviaux (Eds). Masson, Paris:300 p; 1993b
- Ananyeva, N.D.; Susyan, E.A.; Chernova, O.V.; Chernov, I.Y.; Makarova, O.L. The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology*. 75:702-707; 2006
- Anbumozhi, V.; Radhakrishnan, J.; and Yamaji, E. Impact of riparian buffer zones on water quality and associated management considerations *Ecological Engineering*. 24:517-523; 2005
- Andersen, R. Suivi de la restauration écologique des tourbières ombrotrophes: le point de vue microbiologique. *Botanique* 130:25-31; 2006
- Andersen, R. Evaluation du succès de la restauration écologique des tourbières à sphaignes intégrations des critères physiochimiques et microbiologiques au suivi à long terme. Rapport de thèse; 2008
- Andersen, R.; Francez, A.J.; Rochefort, L. The physicochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. *Soil Biology and Biochemistry*. 38:1375-1387; 2006
- Anderson, J.M.; Ingram, J.S.I. *Tropical soil Biology and Fertility: A hand Book of methods*, CAB International, Oxon 2nd edition 79; 1993
- Aronson, J.; Dhillon, S.; Le Floc'h, E. On the Need to Select an Ecosystem of Reference, However Imperfect: A Reply to Pickett and Parker. *Restoration Ecology*. 3:1-3; 1995a
- Aronson, J.; Dhillon, S.; Le Floc'h, E. On the Need to Select an Ecosystem of Reference, However Imperfect: A Reply to Pickett and Parker. *Restoration Ecology*; 1995b
- Aronson, J.; Floret, C.; Le Floc'h, E.; Ovalle, C.; Pontanier, R. Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystems in Arid and Semi-Arid Lands. I. A View from the South. *Restoration Ecology*. 1:8-17; 1993a
- Aronson, J.; Floret, C.; Le Floc'h, E.; Ovalle, C.; Pontanier, R. Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystems in Arid and Semi-Arid Lands. II. Case Studies in Southern Tunisia, Central Chile and Northern Cameroon. *Restoration Ecology*. 1:168-187; 1993b
- Aronson, M.; Galatowitsch, S. Long-term vegetation development of restored prairie pothole wetlands. *Wetlands*. 28:883-895; 2008
- Aulakh, M.S.; Doran, J.W.; Mosier, A.R. Soil Denitrification—Significance, Measurement, and Effects of Management. in: Stewart B.A., ed. *Advances in Soil Science*: Springer New York; 1992
- B-M.Vought, L.; Pinay, G.; Fuglsang, A.; Ruffinoni, C. Structure and function of buffer strips from a water quality perspective in agricultural landscapes. *Landscape and Urban Planning*. 31:323-331; 1995
- Bachand, P.A.M.; Horne, A.J. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. *Ecological Engineering*. 14:17-32; 1999

- Baldwin, D.S.; Mitchell, A.M. The effects of drying and re-flooding on the sediment and soil nutrient dynamics of lowland river-floodplain systems: a synthesis. *Regulated rivers research and management* 16:457- 467; 2000
- Bangirinama, F.; Hakizimana, P.; Bogaert, J. De la conservation à la restauration écologique: Démarche méthodologique. *Bull sci Inst natl environ conserv nat.* 10:20-24; 2012
- Bardgett, R. *The biology of soil: A community and ecosystem approach* 242 p; 2005
- Barnhisel, R.I.; Hower, J.M. Coal surface mine reclamation in the eastern United States: The revegetation of disturbed lands to hayland/pasture or cropland. *Advances in Agronomy* 61:233-275; 1997
- Barrett, M.; Jahangir, M.R.; Lee, C.; Smith, C.; Bhreathnach, N.; Collins, G.; Richards, K.; O'Flaherty, V. Abundance of denitrification genes under different peizometer depths in four Irish agricultural groundwater sites. *Environ Sci Pollut Res.* 20:6646-6657; 2013
- Barton, C.D.; Andrews, D.M.; Kolka, R.K. Evaluating Hydroperiod Response in Restored Carolina Bay Wetlands Using Soil Physicochemical Properties. *Restoration Ecology.* 16:668-677; 2008
- Beare, M.H.; Neely, C.L.; Coleman, D.C.; Hargrove, W.L. A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biology and Biochemistry.* 22:585-594; 1990
- Beaumais, O.; Laroutis, D. in search of naturall resource-based economies: the case of the Seine estuary (France). *Hydrobiologia.* 588:3-11; 2007
- Bengtsson, G.; Bengtson, P.; Månsson, K.F. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry.* 35:143-154; 2003
- Berbers, P.; Maelfait, J.-P.; Mertens, J. Evaluation of some sampling methods used to study Collembola (Insecta, Apterygota) in a pasture. *Rev Ecol Biol Sol.* 26:305-320; 1989
- Bernal, B.; Mitsch, W.J. A comparison of soil carbon pools and profiles in wetlands in Costa Rica and Ohio. *Ecological Engineering.* 34:311-323; 2008
- Besaury, L. étude des interactions microorganismes-métaux dans les sédiments marins: impact du cuivre sur les communautés microbiennes présente dans les sédiments marins chiliens contaminés. Rapport de thèse:302; 2012
- Blouin, M.; Hodson, M.E.; Delgado, E.A.; Baker, G.; Brussaard, L.; Butt, K.R.; Dai, J.; Dendooven, L.; Peres, G.; Tondoh, J.E.; Cluzeau, D.; Brun, J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science.* 64:161-182; 2013
- Borga, P.; Nilsson, M.; Tunlid, A. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry.* 26:841-848; 1994
- Bornette, G.; Tabacchi, E.; Hupp, C.; Pujalon, S.; Rostan, J.C. A model of plant strategies in fluvial hydrosystems. *Freshwater Biology.* 53:1692-1705; 2008
- Bossio, D.A.; Scow, K.M. Impacts of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns. *Microb Ecol.* 35:265-278; 1998
- Bougon, N. L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe. Rapport de thèse; 2007
- Boyer, M.; Piégay, H. Revégétalisation, restauration et entretien des ripisylves. p. 390-411. In: Piégay, H., Pautou, G. et Ruffinoni, C. *Les forêts riveraines des cours d'eau: écologie, fonctions et gestion.* . Paris: Institut pour le Développement Forestier; 2003

- Braker, G.; Zhou, J.; Tiedje, J.M. Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 66; 2000
- Bridgham, S.D.; Megonigal, J.P.; Keller, J.K.; Bliss, N.S.; Trettin, C. The balance of north american wetlands. *Wetlands*. 26:889-916; 2006
- Brown, S.; Bedford, B. Restoration of wetland vegetation with transplanted wetland soil: An experimental study. *Wetlands*. 17:424-437; 1997
- Buisson, E. Ecological restoration of Mediterranean grasslands in Provence and California. Thèse de l'Université Paul Cézanne, Marseille; 2005a
- Buisson, E. Restauration écologique de communautés végétales herbacées méditerranéennes: exemples dans le sud-est de la France et sur la côte californienne. Université Paul Cézanne, Aix-Marseille 3; 2005b
- Busnardo, M.J.; Gersberg, R.M.; Langis, R.; Sinicrope, T.L.; Zedler, J.B. Nitrogen and phosphorus removal by wetland mesocosms subjected to different hydroperiods. *Ecological Engineering*. 1:287-307; 1992
- Carrington, L.P.; Diaz, A. An Investigation into the Effect of Soil and Vegetation on the Successful Creation of a Hay Meadow on a Clay-Capped Landfill. *Restoration Ecology*. 19:93-100; 2011
- Cavigelli, M.A.; Robertson, G.P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil biology & biochemistry*. 33:297-310; 2001
- Chabrierie, O.; Poudevigne, I.; Bureau, F.; Vincelas-Akpa, M.; Nebbache, S.; Aubert, M.; Bourcier, A.; Alard, D. Biodiversity and ecosystem functions in wetlands: A case study in the estuary of the Seine River, France. *Estuaries*. 24:1088-1096; 2001
- Chaudhuri, P.S.; Pal, T.K.; Bhattacharjee, G.; Dey, S.K. Rubber leaf litters (*Hevea brasiliensis* var. RRM 600) as vermiculture substrate for epigeic earthworm, *Perionyx excavatus*, *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*. *Pedobiologia*. 47:796-800; 2003
- Chaudhuri, P.S.; Sabyasachi, N.; Paliwal, R. Earthworm population of rubber plantations (*Hevea brasiliensis*) in Tripura, India. *Tropical Ecology*. 49:225-234; 2008
- Chen, Z.M.; Chen, G.Q.; Chen, B.; Zhou, J.B.; Yang, Z.F.; Zhou, Y. Net ecosystem services value of wetland: Environmental economic account. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*. 14:2837-2843; 2009
- Chiu, C.-Y.; Lee, S.-C.; Chen, T.-H.; Tian, G. Denitrification associated N loss in mangrove soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 69:185-189; 2004
- Citeau, L.; Bispo, A.; Mardy, M.; King, D. Gestion durable des sols. Quae, Versailles,:322 p; 2008
- Coletti, J.Z.; Hinz, C.; Vogwill, R.; Hipsey, M.R. Hydrological controls on carbon metabolism in wetlands. *Ecological Modelling*. 249:3-18; 2013
- Comin, F.A.; A., R.J.; Hernandez, O.; Menendez, M. Restoration of wetlands from abandoned rice fields for nutrient removal, and biological community and landscape diversity. *Restoration Ecology*. 9:201-208; 2001
- Craft, C. Co-development of wetland soils and benthic invertebrate communities following salt marsh creation. *Wetlands Ecology and Management*. 8:197-207; 2000
- Cristofoli, S.; Mahy, G. Restauration écologique : contexte, contraintes et indicateurs de suivi. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 14: 203-211; 2010
- Curie, F. Retention de nitrates dans les zones humides riveraines. Rapport de thèse:227; 2006
- Dambreville, C. Dénitrification et émission de N₂O par des sols soumis à une fertilisation organique ou minérale - Cas des effluents porcins-. Rapport de thèse; 2007
- Davidson, E.A.; Janssens, I.A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*. 440:165-173; 2006

- De-Campos, A.B.; Mamedov, A.I.; Huang, C.H. Short-Term Reducing Conditions Decrease Soil Aggregation. *Soil Science Society of America*. 73:550-559; 2009
- Dennis, F.W. Ecological issues related to wetland preservation, restoration, creation and assessment. *Science of The Total Environment*. 240:31-40; 1999
- Drizo, A.; Frost, C.A.; Grace, J.; Smith, K.A. Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems. *Water Research*. 33:3595-3602; 1999
- Duffour, S.; Piégay, H. channel vertical mobility, hydrogeomorphic disturbance and undrestory vegetation in floodplain forest of the Ain River (France). *Geomorphologie: relief, processus, environnement*. 4:371-386; 2010
- Dugan, P.J. Wetland conservation : a review of current issues and required action. *IUCN*:96; 1990
- Edwards, K.R.; Čížková, H.; Zemanová, K.; Šantrůčková, H. Plant growth and microbial processes in a constructed wetland planted with *Phalaris arundinacea*. *Ecological Engineering*. 27:153-165; 2006
- Elhottová, D.; Křišťůfek, V.; Tříška, J.; Chrastný, V.; Uhlířová, E.; Kalčík, J.; Píček, T. Immediate Impact of the Flood (Bohemia, August 2002) on Selected Soil Characteristics. *Water Air Soil Pollut*. 173:177-193; 2006
- ESRI. ArcView. Environmental Systems Research Institute, Redlands, California, USA.; 2010
- Even, S.; Thouvenin, B.; Bacq, N.; Billen, G.; Garnier, J.; Guezennec, L.; Blanc, S.; Ficht, A.; Le hir, P. An integrated modelling approach to forecast the impact of human pressure in the Seine estuary. *Hydrobiologia*. 588:13-29; 2007
- Fairbridge, R.W. *Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries*, Wiley (ed), New York.; 1980
- Fanin, N.; Hättenschwiler, S.; Barantal, S.; Schimann, H.; Fromin, N. Does variability in litter quality determine soil microbial respiration in an Amazonian rainforest? *Soil Biology and Biochemistry*. 43:1014-1022; 2011
- Faulwetter, J.; Burr, M.; Parker, A.; Stein, O.; Camper, A. Influence of Season and Plant Species on the Abundance and Diversity of Sulfate Reducing Bacteria and Ammonia Oxidizing Bacteria in Constructed Wetland Microcosms. *Microb Ecol*. 65:111-127; 2013
- Faulwetter, J.L.; Gagnon, V.; Sundberg, C.; Chazarenc, F.; Burr, M.D.; Brisson, J.; Camper, A.K.; Stein, O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*. 35:987-1004; 2009
- Fontaine, S.; Barot, S.; Barre, P.; Bdioui, N.; Mary, B.; Rumpel, C. stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature*. 450; 2007
- Foti, M.; Sorokin, D.-Y.; Lomans, B.; Mussman, M.; Zacharova, E.-E.; Pimenov, N.-V.; Kuenen, J.-G.; Muyzer, G. Diversity, activity, and abundance of sulfatereducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:2093-2100; 2007
- Franzluebbers, A.J. Ecology and the Cycling of Carbon and Nitrogen, In *Encyclopedia of Soil Science*, Taylor & Francis Group, 2nd édition.503p; 2006
- Fustec, E.; Frochot, B. Les fonctions des zones humides, synthèse bibliographique. . Agence de l'eau Seine Normandie / Université de Paris 6 et Bourgogne, Paris:144; 1996
- Fustec, E.; Thibert, S. Le pouvoir épurateur des zones humides. In E. Fustec et B. Frochot (Eds.). *Les fonctions des zones humides, synthèse bibliographique*.71-140; 1996
- Gagnon, V.; Chazarenc, F.; Kõiv, M.; Brisson, J. Effect of plant species on water quality at the outlet of a sludge treatment wetland. *Water Research*. 46:5305-5315; 2012

- Geets, J.; Borremans, B.; Diels, L.; Springael, D.; Vangronsveld, J.; van der Lelie, D.; Vanbroekhoven, K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 66:194-205; 2006
- Geets, J.; Cooman, M.; Wittebolle, L.; Heylen, K.; Vanparrys, B.; Vos, P.; Verstraete, W.; Boon, N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75:211-221; 2007
- Germon, J.C.; Couton, Y. la dénitrification dans les sols : régulation de son fonctionnement et applications à la dépollution. *Courrier de l'environnement de l'INRA*; 1999
- GIP. Qualité de l'eau et contaminations : Dynamique des nutriments dans l'estuaire de la Seine. *Rapport Seine Aval 2009:1-6; Seine-Aval 2009*
- GIP. Contextes climatique, morphologique & hydro-sédimentaire : Inondations par débordement dans l'estuaire de la Seine. *Rapport Seine-Aval 2010:1-6; Seine-Aval 2010*
- Girard, M.C.; Walter, C.; Remy, J.C.; Berthelin, J.; Morel, J.L. *Sols et Environnement*. Dunod, Paris:816 p; 2005
- Gisin, H. *Collembolenfauna Europas*. Genf: Museum d'histoire Naturelle; 1960
- Gottschall, N.; Boutin, C.; Crolla, A.; Kinsley, C.; Champagne, P. The role of plants in the removal of nutrients at a constructed wetland treating agricultural (dairy) wastewater, Ontario, Canada. *Ecological Engineering*. 29:154-163; 2007
- Goulden, M.L.; Munger, J.W.; Fan, S.-M.; Daube, B.C.; and Wofsy, S.C. Exchange of carbon dioxide by a deciduous forest: Response to interannual climate variability. *Science*. 271:1576-1578; 1996
- Groffman, P.M.; Boulware, N.J.; Pouyat, R.V.; Colosimo, M.F. Soil nitrogen cycle processes in urban riparian zones. *Environmental Science & Technology*. 36:4547-4552; 2002
- Groffman, P.M.; Crawford, M.K. Denitrification Potential in Urban Riparian Zones. *Journal environnement quality*. 32:1144-1149; 2003
- Groffman, P.M.; Gold, A.J.; and Simmons, R.C. Nitrate dynamics in riparian forests : Microbial studies. *Journal environnement quality*. 21:666-667; 1992
- Groffman, P.M.; Gold, A.J.; Jacinthe, P.-A. Nitrous oxide production in riparian zones and groundwater. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 52:179-186; 1998
- Guenat, C.; Bureau, F.; Charnet, F. Genèse, diversité et fonctionnement des sols sous la dépendance d'un cours d'eau. in *Les forêts riveraines des cours d'eau : écologie, fonctions et gestion*:56-58; 2003
- Guézennec, L. *Seine-Aval: un estuaire et ses problèmes* Programme scientifique Seine-Aval; 1999
- Guo, H.; Noormets, A.; Zhao, B.; Chen, J.; Sun, G.; Gu, Y.; Li, B.; Chen, J. Tidal effects on net ecosystem exchange of carbon in an estuarine wetland. *Agricultural and Forest Meteorology*. 149:1820-1828; 2009
- Gutrich, J.J.; Taylor, K.J.; Fennessy, M.S. Restoration of vegetation communities of created depressional marshes in Ohio and Colorado (USA): The importance of initial effort for mitigation success. *Ecological Engineering*. 35:351-368; 2009
- HALLS, A.J. *Wetlands, Biodiversity and the Ramsar Convention: The Role of the Convention on Wetlands in the Conservation and Wise Use of Biodiversity*. Ramsar Convention Bureau, Gland; 1997
- Hargrave, B.T. aerobic decomposition of sediment and detritus as a function of particle surface area and organic content. *Limnology and oceanography*. 17; 1972
- Harris, J.A. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science*. 54:801-808; 2003

- Harris, J.A.; Hobbs, R.J.; Higgs, E.; Aronson, J. Ecological Restoration and Global Climate Change. *Restoration Ecology*. 14:170-176; 2006
- Hart, S.C.; Stark, J.M.; Davidson, E.A.; Firestone, M.K. Nitrogen Mineralization, Immobilization, and Nitrification. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*. sssabookseries:985-1018; 1994
- Haycock, N.E.; Muscutt, A.D. Landscape management strategies for the control of diffuse pollution. 31. *Landscape and Urban Planning*:313-321; 1995
- Hefting, M.M.; Clement, J.-C.; Bienkowski, P.; Dowrick, D.; Guenat, C.; Butturini, A.; Topa, S.; Pinay, G.; Verhoeven, J.T.A. The role of vegetation and litter in the nitrogen dynamics of riparian buffer zones in Europe. *Ecological Engineering*. 24:465-482; 2005
- Henry, S.; Bru, D.; Stres, B.; Hallet, S.; Philippot, L. Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5181-5189; 2006
- Hernandez, M.E.; Mitsch, W.J. Denitrification in created riverine wetlands: Influence of hydrology and season. *Ecological Engineering*. 30:78-88; 2007
- Hobbs, R.J. Setting effective and realistic restoration goal: Key directions for research 15:354-357; 2007
- Hobbs, R.J.; Harris, J.A. Restoration Ecology: Repairing the Earth's Ecosystems in the New Millennium. *Restoration Ecology*. 9:239-246; 2001
- Hobbs, R.J.; Norton, D.A. Towards a Conceptual Framework for Restoration Ecology. *Restoration Ecology*. 4:93-110; 1996
- Hoffmann, C.C.; Baattrup-Pedersen, A. Re-establishing freshwater wetlands in Denmark. *Ecological Engineering*. 30:157-166; 2007
- Hoffmann, T.; Glatzel, S.; Dikau, R. A carbon storage perspective on alluvial sediment storage in the Rhine catchment. *Geomorphology*. 108:127-137; 2009
- Hohensinner, S.; Egger, G.; haidvog, G.; Jungwirth, M.; Muhar, S.; Schmutz, S. Hydrological connectivity of a Danube river-floodplain system in the Austrian Machland: changes between 1812 and 1991. *floodplain protection, restoration, management*; 2007
- Hopkinson, C.S.; Cai, W.-J.; Hu, X. Carbon sequestration in wetland dominated coastal systems—a global sink of rapidly diminishing magnitude. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 4:186-194; 2012
- Huang, J.-C.; Mitsch, W.J.; Johnson, D.L. Estimating biogeochemical and biotic interactions between a stream channel and a created riparian wetland: A medium-scale physical model. *Ecological Engineering*. 37:1035-1049; 2011
- Huang, J.-C.; Mitsch, W.J.; Ward, A.D. Design of Experimental Streams for Simulating Headwater Stream Restoration1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*. 46:957-971; 2010
- IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2006, 2nd ed. World Soil Resources Reports No. 103, Rome. 2006
- Izquierdo, I.; Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Hernández, G.; Roldán, A. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Applied Soil Ecology*. 30:3-10; 2005
- Jenkins, W.A.; Murray, B.C.; Kramer, R.A.; Faulkner, S.F. Valuing ecosystem services from wetlands restoration in the Mississippi Alluvial Valley. *ecological economics*. 69:1051-1061; 2010
- Jorgensen, B.B. Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction. *Nature*. 296:643-645; 1982

- Joye, S.B.; Hollibaugh, J.T. Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Journal Name: Science*; Journal Volume: 270; Journal Issue: 5236; Other Information: PBD: 27 Oct 1995;Medium: X; Size: pp. 623-625; 1995
- Kampel, G.; Kristof, K.; Algaidi, A.A.; Bayoumi, H.; Heltai, G. Study of NO_x and CO₂ production of cultivated soil in closed microcosm experimental system. *Microchemical Journal*. 85:31-38; 2007
- Kandeler, E.; Deiglmayr, K.; Tschirko, D.; Bru, D.; Philippot, L. Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Applied and Environmental Microbiology*. 72; 2006
- Keddy, P.; Fraser, L.H.; Wisheu, I.C. A comparative approach to examine competitive response of 48 wetland plant species. *Journal of Vegetation Science*. 9:777-786; 1998
- Keffala, C.; Ghrabi, A. Nitrogen and bacterial removal in constructed wetlands treating domestic waste water. *Desalination*. 185:383-389; 2005
- Kinnunen, H.; Tiainen, J.; Tukia, H. Farmland carabid beetle communities at multiple levels of spatial scale. *Ecography*. 24:189-197; 2001
- Klappenbach, J.-L.; Saxman, P.-H.; Cole, J.-R.; Schmidt, T.-M. Rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database *Nucleic Acids Research*. 29:181–184; 2001
- Klein, M.; Friedrich, M.; Roger, A.J.; Hugenholtz, P.; Fishbain, S.; Abicht, H.; Blackall, L.L.; Stahl, D.; Wagner, M. Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *Journal of Bacteriology*. 183:6028-6035; 2001
- Kondolf, G.M. PROFILE: Hungry Water: Effects of Dams and Gravel Mining on River Channels. *Environmental Management*. 21:533-551; 1997
- Korfel, C.A.; Mitsch, W.J.; Hetherington, T.E.; Mack, J.J. Hydrology, Physiochemistry, and Amphibians in Natural and Created Vernal Pool Wetlands. *Restoration Ecology*. 18:843-854; 2010
- Kovacic, D.A.; Twait, R.M.; Wallace, M.P.; Bowling, J.M. Use of created wetlands to improve water quality in the Midwest—Lake Bloomington case study. *Ecological Engineering*. 28:258-270; 2006
- Kuzyakov, Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 38:425-448; 2006
- L. Rousseau, D.P.; Vanrolleghem, P.A.; Pauw, N.D. Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis. *Ecological Engineering*. 23:151-163; 2004
- Lal, R. Tillage effects on soil degradation, soil resilience, soil quality, and sustainability. *Soil and Tillage Research*. 27:1-8; 1993
- Lang, A. The pitfalls of pitfalls: a comparison of pitfall traps catches and absolute density estimates of epigeal invertebrates predators in arable land. *Anz Schadlingskd Pfl*. 73:99-106; 2000
- Leloup, J.; Petit, F.; Boust, D.; Deloffre, J.; Bally, G.; Clarisse, O.; Quillet, L. Dynamics of Sulfate-Reducing Microorganisms (dsrAB genes) in Two Contrasting Mudflats of the Seine Estuary (France). *Microb Ecol*. 50:307-314; 2005
- Lu, S.; Hu, H.; Sun, Y.; Yang, J. Effect of carbon source on the denitrification in constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*. 21:1036-1043; 2009
- MA. Millennium Ecosystem Assessment, ecosystems and human well-being: a framework for assessment. . Island Press, Washington, DC, USA; 2003
- Mander, Ü.; Löhmus, K.; Teiter, S.; Mäuring, T.; Nurk, K.; Augustin, J. Gaseous fluxes in the nitrogen and carbon budgets of subsurface flow constructed wetlands. *Science of The Total Environment*. 404:343-353; 2008

- Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:795–799; 1998
- Matheson, F.E.; Nguyen, M.L.; Cooper, A.B.; Burt, T.P.; Bull, D.C. Fate of ¹⁵N-nitrate in unplanted, planted and harvested riparian wetland soil microcosms. *Ecological Engineering*. 19:249-264; 2002
- Matthew, D.W.; David, D.M.; Mary, F.; and Mary, V. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological society of america*. 16:2143-2152; 2006
- Matthews, J.W.; Spyreas, G.; Endress, A.G. Trajectories of vegetation-based indicators used to assess wetland restoration progress. *Ecological Applications*. 19:2093-2107; 2009
- Mentzer, J.; Goodman, R.; Balsler, T. Microbial response over time to hydrologic and fertilization treatments in a simulated wet prairie. *Plant and Soil*. 284:85-100; 2006
- Merilä, P.; Strömmer, R.; Fritze, H. Soil microbial activity and community structure along a primary succession transect on the land-uplift coast in western Finland. *Soil Biology and Biochemistry*. 34:1647-1654; 2002
- Meybeck, M.; De Marsily, G.; Fustec, E. La Seine en son bassin : fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé. Elsevier:pp 749; 1998
- Meyer, B.; Kuever, J. Molecular Analysis of the Diversity of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryotes in the Environment, Using *aprA* as Functional Marker Gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 7664-7679; 2007
- Millennium Ecosystem Assessment. Millennium Ecosystem Assessment, ecosystems and human well-being: a framework for assessment. Island Press, Washington, DC, USA; 2005
- Miller, N. Effets de natural and humain disturbance on floodplain vegetation.; 1998
- Mitsch, W.J. Wetland creation, restoration, and conservation: A Wetland Invitational at the Olentangy River Wetland Research Park. *Ecological Engineering*. 24:243-251; 2005
- Mitsch, W.J.; Day Jr, J.W. Restoration of wetlands in the Mississippi–Ohio–Missouri (MOM) River Basin: Experience and needed research. *Ecological Engineering*. 26:55-69; 2006
- Mitsch, W.J.; Day, J.W.; Zhang, L.; Lane, R.R. Nitrate-nitrogen retention in wetlands in the Mississippi River Basin. *Ecological Engineering*. 24:267-278; 2005
- Mitsch, W.J.; Gosselink, J.G. Wetlands Tird Edition.920; 2000a
- Mitsch, W.J.; Gosselink, J.G. Wetlands, 3th ed. John Wiley and Sons, New York.920 p; 2000b
- Mitsch, W.J.; Gosselink, J.G. Wetlands Tird Edition.920; 2002
- Mitsch, W.J.; Gosselink, J.G. Wetlands, Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA.582; 2007
- Moiroud, A.; Capellano, A.; Danière, C. Un procédé exemplaire de réaménagement et de reverdissement des carrières : l'emploi des espèces fixatrices d'azote atmosphérique. Rapport final:34 p; 1991
- Moore, T.L.C.; Hunt, W.F. Ecosystem service provision by stormwater wetlands and ponds – A means for evaluation? *Water Research*. 46:6811-6823; 2012
- Moore, T.R.; Dalva, M. The influence of temperature and water table position on carbon dioxide and methane emissions from laboratory columns of peatland soils. *Journal of Soil Science*. 44:651-664; 1993
- Moreno-Mateos, D.; Comín, F.A.; Pedrocchi, C.; Rodríguez-Ochoa, R. Effects of wetland construction on nutrient, SOM and salt content in semi-arid zones degraded by intensive agricultural use. *Applied Soil Ecology*. 40:57-66; 2008

- Moreno, D.; Pedrocchi, C.; Comín, F.A.; García, M.; Cabezas, A. Creating wetlands for the improvement of water quality and landscape restoration in semi-arid zones degraded by intensive agricultural use. *Ecological Engineering*. 30:103-111; 2007
- Müller, N. Effects of natural and human disturbances on floodplain vegetation, In: Müller, N., Okuda, S. & Tama, N. (eds.), *Proceedings of International Symposium for River Restoration*, Tokyo. 209 pp; 1998
- Muyzer, G.; De Wall, E.-C.; Uitierlinden, A.-G. Gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695–700; 1993
- Muyzer, G.; Stams, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6:441–454; 2008
- Neue, H.U.; Gaunt, J.L.; Wang, Z.P.; Becker-Heidmann, P.; Quijano, C. Carbon in tropical wetlands. *Geoderma*. 79:163-185; 1997
- NIST. The 2005 NIST Machine Translation Evaluation Plan (MT-05). 2005
- O'Geen, A.T.; Budd, R.; Gan, J.; Maynard, J.J.; Parikh, S.J.; Dahlgren, R.A. Chapter One - Mitigating Nonpoint Source Pollution in Agriculture with Constructed and Restored Wetlands. in: Donald L.S., ed. *Advances in Agronomy: Academic Press*; 2010
- Observatoire des Zones Humides Méditerranéennes. Biodiversité - Etat et tendances des espèces des zones humides méditerranéennes. Dossier thématique N°1. Tour du Valat, France:52 pages; 2012
- Ouddane, B.; Abbasse, G.; Halwani, J.; Fischer, J.C. Determination of metal partitioning in porewater extracted from the Seine River Estuary sediment (France). *Journal of Environmental Monitoring*. 6:243-253; 2004
- Pacific, V.; McGlynn, B.; Riveros-Iregui, D.; Welsch, D.; Epstein, H. Variability in soil respiration across riparian-hillslope transitions. *Biogeochemistry*. 91:51-70; 2008
- Paillex, A.; Dolédec, S.; Castella, E.; Méricoux, S. Large river floodplain restoration: predicting species richness and trait responses to the restoration of hydrological connectivity. *Journal of Applied Ecology*. 46:250-258; 2009
- Parr, J.F.; Papendick, R.I.; Hornick, S.B.; Meyer, R.E. Soil quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*. 7:5-11; 1992
- Passoni, M.; Morari, F.; Salvato, M.; Borin, M. Medium-term evolution of soil properties in a constructed surface flow wetland with fluctuating hydroperiod in North Eastern Italy. *Desalination*. 246:215-225; 2009
- Paul, E.A.a.C., F.E. *Soil microbiology and biochemistry* 273; 1989
- Pett-Ridge, J.; Silver, W.; Firestone, M. Redox Fluctuations Frame Microbial Community Impacts on N-cycling Rates in a Humid Tropical Forest Soil. *Biogeochemistry*. 81:95-110; 2006
- Peu, P., 2008. La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation. Rapport de thèse; 2011
- Piégay, H.; Pautou, G.; and Ruffinoni, C. Les forêts riveraines des cours d'eau: écologie, fonctions et gestion. Institut pour le Développement Forestier:463; 2003
- Pinay, G.; Clément, J.C.; Naiman, R.J. Basic Principles and ecological consequences of changing water regimes on nitrogen cycling in fluvial systems. *Environmental Management*. 30:481-491; 2002
- Pinay, G.; Decamps, H. The role of riparian woods in regulating nitrogen fluxes between the alluvial aquifer and surface water: A conceptual model. *Regulated Rivers: Research & Management*. 2:507-516; 1988
- Pinay, G.; Gumiero, B.; Tabacchi, E.; Gimenez, O.; Tabacchi-Planty, A.M.; Hefting, M.M.; Burt, T.P.; Black, V.A.; Nilsson, C.; Iordache, V.; Bureau, F.; Vought, L.; Petts, G.E.;

- DÉCamps, H. Patterns of denitrification rates in European alluvial soils under various hydrological regimes. *Freshwater Biology*. 52:252-266; 2007
- Pinay, G.; Ruffinoni, C.; Fabre, A. Nitrogen cycling in two riparian forest soils under different geomorphic conditions. *Biogeochemistry*. 30:9-29; 1995
- Pinay, G.; Tremolieres, M. La rétention et l'élimination de l'azote. *Fonctions et valeurs des zones humides* 129:14; 2000
- Plassart, P.; Akpa Vincelas, M.; Gangneux, C.; Mercier, A.; Barray, S.; Laval, K. Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 127:286-293; 2008
- Programme scientifique Seine-Aval. Contextes climatique, morphologique & hydro-sédimentaire : Inondations par débordement dans l'estuaire de la Seine. Rapport Seine-Aval 2010:pp 1 - 6; 2010
- Quillet, L.; Besaury, L.; Popova, M.; Paissé, S.; Deloffre, J.; Ouddane, B. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the medway estuary (UK). *Marine Biotechnology*. 14:363-381; 2012
- Ramsar. 1971
- Ratering, S.; Conrad, R. Effects of short-term drainage and aeration on the production of methane in submerged rice soil. *global change biology*. 4:397-407; 1998
- Reddy K.R.; Patrick W.H. nitrogen transformation and loss in flooded soils and sediments. *Critical reviews in environmental control*. 13:273-309; 1984
- Reddy, K.R.; Patrick, J.W.H. Effect of alternate aerobic and anaerobic conditions on redox potential, organic matter decomposition and nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 7:87-94; 1975
- Reddy, K.R.; Patrick, W.H. nitrogen transformation and loss in flooded soils and sediments. *Critical reviews in environmental control*. 13:273-309; 1984
- Rich, J.J.; King, G.M. Carbon monoxide consumption and production by wetland peats. *FEMS Microbiology Ecology*. 28:215-224; 1999
- Robertson, G.P.; Coleman, D.C.; Bledsoe, C.S.; and Sollins, P. Standard soil methods for long-term ecological research. 1999
- Rösch, C.; Mergel, A.; Bothe, H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3818-3829; 2002
- Rychnovska, M. Structure and functioning of seminatural meadows Developments in agricultural and managed-forest ecology. 27:386; 1993
- Samson, S.; Delouis, A.; Bérépion, J.M. Expérience de mise en dépôt des sédiments de dragage dans une ancienne ballastière. *Journées Nationales Génie Civil*; 2002a
- Samson, S.; Delouis, A.; Bérépion, J.M. Expérience de mise en dépôt des sédiments de dragage dans une ancienne ballastière. *VIIèmes Journées Nationales Génie Civil-Génie Côtier*. France; 2002b
- Sawtschuk, J. Restauration écologique des pelouses et des landes des falaises littorales atlantiques : Analyse des trajectoires successionales en environnement contraint. *Rapport de thèse*:397; 2012
- Scala, D.J.; Kerkhof, L.J. Diversity of nitrous oxide reductase (nosZ) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1681-1687; 1999
- Scott Bechtold, J.; Naiman, R.J. Soil texture and nitrogen mineralization potential across a riparian toposequence in a semi-arid savanna. *Soil Biology and Biochemistry*. 38:1325-1333; 2006
- SER. The SER international primer on ecological restoration 2004a

- SER. (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group). The SER International Primer on Ecological Restoration www.ser.org & Tucson : Society for Ecological Restoration International; 2004b
- SER. (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group): The SER International Primer on Ecological Restoration. www.ser.org & Tucson : Society for Ecological Restoration International.; 2004
- Shafroth, P.B.; Stromberg, J.C.; Patten, D.T. Riparian vegetation response to altered disturbance and stress regimes. *Ecological Applications*. 12:107-123; 2002
- Sims, R.W.; Gerard, B.M. Earthworms: Notes for the identification of British species. 4th Edition. Published for The Linnean Society of London & The Estuarine & Coastal Sciences Association by Field Studies Council, Montford Bridge. Shrewsbury: Pp 169 1999
- Six, J.; Bossuyt, H.; Degryze, S.; Deneff, K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*. 79:7-31; 2004
- Song, K.; Lee, S.-H.; Mitsch, W.J.; Kang, H. Different responses of denitrification rates and denitrifying bacterial communities to hydrologic pulsing in created wetlands. *Soil Biology and Biochemistry*. 42:1721-1727; 2010
- Spieles, D. Vegetation development in created, restored, and enhanced mitigation wetland banks of the United States. *Wetlands*. 25:51-63; 2005
- Spieles, D.; Coneybeer, M.; Horn, J. Community Structure and Quality After 10 Years in Two Central Ohio Mitigation Bank Wetlands. *Environmental Management*. 38:837-852; 2006
- Stefanik, K.C.; Mitsch, W.J. Structural and functional vegetation development in created and restored wetland mitigation banks of different ages. *Ecological Engineering*. 39:104-112; 2012
- Sutton-Grier, A.E.; Kenney, M.A.; Richardson, C.J. Examining the relationship between ecosystem structure and function using structural equation modelling: A case study examining denitrification potential in restored wetland soils. *Ecological Modelling*. 221:761-768; 2010
- Tabacchi, E.; Planty-Tabacchi, A.-M.; Salinas, M.J.; DÉCamps, H. Landscape structure and diversity in riparian plant communities. *Regulated Rivers: Research & Management*. 12:367-390; 1996
- Tan, Y.; Li, J.; Cheng, J.; Gu, B.; Hong, J. The sinks of dissolved inorganic nitrogen in surface water of wetland mesocosms. *Ecological Engineering*. 52:125-129; 2013
- Tanner, C.C.; D'Eugenio, J.; McBride, G.B.; Sukias, J.P.S.; Thompson, K. Effect of water level fluctuation on nitrogen removal from constructed wetland mesocosms. *Ecological Engineering*. 12:67-92; 1999
- Taylor, C.R.; Hook, P.B.; Stein, O.R.; Zabinski, C.A. Seasonal effects of 19 plant species on COD removal in subsurface treatment wetland microcosms. *Ecological Engineering*. 37:703-710; 2011
- Theriot, J.M.; Conkle, J.L.; Reza Pezeshki, S.; DeLaune, R.D.; White, J.R. Will hydrologic restoration of Mississippi River riparian wetlands improve their critical biogeochemical functions? *Ecological Engineering*. 60:192-198; 2013
- Thomsen, I.; Schjøning, P.; Christensen, B. Mineralisation of ¹⁵N-labelled sheep manure in soils of different texture and water contents. *Biol Fertil Soils*. 37:295-301; 2003
- Tiedje, J.M.; Sexstone, A.J.; Parkin, T.B.; Revsbech, N.P.; and Shelton, D. Anaerobic processes in soil. *Plant and Soil*. 76:197-212; 1984
- Trémolières, M.; Schnitzler, A. Floodplain Protection, Restoration, Management: Why and how? Paris: Tec&Doc; 2007a

- Trémolières, M.; Schnitzler, A. Floodplain Protection, Restoration, Management: Why and how? Tec&Doc, Paris; 2007b
- Trettin, C.C.; Jurgensen, M.F.; Gale, M.R.; McLaughlin, J.W. Recovery of carbon and nutrient pools in a northern forested wetland 11 years after harvesting and site preparation. *Forest Ecology and Management*. 262:1826-1833; 2011
- Trimmer, M.; Nicholls, J.C.; Deflandre, B. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6447-6454; 2003
- Unger, I.M.; Kennedy, A.C.; Muzika, R.-M. Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 42:1-8; 2009
- Vallauri, D.R.; Aronson, J.; Barbero, M. An Analysis of Forest Restoration 120 Years after Reforestation on Badlands in the Southwestern Alps. *Restoration Ecology*. 10:16-26; 2002
- Van den Bosch, R. dredging in rivers and estuaries. *fresh surface water*. 3; 1988
- van Oorschot, M.; van Gaalen, N.; Maltby, E.; Mockler, N.; Spink, A.; Verhoeven, Jos T.A. Experimental manipulation of water levels in two French riverine grassland soils. *Acta oecologica*. 21:49-62; 2000
- Van Roon, M.R. Wetlands in The Netherlands and New Zealand: Optimising biodiversity and carbon sequestration during urbanisation. *Environmental Management*. 101:143-150; 2012
- Vance, E.D.; Brggke, P.C.; Jenkinon, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology & biochemistry*. 19:pp 703-707; 1987
- Vymazal, J. Long-term performance of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: Ten case studies from the Czech Republic. *Ecological Engineering*. 37:54-63; 2011
- Vymazal, J.; Kröpfelová, L. Removal of organics in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: A review of the field experience. *Science of The Total Environment*. 407:3911-3922; 2009
- Wagner, M.; Roger, A.-J.; Flax, J.-L.; Brusseau, G.-A.; Stahl, D.-A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology*. 180:2975-2982; 1998
- Waletzko, E.; Mitsch, W. The Carbon Balance of Two Riverine Wetlands Fifteen Years After Their Creation. *Wetlands*. 33:989-999; 2013
- White, J.R.; Ramesh Reddy, K.; Moustafa, M.Z. Influence of hydrologic regime and vegetation on phosphorus retention in Everglades stormwater treatment area wetlands. *Hydrological Processes*. 18:343-355; 2004
- Wiley. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. 4:3204; 2009
- Wong, M.H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. 50:775-780; 2003
- WRB. *World Reference Base for Soil Resources 2006*, 2nd (ed). *World Soil Resources Reports*. 103; 2006
- Wylylko, D. Prairie wetlands and carbon sequestration : Assessing sinks under the Kyoto Protocol. *Winnipeg*:12-13; 1999
- Yoshinari, T.; Hynes, R.; Knowles, R. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 9:177-183; 1977
- Zhang, S.; Wang, L.; Hu, J.; Zhang, W.; Fu, X.; Le, Y.; Jin, F. Organic carbon accumulation capability of two typical tidal wetland soils in Chongming Dongtan, China. *Journal of Environmental Sciences*. 23:87-94; 2011

- Zhang, T.; Fang, H.P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:281-289; 2006
- Zumft, W.G. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 61:533-616; 1997
- Zumft, W.G. The denitrifying prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY; 1999
- Zverlov, V.; Klein, M.; Lücker, S.; Friedrich, M.; Kellermann, J.; Stahl, D.A.; Loy, A.; Wagner, M. Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *Journal of Bacteriology.* 187:2203-2208; 2005

LISTE DS FIGURES & TABLEAUX PAR CHAPITR

Chapitre 1 :

Figure 1.1. (A) Cycle du carbone avec un focus sur les transferts de sédiments dans les systèmes fluviaux (d'après Hoffmann et al. (2009) avec : PIC=Particulate Inorganic Carbon, POC=Particulate Organic Carbon, DIC=Dissolved Inorganic Carbon, DOC=Dissolved Organic Carbon, GPP=Gross Primary Production) (B) Cycle de l'azote dans un sol de zone humide présentant des conditions aérobies et anaérobies (Groffman et al., 1998; Pinay et al., 2002; Pinay and Tremolieres, 2000).

Figure 1.2. Le cycle du soufre et les voies de transformations (Peu, 2011).

Figure 1.3. Evolution de la concentration relative des différents composés chimiques en fonction du temps.

Figure 1.4. (A) Organisation en modulaires de la dénitrification. Et (B) Organisation en modulaires de la sulfato-réduction (Zumft, 1997).

Figure 1.5. Carte de la Seine, du barrage de Poses à la baies de Seine (Guézennec, 1999).

Figure 1.6. Aménagements des berges de la Seine entre Pose et Tancarville (GIP, Seine-Aval 2009).

Figure 1.7. Modèle général du processus de dégradation des écosystèmes et les réponses possibles pour leur restauration (A) Processus écologique de dégradation (perturbation limitées) ; (B) Processus écologique de dégradation (perturbation prolongées et répétitives) ; (C, D) Phases de réhabilitation ; (E) Phase de réaffectation; (F) Phase d'accompagnement ou de restauration passive); (1) Stade initial à résilience maximale; (2) Stade modifié sans dépassement du seuil d'irréversibilité; (3) Stade dégradé; (4) Stade réhabilité; (5) Écosystème objectif de la restauration (Bangirinama et al., 2012).

Figure 1.8. Les étapes du comblement de la ballastière à Yville sur Seine.

Figure 1.9. Localisation géographique de la Haute-Normandie (A), et méandres de la Seine de Poses à Tancarville et les sites d'étude retenus sont identifiés par une étoile jaune (B).

Tableau 1.1. Fonctions des zones humides dénombrées par Fustec and Frochot (1996)

Tableau 1.2 : Principales formes de l'azote inorganique intervenant dans le cycle de l'azote

Tableau 1.3. Séquence de ces réactions (Faulwetter et al., 2009)

Tableau 1.4. Tableau qui traduit la surface des zones humides de l'estuaire (Alard, 2002).

Tableau 1.5. Sites d'étude.

Chapitre 2 :

Figure 2.1. Zonation de l'estuaire de Seine (Guézennec, 1999).

Figure 2.2. (A) Position des 7 sites d'étude au sein de l'estuaire de Seine (B) et schéma reconstituant le gradient de connectivité au fleuve de l'ensemble des 7 sites prospectés (source : E. Langlois, figure tirée du rapport final du projet REBEBAS, 2012).

Figure 2.3. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des profils pédologiques (18 profils, 62 horizons et 20 descripteurs physico-chimiques) des 7 sites : (A) Cercle des corrélations associées au deux premiers axes, et (B) projection des objets horizons. Les deux premiers axes représentent 65,81% de la variance, la direction des flèches donnent le sens de la plus variation des descripteurs.

Figure 2.4. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur l'ensemble des profils pédologiques (18 profils, 62 horizons et 20 descripteurs physico-chimiques) : (a) projection des sites d'échantillonnage (profils pédologiques), et (b) projection du degré de connexion (DC = Directement Connecté, IC = Indirectement Connecté et NC = Non Connecté).

Figure 2.5. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les paramètres fonctionnels mesurés *in situ* sur l'ensemble des sites d'études entre avril 2011 et mars 2012. Projections des paramètres fonctionnels par (A) zones d'échantillonnage et (B) degrés de connexion. (CO₂ : respiration totale du sol; Minnet : minéralisation nette; NO₂ : dénitrification réel; NH₄ et NO₃ : formes minérale de l'azote; Corg : carbone organique; Ntot : azote total; NOD : azote organique dissous; BM : biomasse microbienne; E : potentiel redox).

Figure 2.6. Régressions linéaires entre le potentiel redox et (A) la respiration, (B) la dénitrification, et (C) la minéralisation N nette.

Figure 2.7. Schéma montrant sur l'ACP réalisée sur l'ensemble des paramètres fonctionnels mesurés *in situ* sur les 4 sites pilotes l'interprétation des deux premiers axes. Abréviations : P = Petiville, TB = Trou Buquet et TD = Trou Deshayes).

Tableau 2.1. Diversité des types de sols sur les 7 sites sélectionnés. Les zones sont présentées en fonction de leur degré de connectivité au fleuve et des abréviations entre crochets sont données pour chaque zone d'échantillonnage. Les types de sol sont dénommés selon le Référentiel pédologique 2008 (AfeS 2009). Le diagnostic « zone humide » est établi selon l'arrêté du 1er octobre 2009 (modifié d'après le rapport final du projet REBEBAS, 2012).

Tableau 2.2. Dénomination des 18 profils pédologiques observés sur les 7 sites d'échantillonnage selon le Référentiel Pédologique (AfeS, 2009) et rattachement de chaque profil au gradient de connexion (DC = Directement Connecté, IC = Indirectement Connecté et NC = Non Connecté).

Tableau 2.3. Valeurs moyennes des stocks de C et N en Kg/m² des horizons de surface (0-10 cm) des sols. Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Tableau 2.4. Résultats de taux de minéralisation potentielle du C et SIR des horizons de surface (0-10 cm) des sols des 4 sites pilote (Petiville, Trou Buquet, Trou Deshayé, Grande Vase / Petite Vase). Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Tableau 2.5. Résultats de taux de minéralisation potentielle de l’N (anaérobie et aérobie) et de la dénitrification potentielle ou DEA des horizons de surface (0-10 cm) des sols des 4 « sites pilotes » (Petiville, Trou Buquet, Trou Deshayé et Grande Vase / Petite Vase). Les lettres (a, b, ...) indiquent les différences significatives entre sites (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Chapitre 3 :

Figure 3.1. Effects of frequent changes in flooding - draining conditions on mean redox potentials in (A) Mudflat soil, (B) Salix soil, (C) Populus soil (C) over 14 days’ incubation in the experimental mesocosms: C, DD, and PF correspond to the various treatments (mean \pm SEM, n=3).

Figure 3.2. Changes in inorganic nitrogen as influenced by frequent changes in flooding – draining conditions over 14 days’ incubation in the experimental mesocosms: C, DD, and PF correspond to the various treatments. Patterns of ammonium concentrations (A1, A2, and A3) and nitrate concentrations (B1, B2 and B3) respectively measured in the Mudflat, Salix and Populus soils.

Figure 3.3. Denitrification rates in (A) Mudflat soil, (B) Salix soil, and (C) Populus soil in C, DD, and PF between 0 and 14 days of incubation (mean \pm SEM, n=3).

Figure 3.4. qPCR quantification of total bacteria (A, B, C), denitrifying bacteria (A1, B1, C1) and sulfate-reducing bacteria (A2, B2, C2) under different treatments (C, DD, and PF) over 14 days’ incubation (mean \pm SEM, n=3) in three different soils (Mudflat soil (A, A1, A2), Salix soil (B, B1, B2) and Populus soil (C, C1, C2)).

Figure 3.5. Quantification of 16S rRNA (A, B, C), *nosZ* mRNA (A1, B1, C1) and *dsrB* mRNA (A2, B2, C2) with fluctuation events (DD and PF) between 0 and 14 days’ incubation (mean \pm SEM, n=3) in three different soils (Mudflat soil (A, A1, A2), Salix soil (B, B1, B2) and Populus soil (C, C1, C2)).

Figure 3.6. Principal component analysis carried out on the matrix of different bacterial community density and activity, representing 70% of the variability. Variables are (i) 16S rDNA abundance and activity (total bacteria), *dsrB* mRNA (sulfate-reducing bacteria) and *nosZ* mRNA (denitrifying bacteria) genes, (ii) 16S rRNA, *dsrB* mRNA and *nosZ* mRNA abundance between day 0 (black) and day 14 (white) of incubation in three soils (Mudflat soil, Salix soil and Populus soil): (a) eigenvalue diagram; (b) site ordination and (c) Coding for sites and treatments. PCA axis 1 accounts for 40% of the variation and axis 2 accounts for 18%.

Figure 3.7. Correlation matrix (Pearson) of the PCA performed on soil physicochemical parameters and different bacterial community density. Values in bold are significantly different from 0 at $P < 0.05$. *Eh* soil redox potential, *N-NH4* ammonium content, *N-NO3* nitrate content, *nosZ* gene encoding Nitrous Oxide Reductase (denitrifying bacteria), and *dsrB* gene encoding dissimilatory Sulfite Reductase (sulfate-reducing bacteria).

Table 3.1. Physico-chemical properties of the soils used in this experiment. Symbols indicate the methods used in physico-chemical analyses.

Table 3.2: F-values and significance of ANOVA testing the effects of soil type, flood duration, and treatments (C, DD, and PF) on ecological functioning and bacterial community structure.

Table 3.3. F-values and significance of ANOVA testing the effects of soil type, flood duration, and treatments (C, DD, and PF) on bacterial community activity.

Table 3.4. Summary of statistically significant effects of flooding time (0, 3, 7, 14 days), flooding conditions (DD and PF), and their interactions (NS = P -value > 0.1).

Chapitre 4 :

Figure 4.1. (A) Geographical situation of the study sites along the Seine River, and (B) Scheme/Diagram of the River-Floodplain connectivity scale and location of our study sites.

Figure 4.2. Changes in redox potential values and inorganic nitrogen contents (mean \pm SEM, $n=3$) due to flooding over the flood duration in the experimental mesocosms. C, PF, and PFA correspond to the different treatments. Redox potential values (A, B, C, and D), N-NH₄ content (A', B', C', and D') and N-NO₃ content (A'', B'', C'', and D'') patterns measured in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.

Figure 4.3. Denitrification rates (mean \pm SEM, $n=3$) depending on flood duration and treatment in the experimental wetlands. A, B, C, and D represent the changes in denitrification rates in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.

Figure 4.4. Changes in the patterns of *16S rRNA* gene copy numbers, *nosZ* gene copy numbers and *dsrB* gene copy numbers (mean \pm SEM, $n=3$) due to flooding over the flood duration in the experimental mesocosms. C, PF, and PFA correspond to the different treatments. *16S rRNA* gene copy numbers (A, B, C, and D), *nosZ* gene copy numbers (A', B', C', and D') and *dsrB* gene copy numbers (A'', B'', C'', and D'') patterns measured in the High connected soil, Low connected mineral soil, Disconnected soil, and Low connected organic soil, respectively.

Figure 4.5. Changes in the patterns of denitrifying bacteria / total bacteria ratios (A, B, C and D), and sulfato-reducing bacteria / total bacteria ratios (A', B', C' and D') with different hydrological pulsing events (C, and PF) over the whole flooding period (mean \pm SEM, $n=3$) in four different soils (High connected soil (A and A'), Low connected mineral soil (B and B'), Disconnected soil (C and C') and Low connected organic soil (D and D')).

Figure 4.6. Correlation matrix (Pearson) of the PCA performed on soil physicochemical parameters and different bacterial community density. Values in bold are significantly different from 0 at $P < 0.05$. Eh soil redox potential, N-NH₄ ammonium content, N-NO₃ nitrate content, *nosZ* gene encoding Nitrous Oxide Reductase (denitrifying bacteria), and *dsrB* gene encoding dissimilatory Sulfite Reductase (sulfate-reducing bacteria).

Table 4.1. Physicochemical properties of the soils used in this experiment.

Table 4.2. Results (F-values and significance) of ANOVA testing for the effects of soil, flood duration and treatments (C, PF, and PFA) on ecological functions and bacterial community structure.

Table 4.3. Summary of statistically significant effects of flooding time (0, 3, 7, 14 days), flooding conditions (DD and PF treatments), and their interactions (NS = P -value > 0.1).

Chapitre 5 :

Figure 5.1. (A) Map showing the location of RS in the Seine Estuary, (B) RS operation: stages of the filling

Figure 5.2. Sampling sites for soil properties, collembolan communities, earthworm communities, and PLFA in the RS and CS.

Figure 5.3. Soils type.

Figure 5.4. Spatial distribution of soil properties in 2008. Scale bar shows the extent of the estimated properties.

Figure 5.5. Spatial distribution of soil properties in 2011. Scale bar shows the extent of the estimated properties.

Figure 5.6. (A) Abundance of earthworms assemblages in RS and CS along the first three years of restoration and (B) earthworm species in CS and RS ; different letters indicate significant differences at $p=0.05$.

Figure 5.7. (A) Abundance of collembolan assemblages in RS and CS along the first three years of restoration, (B) mean collembolan species richness in CS and RS and (C) Similarity percentage (Bray-Curtis Dissimilarity Index) of collembolan assemblages between CS and RS ; different letters indicate significant difference at $p=0.05$.

Table 5.1. Phospholipid fatty acids commonly used as biomarkers for specific groups of microorganisms.

Table 5.2. Physico-chemical properties of the soils surveyed in this study. A symbol indicates used methods in physico-chemical analysis.

Table 5.3. List of earthworm species collected during the study.

Table 5.4. Mol % of phospholipid fatty acids (PLFA) in the different site types shown as means of the measurements.

Table 5.5. Mean and S.E. ($n=3$) for total, bacterial and fungal PLFAs and ratio of fungal and bacterial PLFAs in RS and CS. Letters indicates significant differences between zones according to kruskall-wallis and ANOVA Tukey's test ($p<0.05$, $n=3$).

Chapitre 6 :

Figure 6.1. (A) Localization of the restored gravel-pit in the Seine Estuary, (B) Aerial picture of the Recreated Soil (RS) at Yville (11ha), and Control Soil (CS), (C) schematic enlargement of RS, and illustration of the sampling methodology, and (D) sampling plots (RS and CS plots).

Figure 6.2. (A) SIR, and (B) monthly respiration rates in RSs and CS from June 2009 to February 2011 (means \pm s.e). Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$, $n=3$).

Figure 6.3. (A) DEA, and (B) Denitrification rates in RSs and CS from February 2010 to April 2011 (means \pm s.e) between April 2011 and March 2012. Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$, $n=3$).

Figure 6.4. Nitrate (A), Ammonium (B), and Nitrogen Net mineralization rates (C) in RSs and CS from June 2009 to February 2011 (mean \pm SEM, n=3).

Table 6.1: Means value (and standard deviations, n = 3) of the physico-chemical analyses performed on each different soil profile.

Table 6.2: Results (F-values and significance) of MANOVA testing the effects of zones and dates on soil processes (respiration, denitrification, net N mineralization) and soil inorganic N content (ammonium and nitrate).

Table 6.3. Means \pm S.E. (n=3) of total soil respiration, substrate-induced respiration (SIR), and SIR/soil respiration ratios in RSs and CS. According to ANOVA Tukey's HSD test (rejection level 0.05) the sites labelled with the same letter do not differ significantly.

Table 6.4. Summary of mean values (and standard deviations, n = 3) for potential C and N mineralization in CS and RSs between 2008 and 2011. Letters indicate significant differences between zones (a and b) according to ANOVA Tukey's test (P -value < 0.05, n=3).

Table 6.5. Comparison of denitrification rates in various created and natural wetlands.

ANNEXES

Annexe 2 : Mesure de la densité apparente

Principe

La densité apparente est liée à la nature et à l'organisation des constituants du sol. Elle permet, en outre, de calculer la porosité et d'apprécier ainsi indirectement la perméabilité, la résistance à la pénétration des racines, la cohésion des horizons et la réserve en eau du sol (YORO et Godo, 1990). Le volume est estimé immédiatement sur le terrain alors que le poids est évalué au laboratoire après séchage et pesée.

Matériel

- Cylindres
- Boîtes à tare
- Balance précise à 0,01g près

Mode opératoire

Pour chaque zone de prélèvements, un cylindre de sol est prélevé (enfoncé par percussion) pour déterminer la densité apparente qui dépend de la porosité et de la structure du sol. Les principes de la méthode au cylindre sont fondés sur la détermination du poids spécifique apparent d'un volume de sol prélevé. Le volume est estimé immédiatement sur le terrain alors que le poids est évalué au laboratoire après séchage et pesée. Le sol humide des cylindres est retiré puis pesé dans une boîte à tare avant et après avoir été séché dans une étuve à 105°C pendant au moins 24 heures.

Calcul

La connaissance du poids et du volume du sol permet de calculer la densité apparente selon la relation :

$$D_a = P/V$$

où P est le poids sec de l'échantillon en gramme
et V le volume de l'échantillon prélevé et séché en cm^{-3}
La densité apparente s'exprime en g. cm^{-3}

Annexe 3 : Mesure de la minéralisation potentielle anaérobie de l'azote du sol

Principe

Le sol est placé en condition anaérobie pendant 7 jours. La création d'ammonium (NH₄) et de nitrates (NO₃) durant cette période correspond à la minéralisation potentielle anaérobie de l'azote du sol.

Appareillage

Récipients de 45 et 250mL

Eau déminéralisée.

Étuve réglable à 40°C.

Pipette de 10mL.

Balance précise à 0,01 g près.

Mode opératoire

Mettre 15 g de sol et 37,5mL d'eau déminéralisée dans un flacon de 45mL.

En parallèle, effectuer une extraction et un dosage de l'azote minéral du sol afin de connaître la concentration à T₀ ainsi qu'une mesure d'humidité afin de connaître le poids de sol sec P contenu dans chaque flacon.

Placer les flacons dans une étuve et les faire incuber à 40°C pendant 7 jours.

Retirer les flacons de l'étuve et aspirer le plus d'eau possible à l'aide d'une pipette en faisant attention à ne pas aspirer de sol.

Transvaser la totalité du sol dans un récipient de 250mL pour effectuer une extraction et un dosage de l'azote minéral à T_f. Lors de cette étape, utiliser du K₂SO₄ à 35g/L pour l'extraction.

Calculs et expression des résultats

Minéralisation potentielle anaérobie, exprimée en µg d'N-min / jour / g de sol sec :

$$\text{Minéralisation potentielle anaérobie} = \frac{[\text{N-min}]_{Tf} - [\text{N-min}]_{T0}}{7 P}$$

Taux de minéralisation, exprimé en % de N_{total} du sol / jour :

$$\text{Taux de minéralisation potentiel} = \frac{\text{Minéralisation potentielle}}{\text{N total}} \times 100$$

ANDERSON J.M. & INGRAM J.S.I., 1993, *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, CAB International, Oxon, 2nd édition, page 79.

Annexe 4 : Mesure de la capacité de rétention d'eau des sols

Principe

Le sol est saturé en eau puis ressuyé. L'humidité du sol est alors mesurée et correspond à la capacité de rétention d'eau du sol.

Matériel

- Cylindres utilisés pour la mesure de la densité apparente
- Filtres de grammage 42 (de marque Whatman) et grilles en plastiques
- Bain d'eau
- Plateau contenant du sable
- Etuve réglable à 105°C
- Boîtes à tare
- Balance précise à 0,01g près

Mode opératoire

Chaque cylindre est posé sur un filtre, lui-même posé sur une grille et ce dans un bac. Le cylindre est ensuite rempli partiellement de sol. De l'eau est alors rajoutée dans le bac pour que le niveau soit un peu plus bas que le haut du cylindre. Les cylindres sont laissés ainsi durant deux heures puis de l'eau est à nouveau rajoutée pour que le niveau dépasse le haut du cylindre et ce pendant une heure. Les cylindres sont ensuite retirés de l'eau pour être placés sur un plateau de sable pendant deux heures. Le sol humide est retiré puis pesé dans une boîte à tare avant et après avoir été séché dans une étuve à 105°C pendant au moins 24 heures.

Calcul

La capacité de rétention (CR) est calculée comme suit :

$$\frac{C - S}{S - T} \times 100$$

Où

C est la masse du sol humide + la boîte à tare, en grammes

S est la masse du sol sec + la boîte à tare, en grammes

T est la masse de la boîte à tare, en grammes

La capacité de rétention est exprimée en pourcentage de masse sèche de sol.

AFNOR, 2004, ISO 14240-2:1997(F), in *Évaluation de la qualité des sols Volume 2 : Méthodes d'analyses physique et biologique*, page 378-379.

Annexe 5 : Mesure des capacités de minéralisation potentielle du Carbone

Principe

Le CO₂ rejeté lors de la minéralisation du carbone est fixé par la soude (NaOH à 0.2M) pour former du carbonate de sodium (Na₂CO₃ à 0.1M). Cette réaction a pour conséquence la diminution de la quantité d'ions Na⁺ et Cl⁻ dans la solution de soude et donc la diminution de sa conductivité. La mesure de la conductivité permet ainsi de déterminer la quantité de CO₂ rejeté par les micro-organismes du sol lors de la minéralisation de la matière organique et ce via une gamme étalon.

Matériel

- Solution de soude NaOH 0,2 M
- Carbonate de calcium Na₂CO₃ 0,1M
- Flacons de 30 mL
- Bocal en verre
- Conductimètre (WTW LF330 de marque Bioblock)

Mode opératoire

En plus des bocaux contenant les sols testés, trois bocaux témoins ont été mis à incuber avec des flacons de soude. Ils permettent d'enregistrer le CO₂ naturellement présent dans les bocaux. Une gamme étalon est également réalisée afin de corréliser la conductivité et la quantité de CO₂ dégagée. Cette gamme comprend plusieurs solutions de 20 ml contenant une quantité décroissante de NaOH et une quantité croissante de Na₂CO₃.

La conductivité de la soude est mesurée chaque semaine pour chaque flacon de soude, remplacé ensuite par un autre après la mesure.

Calculs et expression des résultats

- ♦ Minéralisation potentielle aérobie (CO₂-min), exprimée en mg de CO₂ / g de sol sec / jour :

$$CO_2\text{-min} = \frac{\sum (CO_2 \text{ éch} - CO_2 \text{ témoin})}{28 P}$$

Où i est la semaine de mesure, P est le poids sec de sol contenu dans le bocal en gramme

- ♦ Taux de minéralisation potentiel, exprimé en % de C_{organique} du sol / jour :

$$\text{Taux de minéralisation potentiel} = \frac{C\text{-CO}_2}{C_{\text{orga}} \times 28} \times 100$$

Où C-CO₂ est la quantité de C rejetée par minéralisation, soit 12/44 de CO₂-min.