THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Ecologie, Biodiversité et Evolution

Présentée et soutenue par :

M. ALEXANDRE RAIMBAULT

le jeudi 30 novembre 2023

Titre :

Conséquences de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur la diversité fongique du sol et les implications fonctionnelles en forêt ancienne

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Dynamiques et écologie des paysages agriforestiers (DYNAFOR)

Directeur(s) de Thèse :

M. ANTOINE BRIN

MME MELANIE ROY

Rapporteurs :

M. JEROME CORTET, UNIVERSITE MONTPELLIER 3

M. LAURENT BERGES, INRAE SAINT MARTIN D'HERES

MME CENDRINE MONY, UNIVERSITE RENNES 1

Membre(s) du jury :

MME CORINNE VACHER, UNIVERSITE DE BORDEAUX, Président

M. ANTOINE BRIN, EI PURPAN, Membre

M. FLORENT MARTOS, UNIVERSITE SORBONNE, Invité(e)

MME LUCIE VINCENOT, UNIVERSITE DE ROUEN, Invité(e)

MME MELANIE ROY, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

Résumé

Les forêts anciennes sont considérées comme des milieux riches en biodiversité avec la présence d'espèces rares ou spécialistes ce qui leur octroie une grande valeur de conservation. En France, les forêts anciennes sont les forêts antérieures au minimum forestier (milieu du XIXème siècle). Les forêts récentes sont apparues après cette période. Les champignons sont essentiels au fonctionnement des écosystèmes forestiers. Notamment, les relations mycorhiziennes peuvent faciliter la survie et la croissance des arbres dans les forêts boréales et tempérées. Le développement du metabarcoding sur l'ADN environnemental (ADNe) facilite le suivi des communautés du sol.

Ma thèse a pour objectif général d'aborder la surveillance de la biodiversité des sols de forêts anciennes. Précisément, durant ma thèse, nous nous sommes questionnés sur :

- Les conséquences de la fragmentation forestière sur les communautés fongiques du sol ;
- Le possible rôle des réseaux mycorhiziens sur la survie et la croissance des semis en forêts anciennes et récentes au moyen d'une approche expérimentale ;
- L'influence de la qualité de l'habitat en forêt ancienne sur les communautés de la biodiversité évaluée par l'ADNe du sol.

A l'aide d'un échantillonnage du sol conséquent et de l'utilisation du metabarcoding de l'ADNe, il a été démontré que les réponses fongiques à la fragmentation passée et actuelle étaient complexes mais confirment que la fragmentation passée influence encore de nos jours les communautés fongiques. L'approche expérimentale mise en place dans différentes parcelles forestières n'a pas permis de montrer une influence significative des réseaux mycorhiziens sur la croissance et la survie des plantules. Cependant, la survie a été significativement plus élevée en forêt ancienne durant les premiers mois de l'expérimentation. A l'aide d'un indice de biodiversité potentielle, le dernier volet a montré que les principaux phylums du sol étaient sensibles à la qualité de l'habitat.

Cette thèse a permis de montrer que la biodiversité du sol était sensible aux perturbations anthropiques et que ses réponses pouvaient être décalées dans le temps. Pour les gestionnaires forestiers, il est nécessaire de prendre en compte ces observations pour minimiser la perte en biodiversité du sol. Ces organismes sont essentiels au fonctionnement des forêts et leur perte pourrait perturber cet équilibre.

Abstract

Ancient forests are considered to be environments rich in biodiversity, with the presence of rare or specialist species, giving them a high conservation value. In France, ancient forests are those that predate the forestry minimum (mid-19th century). Recent forests appeared after this period. Fungi are essential to the functioning of forest ecosystems. In particular, mycorrhizal relationships can facilitate the survival and growth of trees in boreal and temperate forests. The development of metabarcoding on eDNA makes it easier to monitor soil communities.

The general aim of my thesis is to address the monitoring of soil biodiversity in ancient forests. Specifically, during my thesis, we looked at:

- The consequences of forest fragmentation on soil fungal communities;
- The possible role of mycorrhizal networks on the survival and growth of seedlings in ancient and recent forests, using an experimental approach;
- The influence of habitat quality in ancient forests on biodiversity communities as assessed by soil eDNA.

With the help of extensive soil sampling and the use of eDNA metabarcoding, it was shown that fungal responses to past and present fragmentation were complex, but confirmed that past fragmentation still influences fungal communities today. The experimental approach implemented in various forest plots did not show a significant influence of mycorrhizal networks on seedling growth and survival. However, survival was significantly higher in ancient forest during the first months of the experiment. Using a potential biodiversity index, the final section showed that the main soil phyla were sensitive to habitat quality.

This thesis has shown that soil biodiversity is sensitive to human disturbance and that its response can be delayed over time. Forest managers need to take these observations into account to minimize the loss of soil biodiversity. These organisms are essential to the functioning of forests and their loss could upset this balance.

Remerciements

« Tout commence par un rêve » est le message que j'ai retenu d'un film vu récemment. Je pense que je peux l'utiliser pour résumer le chemin abouti pour devenir scientifique. Mon rêve de devenir scientifique est apparu un soir d'automne 1997 au cinéma devant Jurassik Park 2. Il s'est dorénavant réalisé ce 30 novembre 2023. Néanmoins, jamais, je n'aurai pu réussir ce travail de travail de thèse sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Par avance, je tiens à m'excuser si j'ai oublié de remercier des personnes.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et la région Occitanie d'avoir financé ma thèse durant ces trois années.

Je remercie fortement Mélanie et Antoine de m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse et pour leur bienveillance tout le long. Merci de m'avoir laissé l'opportunité de faire ces collaborations scientifiques en Roumanie et en Argentine. Sans vous, il m'aurait été difficile de réaliser mon rêve de devenir scientifique.

Pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et leurs conseils pour l'améliorer, je remercie les membres de mon jury de thèse Cendrine Mony, Laurent Bergès, Jérôme Cortet, Corinne Vacher, Lucie Vincenot et Florent Martos.

Ensuite, je tiens à remercier les membres des laboratoires EDB et DYNAFOR de m'avoir accueilli et aidé à réaliser ce travail de thèse. Et plus particulièrement, je tiendrai à remercier Sophie pour son aide précieuse pour les extractions d'ADN, Jérôme pour m'avoir accompagné durant toutes ces journées de terrain dans le Gers, Sylvie et François pour m'avoir aidé en SIG.

Pour leur accueil chaleureux dès mon premier jour et jusqu'à mon dernier jour à l'école d'ingénieurs de Purpan, je tiens à remercier mes anciens collègues du département Biodiversité et plus particulièrement Lionel, Véronique, Jean-Philippe, Jean-Marie et Hervé.

Le quotidien dans ce bureau « isolé » aurait été terne sans la présence de certaines personnes. Merci à Océane, Coralie, Franck, Thomas, Léonie et Clémence pour m'avoir aidé dans la réalisation de cette thèse et aussi par votre présence qui rendait le quotidien moins monotone.

Bien que nos chemins se sont séparés, Justine, je ne pourrai jamais assez te remercier pour m'avoir accompagné et encouragé durant ces neuf années. Ta rigueur scientifique m'a toujours inspiré pour mes travaux. Un simple merci ne suffirait pas pour exprimer ma reconnaissance envers toi.

Enfin, je souhaite remercier mes parents et mon frère pour m'avoir encouragé depuis le début. Vous êtes à l'origine de cette réussite. Merci Clément pour ton soutien et tes week-ends à Toulouse. Merci papa de m'avoir emmené voir Jurassik Park 2 un soir de novembre 1997. Comme beaucoup d'enfants de ma génération, j'ai voulu devenir paléontologue par la suite et ce fut ma porte d'entrée dans le domaine des sciences. Merci maman de m'avoir fait découvrir Friends et le personnage de Ross qui a été une première source de « modèle professionnel ». Sans votre éducation et confiance, jamais, je n'aurai eu l'opportunité de réaliser mon rêve.

Table des matières

Résumé 2
Abstract 3
Remerciements 4
Table des matières 6
Table des tableaux 10
Liste des figures 11
I. Introduction générale 13
I.1. Fragmentation des forêts anciennes et conséquences sur les communautés 14
I.1.1. Les forêts anciennes, des forêts particulièrement fragmentées 14
I.1.2. Menaces présentes en forêts anciennes 20
I.2. Les champignons des sols forestiers 28
I.2.1. Qu'est-ce qu'un champignon ? 28
I.2.2. Rôle des champignons en forêts 30
I.2.3. Influence des paysages sur les communautés fongiques 31
I.2.4. Influence de la structure du peuplement forestier sur les communautés fongiques 32
I.3.Ecologie des communautés 34
I.3.1. Structuration des communautés 34
I.3.2. Synthèse de ces théories 34
I.3.3. Rôle de la dispersion dans l'assemblage des communautés fongiques 37
I.4. Le metabarcoding de l'ADNe, un outil pour aborder la diversité des communautés du sol des forêts anciennes ? 41
I.4.1 L'ADNe et le metabarcoding, avantages et limites 41
1.4.2 Application de l'ADNe et du metabarcoding pour identifier les champignons 42
I.5. Objectif général de la thèse 43
Références 46
II. Méthodes et matériels généraux 61
II.1. Les forêts anciennes d'Occitanie 62
II.2. Dynamique passée, actuelle et future du hêtre dans le Sud-Ouest en France 63
II.2. Sélection des parcelles 65
II.3. Description des peuplements forestiers échantillonnés 67
II.4. Echantillonnage du sol et traitement 68
II.5. Autres analyses communes aux trois axes 71
Références 73
III. Comment la fragmentation et la quantité d'habitats influencent les communautés fongiques du sol en forêts anciennes ? 76

Préambule 77
Abstract 78
III.1. Introduction 79
III.2. Material and Methods 81
III.2.1. Plot selection and measurement of forest fragmentation and quantity 81
III.2.2. Soil fungal eDNA sampling 82
III.2.3. Molecular biology and sequencing 83
II.2.4. Bioinformatics 83
III.2.5. Soils analysis 84
III.2.6. Statistical analysis on fungal diversity 84
III.3. Results 85
III.3.1. Taxonomic and functional characterization of soil fungal diversity 85
III.3.2. Site characteristics and selection of co-variables 86
III.3.3. Responses of the soil fungal diversity 86
III.3.4. Responses of the different fungal guilds 89
III.3.5. Responses of the different fungal growth forms 90
III.4. Discussion 93
III.5. Conclusions 95
Acknowledgement 96
Références 97
Appendices 101
IV. Comment la diversité des communautés mycorhiziennes en forêt ancienne influence la croissance des plantules de hêtre (*Fagus sylvatica) ?* 105
Préambule 106
High diversity of ectomycorrhizal fungal communities but not common mycorrhizal network favor *Fagus sylvatica* L. seedlings growth in ancient forests 107
Abstract 108
IV.1. Introduction 109
IV.2. Material and Methods 111
IV.2.1. Study site 111
IV.2.2. Soil fungal diversity in ancient and recent forest soils 111
IV.2.3. Environmental characteristics of ancient and recent forest soils 112
IV.2.4. Common mycorrhizal network exclusion and experimental design 112
IV.2.5. Response of saplings to CMN exclusion 113
IV.2.6. Response of soils and carbon storage to CMN exclusion 114
IV.2.7. Molecular biology and sequencing for soil and root associated fungi 114

IV.2.8. Bioinformatics on fungal sequences from soil and experiment 115
IV.2.9. Statistical analysis 115
IV.3. Results 116
IV.3.1. Environmental characteristics of ancient and recent forest soils 116
IV.3.2. Fungal diversity in ancient and recent forest soils 117
IV.3.3. Response of seedlings to CMN exclusion 118
IV.3.4. Response of soils to CMN exclusion 123
IV.4. Discussion 123
Références 125
Appendices 129
V. Comment la qualité de l'habitat en forêt ancienne influence la biodiversité du sol ? 131
Préambule 132
Influence de la qualité écologique des forêts anciennes sur la diversité taxonomique locale du sol 133
Résumé 134
V.1.Introduction 135
V.2.Matériels et méthodes 137
V.2.1. Sélection des parcelles 137
V.2.2. Mise en œuvre l'indice de biodiversité 137
V.2.3. Echantillonnage du sol 137
V.2.4. Biologie moléculaire et séquençage 138
V.2.5. Analyse bio-informatique 138
V.2.6. Analyse des sols 139
V.2.7. Analyse statistique de la diversité des eucaryotes 139
V.3.Résultats 140
V.3.1. Caractérisation taxonomique et fonctionnelle de la diversité fongique et en eucaryotes du sol 140
V.3.2. Réponse des phylums d'eucaryotes à la qualité de l'habitat 141
V.3.2. Réponse des guildes trophiques de champignons à la qualité de l'habitat 144
V.4.Discussion 145
V.5.Conclusion 148
Références 149
Annexes 155
VI. Discussion générale 158
VI.1. Synthèse générale 159
VI.1.1. Conséquence de la fragmentation et de la qualité de l'habitat en forêts anciennes 159

VI.1.2. La biodiversité et les fonctions des champignons des sols en forêt ancienne 161
VI.1.3. Influence de la maturité du peuplement sur les communautés fongiques du sol..... 161
VI.1.5. Vers une écologie des paysages pour les communautés du sol ? 163
VI.1.6. Influence des interactions mycorhiziens sur la régénération des forêts anciennes..... 163
VI.2. Limites de l'étude..... 164
VI.2.1. Limites cartographiques..... 164
VI.2.2. Limites historiques..... 165
VI.2.3. Limites méthodologiques..... 166
VI.3. Perspectives de recherche..... 167
VI.3.1. Influence de l'intensité de la fragmentation de l'habitat sur les communautés fongiques du sol..... 167
VI.3.2. Influence de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur la composante fonctionnelle de la biodiversité du sol..... 167
VI.3.3. Mosaïque d'habitats versus habitats/ non habitat 168
VI.3.4. Utilisation des réseaux de co-occurrence pour observer la résilience des communautés 169
VI.3.5. Améliorations du dispositif expérimental visant à observer la présence des CMN dans les forêts..... 169
VI.4. Conclusion..... 170
Références..... 171

Table des tableaux

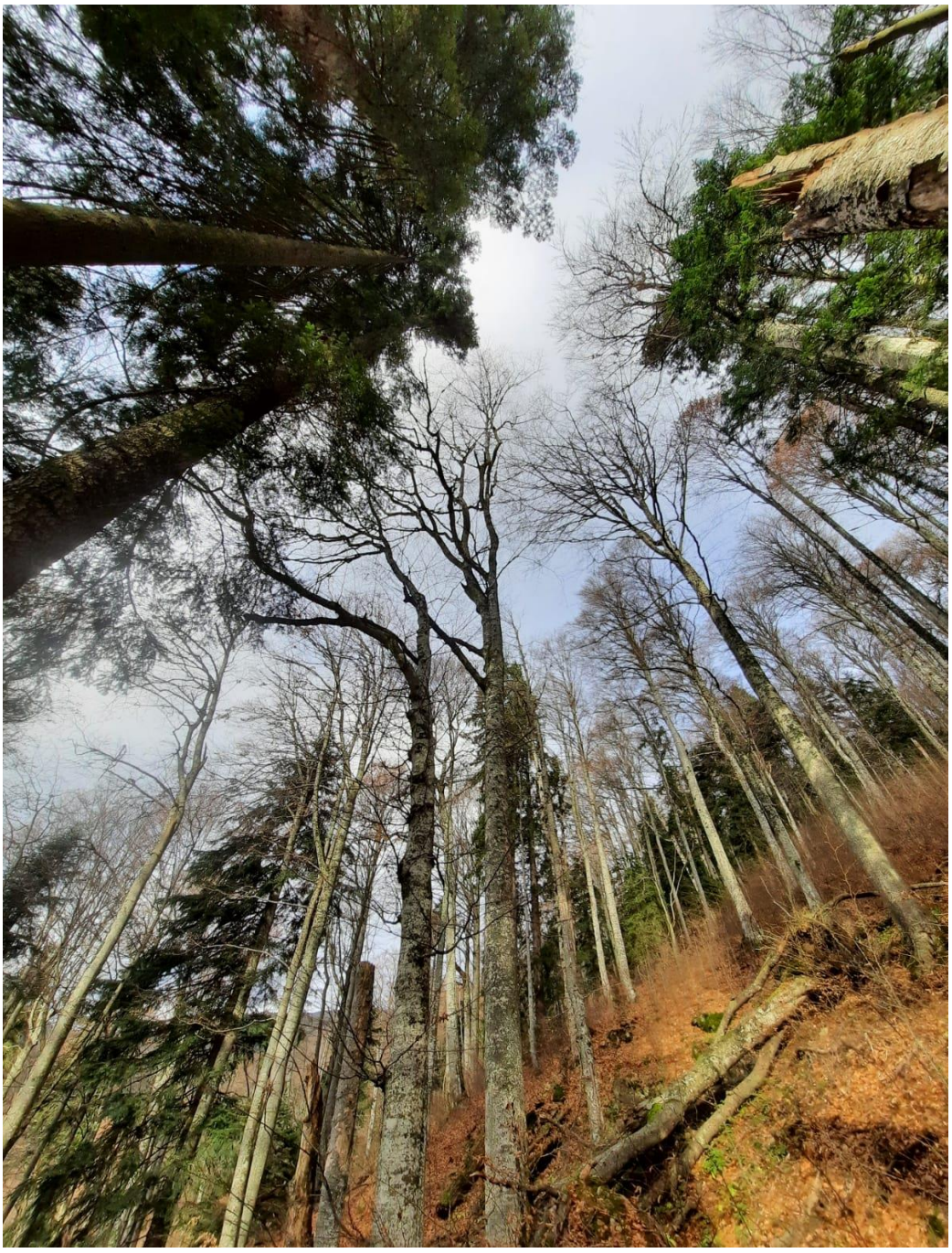
Tableau 1- Results of linear regressions for all fungi and each trophic guild and for the three Hill number (species richness, q=0; Shannon index q=1; inverse of Simpson index, q=2). 88
Tableau 2- Difference in environmental characteristics between ancient and recent forests. 116
Tableau 3- Results of the regressions of survival and growth characteristics measured on the seedling with the age of the forest and the treatments. 122

Liste des figures

Figure 1- Détermination d'une forêt ancienne....16
Figure 2- Effet de la maturité sur les caractéristiques des peuplements....19
Figure 3- Métriques utilisées à l'échelle de la tache pour étudier l'effet de la fragmentation....20
Figure 4- Distinction entre les notions de perte de l'habitat et fragmentation de l'habitat en soi....21
Figure 5- Approches expérimentales à l'échelle du paysage pour étudier l'effet de la fragmentation..22
Figure 6- Distribution par départements de la proportion de forêts anciennes en pourcentage des forêts actuelles....23
Figure 7- Application des notions de dette d'extinction et crédit de colonisation en forêt ancienne et récente....25
Figure 8 - Les 10 facteurs de l'IBP....27
Figure 9 – Arbre phylogénique des champignons....29
Figure 10- Principaux programmes de recherches, méthodes, cadres conceptuels et théories développés depuis le milieu du XXème siècle en écologie des communautés....34
Figure 11- Les quatre processus qui peuvent modifier la richesse spécifique (S) dans une communauté....36
Figure 12- Représentation graphique de la théorie des communautés écologiques à différentes échelles spatiales....37
Figure 13- Modèle d'assemblage des communautés de champignons mycorhiziens à travers trois filtres sélectifs....39
Figure 14- Schéma bilan de la thèse avec les différents objectifs....45
Figure 15- Répartition actuelle du hêtre (Fagus sylvatica) en Europe Centrale et de l'Ouest....63
Figure 16- Evolution prévisible de la distribution possible du hêtre entre 1961-1990 et les périodes 2010-2040, 2040-2070, et 2070-2100....64
Figure 17- Localisation des sites d'échantillonnage ayant servi pour les volets 3 et 5....66
Figure 18- Localisation des parcelles forestières pour le volet 4....67
Figure 19- Dispositif expérimental d'échantillonnage du sol....68
Figure 20- Résumé des différentes sources de contamination et protection à mettre en œuvre....69
Figure 21-Equation proposée par Hill (1973) pour calculer les nombres de Hill....71
Figure 22- Equations basées sur les nombres de Hill permettant de calculer différents ordres de diversité....71
Figure 23-Distribution of sampled sites according to the number of patches and the proportion of ancient forest in the 1km buffer....82
Figure 24- Pie charts....86

Figure 25- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the diversity (q=0, 1 and 2) of all fungi. 87
Figure 26- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the diversity of symbiotrophic (q=0 and 2, a and b respectively) and pathotrophic fungi (q=0, c) 89
Figure 27- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the species richness (q=0) of agaricoid (a), corticioid (b), gasteroid fungi (c) and microfungi (d) 91
Figure 28- Implementation of the device 113
Figure 29- Results of principal component analysis 117
Figure 30- Venn diagrams. 118
Figure 31- Number of seedlings surviving 119
Figure 32- Growth rates 120
Figure 33- Responses of ecophysiological variables (Foliar surface, LDMC and Chlorophyll content) according to treatments 121
Figure 34- Dispositif expérimental. 138
Figure 35- Résultats de l'analyse en composantes principales 140
Figure 36- Diagrammes circulaires 141
Figure 37- Réponse de la diversité alpha des eucaryotes pour chaque nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol 142
Figure 38- Réponse de la diversité alpha des métazoaires pour chaque phylum et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol 143
Figure 39- Réponse de la diversité alpha chez les champignons pour chaque groupe trophique et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol 144
Figure 45- Localisation de la forêt « Pinsois » sur les différentes sources cartographiques à travers le temps 164

I. Introduction générale



I.1. Fragmentation des forêts anciennes et conséquences sur les communautés

I.1.1. Les forêts anciennes, des forêts particulièrement fragmentées

a) Définition et identité des forêts anciennes

La forêt est l'écosystème le plus représenté en Europe, où sa surface ne cesse d'augmenter, au moins récemment. Au sein de cet écosystème, les archives biologiques et historiques, mais aussi les observations des écologues et forestiers, ont permis de souligner des différences notables, relatives à la continuité temporelle, et de faire émerger le concept de forêt ancienne. L'ancienneté correspond à la continuité temporelle de l'état boisé, c'est-à-dire à la période de présence d'une forêt sans interruption pour des usages agricoles ou autres (Cateau *et al.*, 2015). La continuité temporelle de l'état boisé doit être aussi prouvée depuis plusieurs siècles sans discontinuité (GIP-Ecofor, 2023a). En France, cette continuité est décrite à partir de témoignages, notamment cartographiques et produits pendant les phases de minimum forestiers. Ainsi, les cartes produites par l'Etat-major aux alentours du milieu du XIXème siècle correspondent aussi à une période d'usage maximum des forêts, avant les exodes urbains liés à la révolution industrielle – et en conséquence au minimum de la superficie forestière en France métropolitaine (Figure 1a). Ces cartes attestent de la présence de forêts potentiellement plus anciennes, d'âge variable, mais sont globalement dites anciennes par opposition aux forêts absente de ces cartes, et probablement plus récentes. Cette limite du milieu du XIXème siècle pour caractériser l'ancienneté des forêts est admise en France (Dupouey *et al.*, 2007 ; Vallauri *et al.*, 2012 ; Dupouey, 2013). En effet, il aura fallu attendre la fin de la Révolution française pour avoir des estimations fiables. En 1791, la superficie forestière est estimée à 6,4 millions d'hectares ce qui équivalait à 12,4% du territoire total. Cependant, à l'opposé des forêts domaniales et communales, la prise en compte de la superficie des forêts privées dans cette estimation globale est superficielle (GIP-Ecofor, 2023c). Entre 1821-1834, la superficie forestière était estimée à 6,7 millions d'hectares soit 12,6% du territoire (Nice et la Savoie exclues) (GIP-Ecofor, 2023c). En 1878, la superficie forestière augmente pour atteindre plus de 9 millions d'hectares ce qui équivalait à 17% de la superficie totale du territoire (GIP-Ecofor, 2023c). Cette référence temporelle peut dépendre de la dynamique du couvert forestier propre à chaque pays (Hermy & Verheyen, 2007 ; Bergès & Dupouey, 2017). Ainsi selon les pays et les documents disponibles, la période pour définir l'ancienneté d'une forêt est une continuité temporelle de 150 à 400 ans au minimum (Hermy *et al.*, 1999). En Grande-Bretagne, les cartes du XVIIème siècle sont disponibles alors qu'en Suède, il faut attendre le début du 19ème pour avoir des cartes fiables (GIP-Ecofor, 2023b).

En France, il existe trois sources cartographiques qui peuvent être utilisées (Figure 1b). La première est la carte de Cassini (échelle du 1/86 500). Bien qu'elle semble être la plus intéressante pour son ancienneté (1749-1790), cette carte est imprécise et il y manque un grand nombre de petits boisements (Vallauri *et al.*, 2012). Les deux autres sources sont le cadastre napoléonien (1/2 500 en général, 1812-1850) et la carte d'Etat-major (1/40 000, 1818-1866) (Bergès & Dupouey, 2017). Le cadastre est plus précis que la carte d'Etat-major et est adapté à des études locales mais difficile à mettre en œuvre sur de grandes étendues (Rochel *et al.*, 2017). La carte d'Etat-major semble la plus adaptée pour des études à l'échelle régionale ou nationale et ce malgré une imprécision de l'ordre d'une soixantaine de mètres (Lallemant *et al.*, 2017). La numérisation de ces ressources cartographiques est un travail difficile et a permis d'observer une importante variabilité entre les régions (GIP-Ecofor, 2023b). En plaine, la surface forestière est moins variée que dans d'autres régions. Suite à la déprise agricole et à l'exode rurale, la surface agricole a beaucoup augmenté (GIP-Ecofor, 2023b). Malgré la constance de superficie forestière en plaine, la surface de forêt ancienne a régulièrement diminué suite aux déboisements des forêts anciennes et le retour d'un écosystème forestier sur les terres agricoles abandonnées (Jamoneau *et al.*, 2010; De Keersmaeker *et al.*, 2015). De nos jours, il est possible qu'un massif forestier soit constitué d'un assemblage de parties anciennes et récentes (GIP-Ecofor, 2023b). Dans notre cas, nous nous sommes basés sur les cartes de l'Etat-major. L'utilisation des archives forestière est un apport de preuves supplémentaires pour attester de l'ancienneté d'une forêt (Lathuillière & Gironde-Ducher, 2021). Elles informent sur la composition, la structure et le traitement des forêts au cours du temps, ce qui permet une meilleure compréhension de l'état actuel et de la trajectoire future des peuplements (Lathuillière & Gironde-Ducher, 2021). Enfin, la présence d'espèces typiques ou indicatrices de forêts anciennes peut apporter des informations non négligeables pour estimer la temporalité de la continuité forestière (Bergès & Dupouey, 2017; Lathuillière & Gironde-Ducher, 2021).

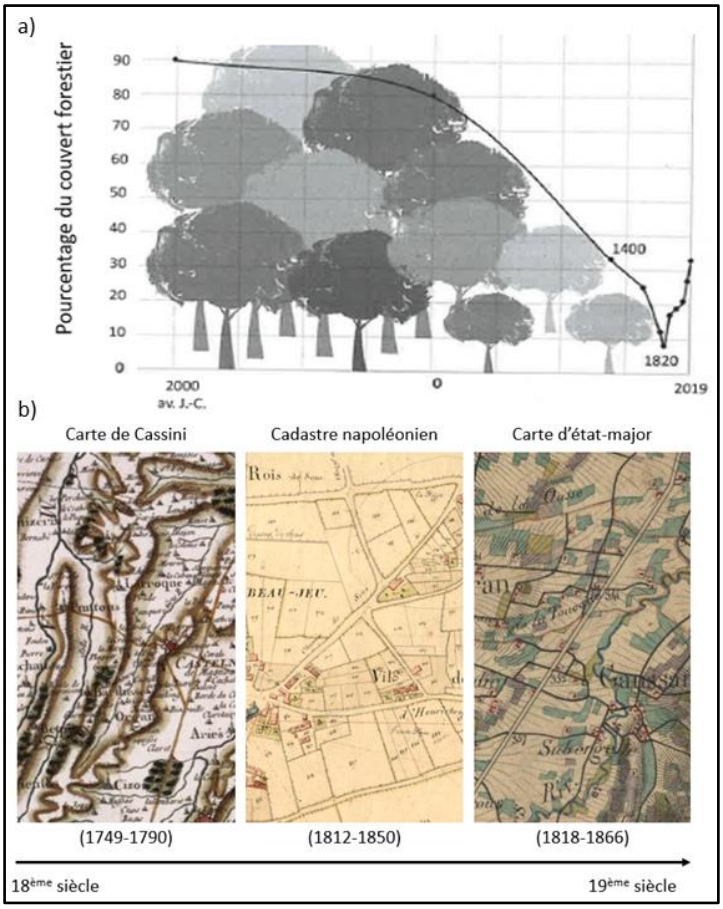


Figure 1- Détermination d'une forêt ancienne avec a) l' évolution de la couverture forestière en France au cours des siècles (Source : Le Tacon (2021)) et b) les sources cartographiques permettant d'estimer l'ancienneté d'une forêt en France (Source : Géoportail (2023))

b) Caractéristiques des forêts anciennes

En surface, il est parfois difficile d'estimer le caractère ancien d'une forêt en se basant sur la structure et la composition des peuplements forestiers (Flinn & Marks, 2007). En effet, les différences entre les forêts anciennes et récentes sont principalement visibles dans les caractéristiques physico-chimiques du sol et sont possiblement liées aux effets passés de l'agriculture et leur permanence sur le long terme (Diedhiou *et al.*, 2009). Néanmoins, selon le type d'agriculture passée, les effets diffèrent à long terme (Holmes & Matlack, 2018). Les sols qui étaient cultivés autrefois ont subi le labour ou le nivellement et ont eu des apports de nutriments ce qui a eu comme conséquences d'augmenter le pH et les concentrations en azote et phosphore (Koerner *et al.*, 1997; Compton & Boone, 2000) et de diminuer la quantité de matière organique (Compton & Boone, 2000). A l'inverse, les sols des anciens pâturages ont une concentration en carbone plus élevée mais un pH et des teneurs en azote et phosphore plus faibles (Compton & Boone, 2000). A cause des perturbations mécaniques pour la mise en place des cultures, les espèces du sous-étage forestier disparaissent. A contrario, le pâturage permettrait aux espèces forestières de survivre en tant qu'espèces marginales

de communautés de prairie, ou sous la forme d'organes souterrains (rhizomes) (Dyer, 2010) et enfin en trouvant refuge dans les affleurements rocheux (Holmes & Matlack, 2018).

c) Biodiversité évaluée par l'ADNe du sol en forêt ancienne

En offrant des conditions stables dans le temps, les forêts anciennes semblent faciliter l'établissement et la croissance d'espèces peu mobiles. Elles peuvent être ainsi considérées comme des zones « refuges » (Janssen, 2016) au sens biogéographique.

Les insectes sont les organismes les plus diversifiés et abondants en forêt (Dajoz *et al.*, 1998). Parmi ces organismes, les coléoptères sont essentiels au fonctionnement des forêts. Il est estimé que 50% des espèces sont associées aux forêts (Janssen, 2016). Parmi ce groupe, environ 20% sont saproxyliques et permettent la dégradation et la libération de la matière organique (Siitonen, 2001; Stokland *et al.*, 2012). Certaines espèces étant peu mobiles (Siitonen & Saaristo, 2000; Buse, 2012), la diversité spécifique était plus riche en forêt ancienne qu'en forêt récente (Gossner *et al.*, 2008; Irmler *et al.*, 2010; Brin *et al.*, 2016). Parmi les coléoptères, on distingue aussi les espèces carabiques qui sont principalement des prédateurs. Peu de résultats ont été publiés sur l'influence de l'ancienneté sur ces espèces. Cependant, les observations tendent à montrer des résultats contrastés entre forêt ancienne et récente même s'il semble y avoir des espèces spécifiques aux forêts anciennes (Assmann, 1999). En Europe, des études ont montré l'influence positive de la forêt ancienne sur les communautés de charançons saproxyliques (Buse, 2012), les mille-pattes (Magura *et al.*, 2015) et des syrphes (Herrault *et al.*, 2016). Pour les araignées, la composition en espèces des communautés diffère selon la continuité forestière et d'un point de vue fonctionnel les communautés de forêts anciennes sont davantage originales (Morel *et al.*, 2019).

Bien que la pédofaune représente 25% des espèces totales décrites à l'échelle du globe (Decaens *et al.*, 2006) et qu'elle soit essentielle au bon fonctionnement des écosystèmes (Seastedt, 1984; Nielsen *et al.*, 2011; Kopali *et al.*, 2014; Falco & Coviella, 2016), peu d'études ont testé l'effet de l'ancienneté (Janssen, 2016). La répartition des nématodes dépendrait en partie des caractéristiques physico-chimiques du sol (Yeates *et al.*, 2000; Háněl, 2001) et de leur régime alimentaire et plus précisément de la présence de champignons et de bactéries. La diversité en collemboles serait favorablement influencée par la continuité forestière (Heiniger *et al.*, 2014) car les forêts anciennes hébergeraient des espèces peu mobiles et sensibles au dessèchement (Ponge & Chevalier, 2006). Néanmoins, il semblerait que le pH influence principalement les communautés (Chauvat *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2016). Les collemboles auraient un délai de réponses long (quelques décennies à plusieurs siècles) face à des dérèglements non-cycliques (Ponge *et al.*, 2003). Les vers de terre seraient faiblement influencés par les changements d'usage du sol (Sigurdson & Gudleifsson, 2013). Il

faudrait 50-60 ans pour que les communautés de forêt récente et ancienne redeviennent quasi-similaire (Palo *et al.*, 2013; Sigurdson & Gudleifsson, 2013) même s'il semble y avoir encore de fortes différences au bout de 30 ans (Raty & Huhta, 2004a; Raty & Huhta, 2004b).

Durant ma thèse, le groupe cible a été principalement les champignons du sol. Les connaissances sur l'influence de l'ancienneté d'une forêt sur les champignons du sol ne sont pas nombreuses (Janssen, 2016; Spake *et al.*, 2016; Mennicken *et al.*, 2020). La plupart des études se sont concentrées sur la maturité du peuplement forestier (Encadré 1) (Kranabetter *et al.*, 2005; Palfner *et al.*, 2005; Fernandez-Toiran *et al.*, 2006; Twieg *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013) notamment l'influence de la quantité de bois mort sur les communautés fongiques (Blaser *et al.*, 2013; Parisi *et al.*, 2018). Diedhiou *et al.* (2009) ont montré que l'usage passé des terres durant l'Antiquité avait encore des effets importants sur les communautés mycorhiziennes forestières actuelles. La méta-analyse de Spake *et al.* (2015) a conclu qu'il fallait en moyenne 90 ans pour qu'une forêt restaurée ait une richesse spécifique en champignons ectomycorhiziens équivalente à une forêt ancienne. Dans les Cévennes, la diversité en champignons pathotrophes, symbiotrophes et saprotrophes était positivement corrélée à la proportion de forêt ancienne dans le paysage (Mennicken *et al.*, 2020) plus encore qu'à celle des forêts récentes. Dans les forêts anciennes de Belgique, la diversité en champignons ectomycorhiziens est supérieure à celle de forêts récentes isolées uniquement (Boeraeve *et al.*, 2018).

Les forêts anciennes sont considérées comme des milieux riches en biodiversité avec la présence d'espèces rares ou menacées (Peterken & Game, 1984; Spencer & Kirby, 1992; Brunet, 1993; Flensted *et al.*, 2016) notamment dans les anciens grands îlots (Kimberley *et al.*, 2014), ce qui leur octroie une grande valeur de conservation (Berges & Dupouey, 2021). Au Danemark, la présence de certaines espèces menacées d'extinction est davantage corrélée à la superficie forestière de 1810 (qui était de 3,5%) que celle actuellement (Flensted *et al.*, 2016). Néanmoins, il ne faut pas généraliser ce constat. Il est nécessaire d'étudier cette relation dans d'autres endroits afin de conclure sur la valeur de conservation des forêts anciennes vis-à-vis des espèces rares et menacées (Berges & Dupouey, 2021). Les sols de forêts anciennes sont riches en champignons mycorhiziens (Mennicken *et al.*, 2020). Les symbioses mycorhiziennes, dont les interactions inter-espèces peuvent stabiliser les réseaux écologiques ont aussi un rôle majeur dans la survie et la croissance des arbres. Ces symbioses sont considérées comme essentielles à la stabilité des forêts au moins tempérées et boréales (Pickles & Simard, 2017) et les expérimentations actuelles soulignent aussi l'importance de leurs réseaux inter-espèces dans la régénération des arbres ectomycorhiziens (Liang *et al.*, 2020).

Encadré 1 : Maturité des peuplements forestiers

En plus d'être influencée par l'ancienneté, la biodiversité forestière dépend aussi de la maturité du peuplement. La maturité « traduit l'avancement du développement biologique du peuplement des arbres qui composent la strate arborescente dominantes » (Cateau *et al.*, 2015). Cette notion est liée directement aux différentes étapes de développement d'un arbre : germination, installation, vieillissement, sénescence et mort (Cateau *et al.*, 2015; Janssen, 2016). En absence de gestion forestière, la maturité d'un peuplement peut s'intensifier. Dans le cadre de ma thèse, même si la maturité n'a pas été le centre de l'étude, elle a été contrôlée et prise en compte dans la sélection des sites. La maturité influence la structuration des peuplements. Un peuplement fortement mature augmente (Figure 2) :

- L'hétérogénéité structurale, ce qui signifie une variabilité importante dans les diamètres des arbres (Li & Reynolds, 1995; Franklin & Van Pelt, 2004) ;
- Le nombre d'arbres ayant un très gros diamètre (Spies & Franklin, 1991; McGee *et al.*, 1999; Whitman & Hagan, 2007; Burrascano *et al.*, 2013) ;
- Le nombre de bois mort (Siitonen, 2001; Vandekerkhove *et al.*, 2009; Meyer & Schmidt, 2011; Burrascano *et al.*, 2013) ;
- Le nombre et la diversité de dendromicrohabitats (Winter & Moller, 2008; Hjalten *et al.*, 2012; Larrieu *et al.*, 2012) ;
- L'ouverture du couvert végétal et de l'hétérogénéité de la lumière perçue au sol (Nicotra *et al.*, 1999; Vieilledent *et al.*, 2010).

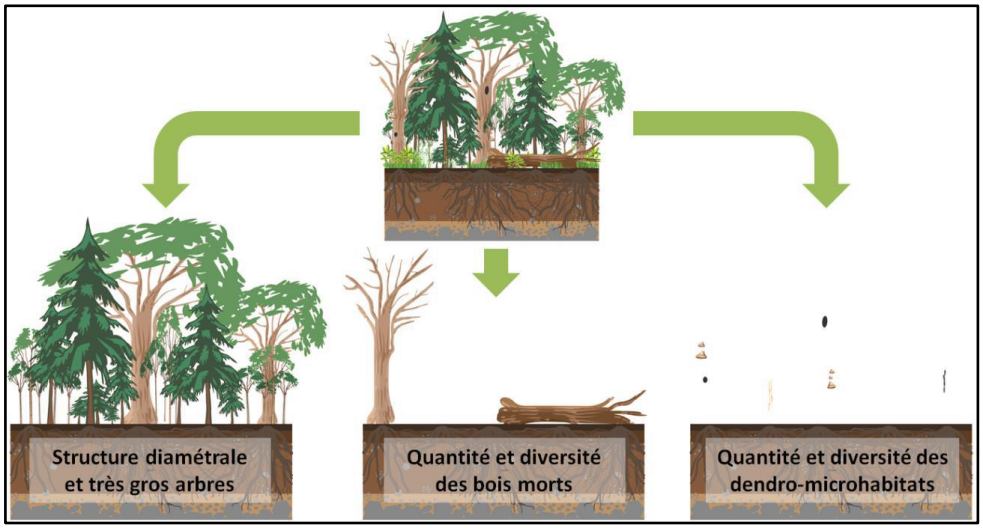


Figure 2- Effet de la maturité sur les caractéristiques des peuplements (Source : Janssen (2016))

I.1.2. Menaces présentes en forêts anciennes

a) Vision théorique de la fragmentation de l'habitat

La fragmentation se définit comme la transformation d'un paysage continu en plusieurs taches d'habitats plus ou moins éloignées les unes des autres avec des configurations et des tailles distinctes (Bennett et al., 2003). Les manières d'aborder les effets de la fragmentation et surtout l'échelle d'étude (tache ou paysage) ont initié un débat en écologie du paysage (Fletcher *et al.*, 2018; Martin, 2018; Fahrig *et al.*, 2019; Watling *et al.*, 2020). En effet, de nombreuses études ont démontré un effet négatif de la fragmentation de l'habitat à l'échelle du paysage en se basant sur des métriques mesurées à l'échelle de la tache (Figure 3) (Fletcher *et al.*, 2018). Cependant, ce constat est basé sur l'extrapolation de résultats observés à une échelle locale. Il s'agit donc essentiellement de prédictions qui doivent être vérifiées à l'échelle du paysage (Fahrig *et al.*, 2019).

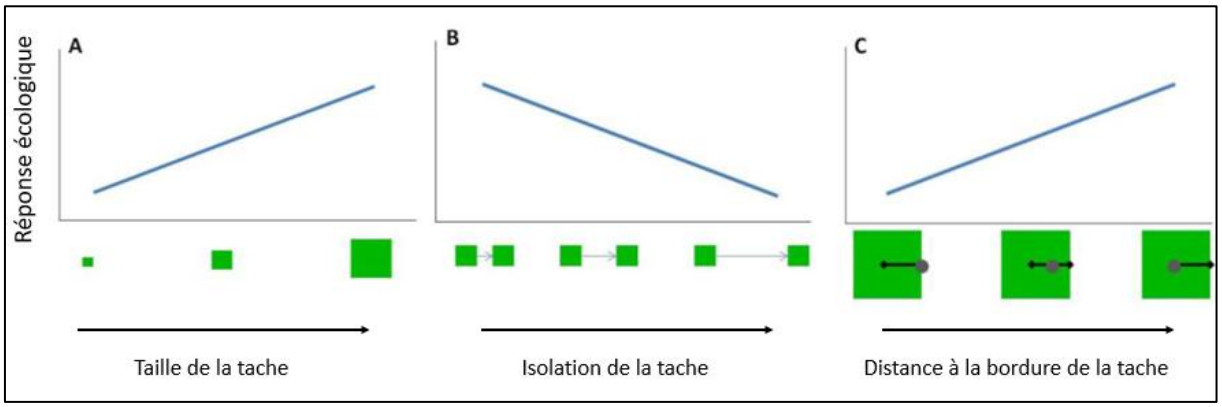


Figure 3- Métriques utilisées à l'échelle de la tache pour étudier l'effet de la fragmentation (Source : Fahrig et al., 2019)

Ce débat a souligné l'importance de distinguer la perte d'habitat et la fragmentation *per se* (Fahrig, 2003; Fahrig, 2013; Fahrig, 2017). Au-delà de la fragmentation, le paysage peut influencer la distribution des espèces de différentes manières. Fahrig (2013) s'oppose à la vision traditionnelle de la tache comme unité naturelle pour étudier les conséquences de la fragmentation sur les communautés d'espèces. La fragmentation *per se* est un concept spécifique à l'échelle du paysage et non à l'échelle de la tache (Fahrig, 2003; Fahrig, 2013; Fahrig, 2017). La perte d'habitat est un mécanisme durant lequel l'habitat est perdu au cours du temps (Figure 4). A l'inverse, la fragmentation *per se* est un changement dans le motif spatial. Pour une perte d'habitat équivalente, l'intensité de la fragmentation peut varier dans des paysages de taille équivalente. Ainsi, certains paysages contiendront des grandes taches et d'autres auront de nombreuses petites taches (Figure 4) (De Camargo *et al.*, 2018; Fahrig, 2017).

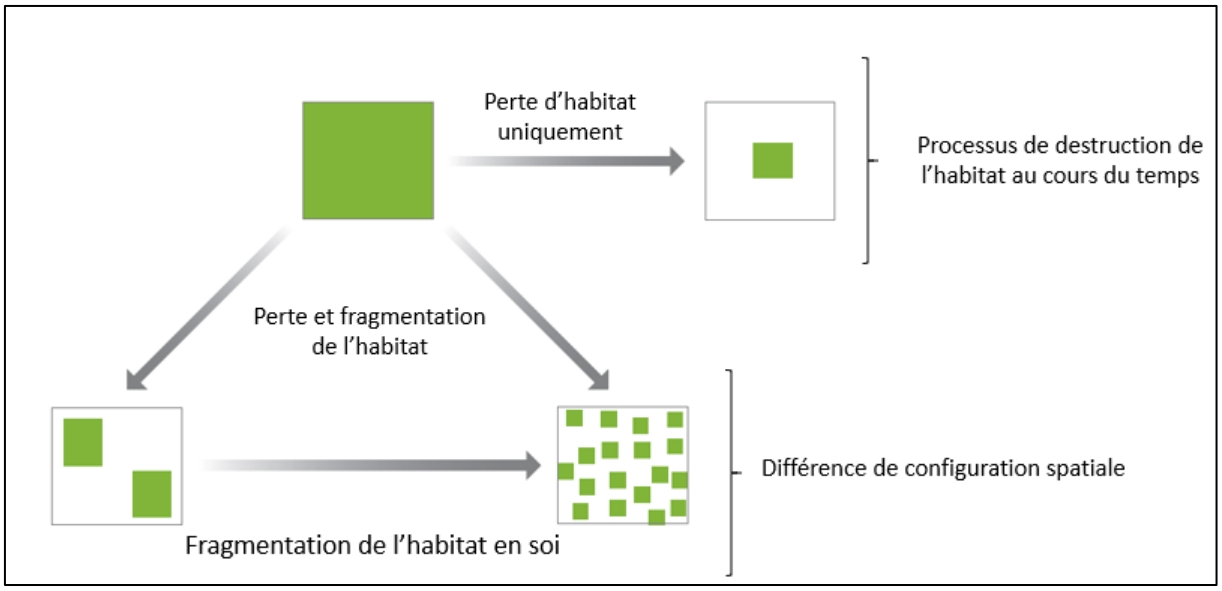


Figure 4- Distinction entre les notions de perte de l'habitat et fragmentation de l'habitat en soi (Source : Fahrig, 2017)

Fahrig (2013) émet une hypothèse basée sur la quantité d'habitat dans le paysage. Elle prédit que les effets de taille de la tache et son isolement sont confondus dans les effets de la quantité d'habitat dans le paysage. Cette hypothèse suppose que (i) la richesse spécifique dans des taches de taille fixe est positivement corrélée à la quantité d'habitat autour de la tache et non à la taille ou à l'isolement de cette dernière ; (ii) la quantité d'habitat prévoit davantage la densité en espèces que l'isolement des taches ; (iii) la densité en espèces n'est pas influencée par la fragmentation de l'habitat en soi et (iv) les effets de la taille des taches et de l'isolement ne s'accentuent pas avec la baisse de la quantité d'habitat dans le paysage (Watling *et al.*, 2020). Cette hypothèse est débattue depuis plusieurs années (Fletcher *et al.*, 2018; Martin, 2018; Fahrig *et al.*, 2019; Watling *et al.*, 2020). Pour certains auteurs, elle n'inclurait pas les taches les plus isolées (Lindgren & Cousins, 2017) et ne s'appliquerait pas à tous les organismes (Martin, 2018; Watling *et al.*, 2020). Une autre étude a réfuté cette hypothèse et affirme que l'isolement et la configuration des taches sont des éléments primordiaux de la richesse spécifique (Haddad *et al.*, 2017). La diversification des habitats et des ressources est favorable pour certaines espèces. En effet, la concurrence pour les ressources baisse et les nouveaux refuges diminuent la pression de prédation (Fahrig, 2017; Fahrig *et al.*, 2022). A l'inverse, certaines espèces souffrent de la fragmentation à cause de la modification de l'habitat local, la hausse de l'isolement et la hausse des effets de lisière (Lindenmayer *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2015; Fahrig *et al.*, 2022).

Afin d'étudier les réponses écologiques face à la fragmentation de l'habitat à l'échelle du paysage, trois approches ont été développées (Figure 5) (Fahrig, 2017). La première approche (Figure 5a) consiste à construire réellement plusieurs paysages (i) en contrôlant à la fois la quantité et la fragmentation de l'habitat pour que ces gradients soient indépendants (With *et al.*, 2002) (ii) en variant uniquement l'intensité de fragmentation de l'habitat pour une même quantité d'habitats (Wolff *et al.*, 1997; Goodwin & Fahrig, 2002). La deuxième approche (Figure 5b) consiste à sélectionner un ensemble de paysages existants, couvrant des gradients de perte d'habitat et de fragmentation, tout en veillant à leur indépendance (Hovel & Lipcius, 2001; Cushman & McGarigal, 2003; Robertson *et al.*, 2013; Plećaš *et al.*, 2014). La dernière approche (Figure 5c) est d'utiliser la théorie SLOSS (*single large or several small*) qui est basée sur la théorie de la biogéographie insulaire (MacArthur *et al.*, 1967). Cette approche étudie la richesse spécifique au moyen de différents paysages virtuels qui sont des ensembles de taches qui sont des sous-ensembles d'un ensemble plus grand. Tous les sous-ensembles ont une quantité d'habitat similaire mais varient en étendue de fragmentation de l'habitat (Fahrig, 2017).

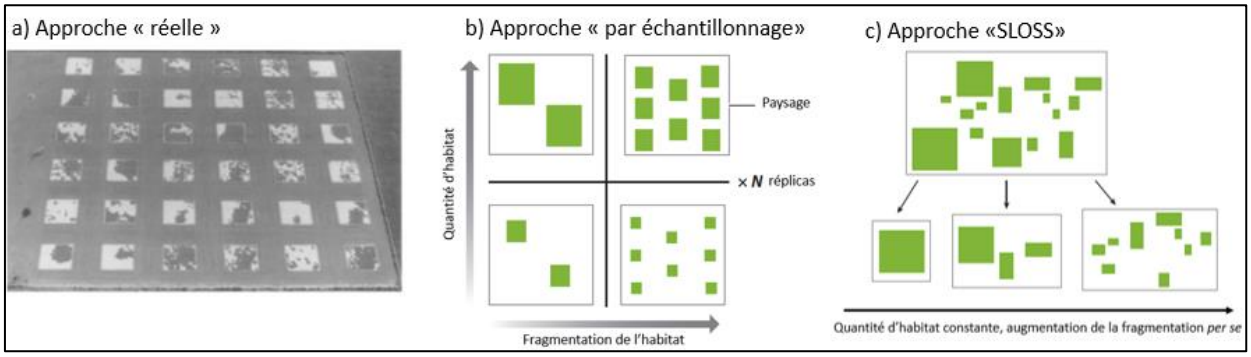


Figure 5- Approches expérimentales à l'échelle du paysage pour étudier l'effet de la fragmentation avec a) une approche expérimentale « réelle », b) une approche « par échantillonnage » et c) une approche théorique avec la méthode SLOSS (single large or several small) (Source : Fahrig, 2017)

b) Fragmentation des forêts anciennes

Actuellement en France, la répartition des forêts anciennes est très inégale (Figure 6). Bien que le sud soit très boisé, la superficie de forêts anciennes est très faible. A l'inverse, le nord-est est aussi fortement boisé mais la superficie de forêts anciennes est très importante. Enfin, certains endroits en France ont un faible couvert forestier associé à une faible superficie de forêts anciennes (Berges & Dupouey, 2021).

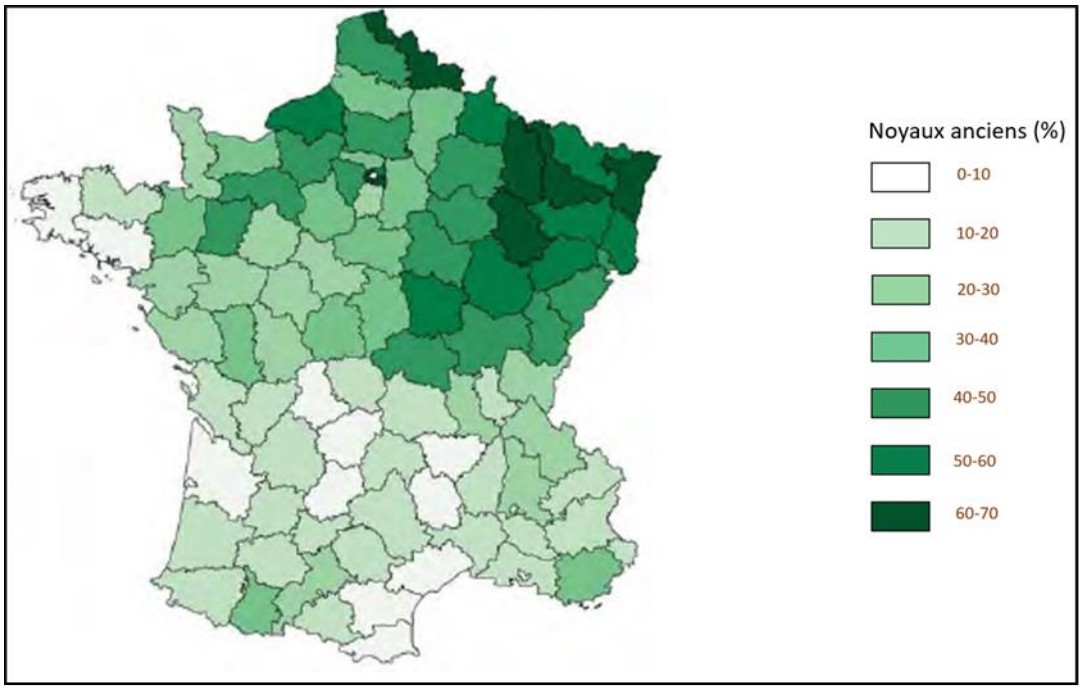


Figure 6- Distribution par départements de la proportion de forêts anciennes en pourcentage des forêts actuelles (Source : Vallauri et al. (2012)

En Europe, depuis le milieu du XXème siècle, la couverture forestière augmente (Gerard *et al.*, 2010) et continue de nos jours en Europe avec notamment une hausse estimée de 1,4% de la surface forestière entre 1992 et 2015 (M. Palmero-Iniesta, résultats non publiés). En France, entre 1990 et 2000, 2,9 millions d'hectares de forêts sont apparus (Sitzia *et al.*, 2010). Bien que l'augmentation de la surface forestière permette le rétablissement d'espèces forestières notamment celles qui sont menacées (Plieninger *et al.*, 2013; EEA, 2016), elle augmente aussi la raréfaction et l'extinction locale des espèces ayant besoin d'habitats ouverts comme les papillons, les oiseaux et les plantes (Plieninger *et al.*, 2013; Melero *et al.*, 2016; Regos *et al.*, 2016). La reforestation tend à augmenter le phénomène de défragmentation et l'apparition de nouvelles parcelles. Cependant, l'augmentation de la surface forestière ne peut pas expliquer à elle toute seule les modifications complexes dans les paysages forestiers (Palmero-Iniesta *et al.*, 2020).

La fragmentation des forêts anciennes permet d'étudier une possible dette d'extinction (Vellend *et al.*, 2006; Haddad *et al.*, 2015). A l'inverse, la reconquête forestière sur des parcelles agricoles abandonnées permet d'observer un hypothétique crédit de colonisation. Ces deux concepts sont essentiels en écologie car ils permettent de préciser l'état d'un habitat (bon ou dégradé) (Janssen, 2016) (Figure 7). La notion de dette d'extinction a été théorisée par Tilman *et al.* (1994) pour décrire l'extinction déterministe d'une espèce après la fragmentation et la perte de l'habitat (Jackson & Sax, 2010). Par la suite, plusieurs études ont développé cette idée et l'ont définie comme le temps nécessaire après la destruction/fragmentation de l'habitat pour voir la disparition d'une espèce (Loehle & Li, 1996; Hanski & Ovaskainen, 2002; Vellend *et al.*, 2006). La dette d'extinction peut donc fausser le bon état de l'habitat notamment dans les forêts anciennes où les espèces spécifiques ont une longue durée de vie (Janssen, 2016). Le crédit de colonisation est une théorie proposée par Jackson and Sax (2010). Elle fait référence aux nouvelles espèces pouvant coloniser un nouvel habitat après un événement particulier. Elle dépend en partie des capacités de dispersion et de recrutement de l'espèce (Jackson & Sax, 2010). Contrairement à la dette d'extinction, le crédit de colonisation peut fausser le mauvais état de l'habitat notamment en forêt récente (Janssen, 2016). En effet, Naaf and Kolk (2015) ont montré que le crédit de colonisation pour certaines plantes était de 130 à 230 ans dans les forêts isolées issues de la déprise agricole. L'étude montre aussi une dette d'extinction qui a duré 160 ans pour les plantes en forêts fragmentées. Cependant la proximité avec une forêt ancienne peut favoriser la colonisation d'une forêt récente et ainsi diminuer le temps pour payer le crédit de colonisation notamment chez les champignons ectomycorhiziens (Boeraeve *et al.*, 2018).

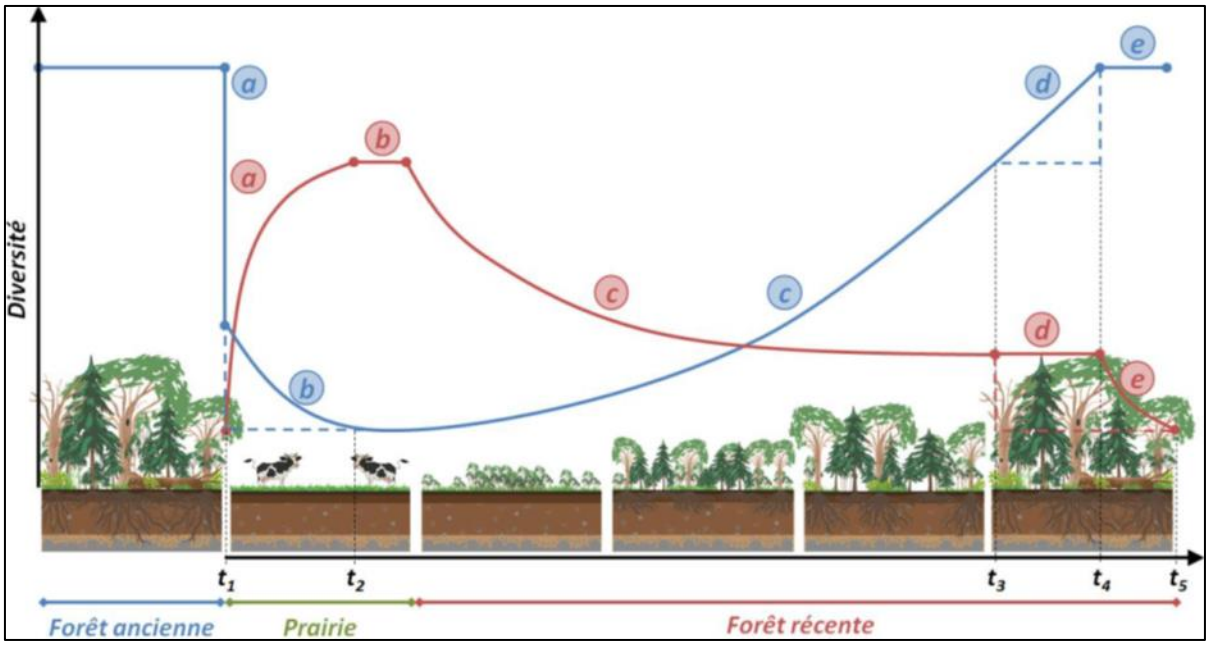


Figure 7- Application des notions de dette d'extinction et crédit de colonisation en forêt ancienne et récente (Source : Janssen (2016)). Pour les espèces forestières (bleu), (a), la modification d'usage du sol diminue fortement la diversité ; (b) certaines espèces persistent dans les prairies = dette d'extinction (t1-t2) ; (c) recolonisation progressive avec la reforestation ; (d) toutes les espèces n'ont pas recolonisé la forêt malgré un stade proche de l'état pré-perturbation = crédit de colonisation ; (e) diversité à l'équilibre (t4). Pour les espèces prairiales (rouge), (a) la modification d'usage du sol augmente fortement la diversité (t1-t2) ; (b) diversité à l'équilibre ; (c) extinction progressive avec la reforestation ; (d) toutes les espèces n'ont pas disparu de la forêt malgré un stade proche de l'état pré-perturbation = dette d'extinction ; (e) extinction des dernières espèces prairiales

b) Gestion forestière des forêts anciennes

Les différentes études citées auparavant montrent que les forêts anciennes abritent une diversité spécifique et fragile, ce qui leur octroie une grande valeur de conservation (Berges & Dupouey, 2021). Malgré les initiatives de l'IUCN (IUCN, 2016), les forêts anciennes n'ont pas un statut de protection internationale et des plans de gestion forestière adaptés (Berges & Dupouey, 2021). Peu d'études ont été faites sur les conséquences de la gestion forestière dans les forêts anciennes (Berges & Dupouey, 2021). Dans la forêt de Białowieża qui est considérée comme une des dernières forêts primaires en Europe ou tout du moins un extrême parmi les vieilles forêts d'Europe, la gestion forestière a fortement réduit la biodiversité (Wesolowski, 2005 ; Mikusinski *et al.*, 2018). En effet, la gestion forestière modifie la structure et la composition du peuplement ce qui aura des conséquences sur la régénération et le développement futur d'un peuplement forestier (Stiers *et al.*, 2018 ; Willim *et al.*, 2019).

En 1993 lors de la conférence d'Helsinki, il est devenu obligatoire que la gestion forestière soit durable et que la diversité spécifique soit maintenue dans les forêts gérées (FAO, 1999; FAO, 2015). Cependant, il est difficile pour les gestionnaires forestiers d'évaluer la biodiversité à cause (i) d'un nombre important d'espèces, (ii) de la mise en protocoles adaptés pour échantillonner correctement

les espèces et (iii) l'identification difficile de certaines espèces (Larrieu *et al.*, 2018). Pour mener à bien ces objectifs, les gestionnaires peuvent utiliser des indicateurs adaptés au contexte et écologiquement pertinent. Ces indicateurs se basent principalement sur deux approches (Larsson, 2001). La première approche est taxonomique. Elle se base sur la présence et la dynamique de populations de taxons indicateurs qui peuvent représenter celles d'autres espèces (Landres *et al.*, 1988). L'approche taxonomique est sujet à débat. Même s'il a été démontré qu'une espèce parapluie (Ranius, 2002) ou ingénieure (Buse *et al.*, 2008) peut servir d'indicateur dans des conditions particulières, il est difficile d'utiliser ces résultats pour estimer la richesse spécifique totale (Similä *et al.*, 2006; Sebek *et al.*, 2012). La combinaison de plusieurs taxons serait une approche plus efficace (Brin *et al.*, 2009 ; Larrieu *et al.*, 2018) car la complémentarité entre les taxons favoriserait l'acquisition de renseignements (Kati *et al.*, 2004 ; Westgate *et al.*, 2017). Néanmoins, il peut être compliqué pour les gestionnaires forestiers d'utiliser une approche taxonomique. Les relevés taxonomiques nécessitent des spécialistes et du temps (Larrieu & Gonin, 2008). L'alternative est d'utiliser des indicateurs indirects comme des caractéristiques structurales des peuplements forestiers (Lindenmayer *et al.*, 2000). De nombreux indices existent pour évaluer la biodiversité à l'échelle du peuplement comme l'Indice de Biodiversité Potentielle (IBP) en France (Encadré 2) (Van Den Meersschaut & Vandekerkhove, 2000 ; Jansen *et al.*, 2004 ; Larrieu & Gonin, 2008 ; Geburek *et al.*, 2010). Néanmoins, l'utilisation de variables liées à la structure des peuplements forestiers a été remise en question (Noss, 1990 ; Angelstam & Dönz-Breuss, 2004). Dans certains cas, les relations entre la structure et la diversité spécifique sont faibles (Keren *et al.*, 2020) alors que dans d'autres cas, la relation est positive (Gao *et al.*, 2014 ; Zeller *et al.*, 2023).

Encadré 2 : Indice de Biodiversité Potentielle (IBP)

Larrieu & Gonin (2008) ont développé un indice de biodiversité potentielle (IBP) qui est composé de 10 facteurs qui influencent les taxons forestiers. Ces facteurs regroupent les structures importantes d'un peuplement (sept facteurs) et le contexte environnant (trois facteurs) (Figure 8). Une note comprise entre 0 et 5 est attribuée à chaque facteur. Chaque note est ensuite additionnée pour obtenir une note globale de l'IBP. Les facteurs sont rapides à décrire et ne nécessitent pas d'expertise taxonomique (Larrieu & Gonin, 2008). La biodiversité potentielle se définit ici comme « la capacité d'accueil du peuplement, en lien avec ses caractéristiques actuelles, sans préjuger de la biodiversité réelle qui ne pourrait être évaluée qu'avec des inventaires complexes, non réalisables en routine » (Larrieu & Gonin, 2008). L'IBP a été développé pour aider les gestionnaires forestiers à prendre en compte la biodiversité dans leurs travaux habituels (Larrieu *et al.*, 2019). La composition et la richesse spécifique de plusieurs espèces forestières peuvent s'expliquer par les facteurs de l'IBP (Larrieu *et al.*, 2019 ; Zeller *et al.*, 2022).

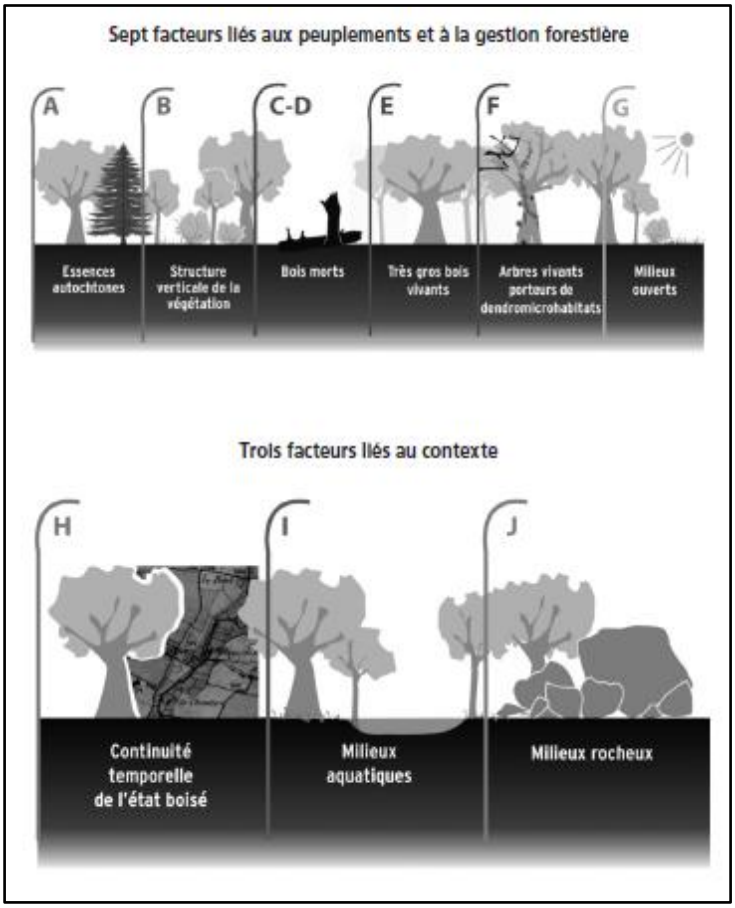


Figure 8 - Les 10 facteurs de l'IBP avec A) la richesse en essences forestières autochtones, B) la structure verticale de la végétation, C) bois morts sur pieds de « grosse » circonférence, D) bois morts au sol de « grosse » circonférence, E) très gros bois vivants, F) arbres vivants porteurs de micro habitats, G) milieux ouverts, H) ancienneté de l'état boisé, I) habitats aquatiques et J) milieux rocheux (source : Larrieu and Gonin (2008); (Gonin et al., 2017))

I.2. Les champignons des sols forestiers

I.2.1. Qu'est-ce qu'un champignon ?

Les champignons ont longtemps été considérés comme appartenant au règne des plantes même si des scientifiques à diverses époques ont remis en cause cette idée (Le Tacon & Maurice, 2019). Il aura fallu attendre 1969 pour que Robert Harding Whittaker établisse cinq règnes distincts qui sont *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* et *Monera* (Whittaker, 1969). Les champignons ont des caractéristiques propres qui les distinguent biologiquement et phylogénétiquement des autres phylums. Ils sont hétérotrophes en carbone et ont besoin de matière organique vivante ou morte pour assurer leur nutrition. La digestion de la matière organique se fait avec l'aide d'enzymes extra-cellulaires produites par le mycélium (Le Tacon & Maurice, 2019).

Les premiers champignons seraient apparus il y a environ 1 milliard d'années (Figure 9). C'était des organismes flagellés, simples et unicellulaires qui vivaient dans l'eau et avaient une reproduction asexuée (Willis, 2018). Ces champignons seraient similaires aux champignons se trouvant aux premières branches de l'arbre phylogénique tels que les *Cryptomycota*, *Chytridiomycota* et *Blastocladiomycota* (Willis, 2018). L'apparition des champignons terrestres a eu lieu il y a 700 millions d'années (Chang *et al.*, 2015). Les deux premiers groupes de champignons dépourvus de spores mobiles à apparaître furent les *Zoopagomycota* et les *Mucoromycota*. La caractéristique de ces organismes est la présence d'une spore unique à paroi épaisse nommée zygospore (Spatafora *et al.*, 2016). Enfin, les *Ascomycota* et les *Basidiomycota* sont des lignées ayant divergées plus récemment (600-700 millions d'années), caractérisées par l'apparition des mycéliums cloisonnés, et la production de spores non flagellées. Les *Ascomycota* et les *Basidiomycota* regroupent 90 000 et 50 000 espèces connues respectivement (Willis, 2018). Les *Ascomycota* se caractérisent par la production de spores à l'intérieur de sacs (les asques). Au sein des *Ascomycota*, on retrouve les genres tels que les *Tuber*, *Morchella* et les *Helvella*. A l'inverse, pour les *Basidiomycota*, les spores sont développées dans des cellules spécialisées (les basides). Les genres *Agaricus*, *Boletus* et *Amanita* appartiennent aux *Basidiomycota* (Le Tacon & Maurice, 2019).

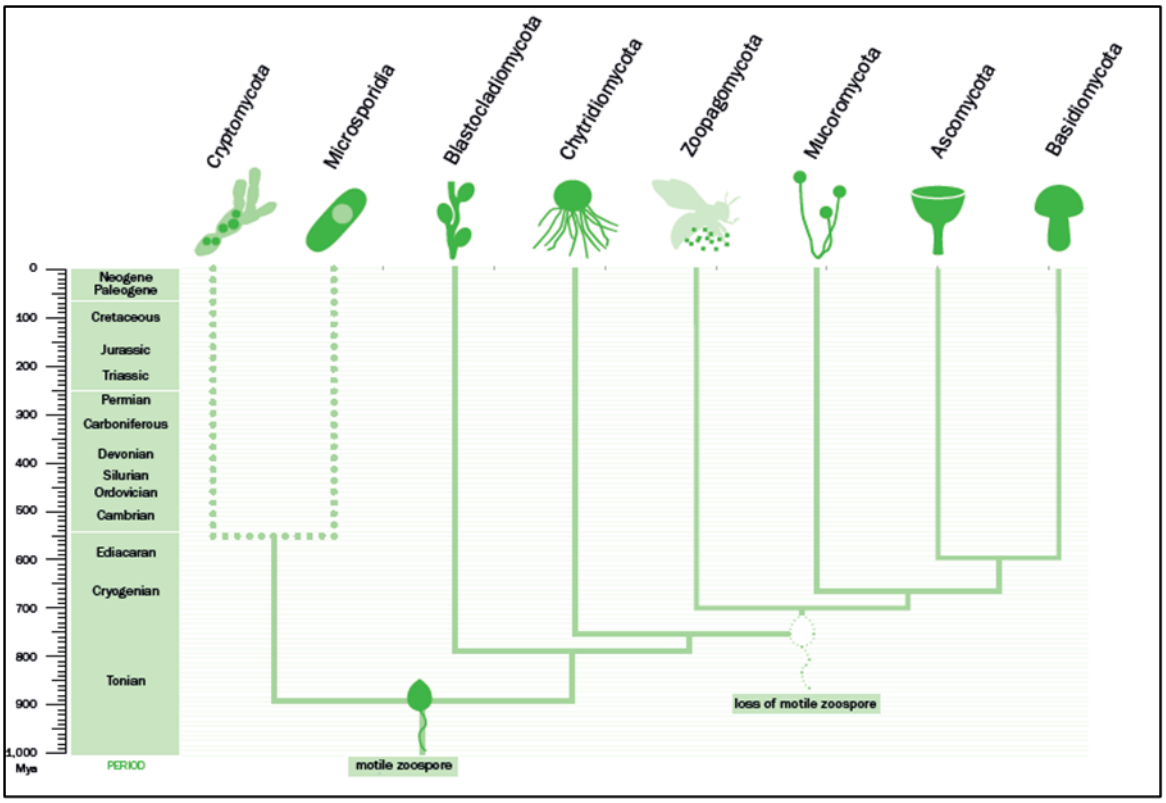


Figure 9 – Arbre phylogénique des champignons (Source : Willis (2018))

Au sein des champignons, il existe différentes stratégies d'acquisition des ressources nutritives. Un champignon est défini comme saprotrophe quand il se nourrit de matière organique morte (Le Tacon & Maurice, 2019). Quand un champignon se nourrit aux dépens d'un organisme au point de le tuer, il est considéré comme pathotrophe (Le Tacon & Maurice, 2019). Enfin, le champignon peut vivre en symbiose avec son hôte en fournissant des éléments nutritifs en échange de carbone organique. Dans ce cas-là, il est considéré comme symbiotrophe (Smith *et al.*, 2008; Le Tacon & Maurice, 2019). Certains *Ascomycota*, *Basidiomycota* et *Mucoromycota* sont capables d'effectuer des symbioses mycorhiziennes avec les racines de plantes (Garbaye, 2013). Il existe différents types de symbioses mycorhiziennes qui diffèrent dans leurs morphologies, structures, plantes hôtes et leurs occurrences (Garbaye, 2013 ; Martin *et al.*, 2016). Néanmoins, il est possible de différencier quatre types de symbioses majoritaires grâce à la morphologie des tissus racinaires (Martin *et al.*, 2016) et de la plante hôte (Brundrett & Tedersoo, 2018) qui sont la mycorhize arbusculaire, l'ectomycorhize, la mycorhize éricoïde et la mycorhize d'orchidée. Ces symbioses mycorhiziennes sont présentes dans des biomes très variés et 95% des plantes formeraient de telles symbioses (Tedersoo *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2015 ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Brundrett, 2017).

I.2.2. Rôle des champignons en forêts

Les champignons représentent une part non négligeable de la diversité terrestre. Le nombre d'espèces diffèrent amplement selon les études. Hawksworth and Lucking (2017) estiment qu'il y aurait entre 1,5 et 5 millions d'espèces. Une autre étude évalue le nombre d'espèces à 11,7 à 13,2 millions d'espèces (Hyde, 2022). Enfin, Larsen *et al.* (2017) émettent l'hypothèse que la richesse mondiale en espèces soit supérieure à 150 millions d'espèces. Ces différentes estimations démontrent ainsi qu'une grande partie de la diversité fongique mondiale reste inconnue (Taylor *et al.*, 2014). En France métropolitaine, l'Inventaire mycologique national a estimé environ 30 000 espèces différentes (Eyssartier & Roux, 2017). Dans l'ancienne région des Midi-Pyrénées, 5 200 taxons ont été inventoriés (Corriol *et al.*, 2014).

Cette importante diversité se traduit par des groupes trophiques fonctionnellement différents (Kujawska *et al.*, 2021). Les champignons mycorhiziens et plus précisément les champignons ectomycorhiziens (ECM) sont essentiels pour la croissance pour certaines familles d'arbres (Pinacées, Fagacées, Bétulacées et Salicacées par exemple) (Garbaye, 2013), dominantes en forêt tempérée. Il a été estimé que les symbiotes fongiques ectomycorhiziens reçoivent environ 6% de la productivité primaire nette mais cela peut augmenter dans les milieux limités en azote et dominés par les conifères (Hobbie, 2006 ; Schiestl-Aalto *et al.*, 2019 ; Ouimette *et al.*, 2020). En échange, les champignons fournissent des nutriments et de l'eau aux arbres hôtes améliorant leur croissance et leur survie notamment face à la sécheresse (Smith *et al.*, 2008 ; Courty *et al.*, 2010 ; Dickie *et al.*, 2015). A cause de cette hypothétique facilitation, le rôle des ECMs a pu être surestimé (Karst *et al.*, 2023) depuis la description des réseaux mycorhiziens communs (*Common mycorrhizal network* - CMN). Un réseau mycorhizien commun se forme quand des hyphes fongiques mycorhiziens d'un même individu relient les racines de plusieurs plantes (Simard *et al.*, 1997). Bien que des études décrivent le transfert de carbone organique entre les arbres (Simard *et al.*, 1997; Teste *et al.*, 2009; Simard *et al.*, 2015), il se pourrait que d'autres mécanismes expliqueraient ces transferts (Karst *et al.*, 2023). En effet, les débats récents ont montré un manque d'observations sur le fonctionnement des CMN et sur leurs rôles dans les forêts (Karst *et al.*, 2023). Les forêts anciennes hébergeraient des communautés riches en ECM (Mennicken *et al.*, 2020), il est donc pertinent de connaître si les CMNs contribueraient ou non à la survie et à la croissance des semis notamment face aux changements climatiques. Les forêts anciennes du sud-ouest en France sont souvent peuplées de hêtres (*Fagus sylvatica* L.), une espèce arborescente ectomycorhizienne. Les espèces arborescentes de forêt tempérée comme le hêtre seraient menacées par les changements climatiques (Principe *et al.*, 2017). Pflug *et al.* (2018) ont montré que dans certains milieux, le hêtre montre un rétablissement rapide des relations hydriques internes et de l'activité physiologique foliaire.

En affaiblissant ou en tuant les arbres, les champignons pathogènes peuvent modifier les communautés végétales du sous-étage à cause de la modification du couvert forestier (Kujawska *et al.*, 2021). Ces champignons peuvent aussi modifier le cycle des nutriments et l'habitat de la faune en augmentant la quantité de bois mort (Holah *et al.*, 1993 ; Hennon, 1995). Les champignons pathogènes influencent la diversité spécifique floristique en désavantageant certaines espèces (Muller-Landau, 2014). En modifiant la croissance et la survie de l'arbre, les champignons pathogènes influencent le stockage de carbone dans sa biomasse (Hicke *et al.*, 2012).

Les champignons saprophytes sont considérés comme les premiers décomposeurs forestiers (Kujawska *et al.*, 2021). Leur participation dans la décomposition du bois et de la litière permet le recyclage des minéraux, des nutriments et la séquestration du carbone (Moore *et al.*, 2004 ; Setala & McLean, 2004) participant ainsi à la fertilité du sol (Sterkenburg *et al.*, 2015).

I.2.3. Influence des paysages sur les communautés fongiques

Malgré les rôles essentiels joués par les champignons dans le maintien et le fonctionnement des écosystèmes (Read & Perez-Moreno, 2003 ; van der Heijden *et al.*, 2015), peu d'études se sont intéressées aux conséquences des structures paysagères sur leur diversité (Grilli *et al.*, 2017 ; Mony *et al.*, 2020). Vannette *et al.* (2016) ont montré que la diversité locale en champignons était corrélée positivement avec la superficie forestière alors que la composition en espèces était liée à la connectivité entre les fragments. La composition en espèces fongiques était davantage identique entre les fragments fortement connectés comparé aux autres sous-connectés. Un résultat similaire a été trouvé chez Peay *et al.* (2010) où la richesse en espèces ectomycorhiziennes diminuait significativement quand les îlots forestiers devenaient de plus en plus isolés. Dans les Cévennes, Mennicken *et al.* (2020) ont montré que la diversité spécifique fongique était positivement corrélée à la quantité de forêts anciennes dans le paysage. La richesse des communautés fongiques était mieux expliquée par la composition forestière passée du paysage que la composition forestière présente, ce qui sous-entend une possible dette d'extinction. Su *et al.* (2022) ont montré que le contexte paysager était plus important dans le maintien de la diversité fongique que les caractéristiques édaphiques et climatiques. A l'opposé, dans une autre étude, les communautés de champignons arbusculaires associées à une plante rudérale n'étaient pas influencées par la fragmentation (Grilli *et al.*, 2015). La diversité fongique réagit généralement négativement à la fragmentation de l'habitat mais l'ampleur de la réponse dépend du régime alimentaire (Grilli *et al.*, 2017). Les champignons mycorhiziens et xylophages seraient plus négativement influencés par la fragmentation de l'habitat que les champignons pathogènes (Grilli *et al.*, 2017 ; Boeraeve *et al.*, 2019).

I.2.4. Influence de la structure du peuplement forestier sur les communautés fongiques

A l'échelle du peuplement forestier, les conséquences de la gestion forestière sur les communautés fongiques se sont intensifiées depuis deux décennies. Malheureusement, les nombreuses difficultés, à commencer par la détection et l'identification inhérente à l'étude des champignons en forêts a produit des connaissances éparses (Tomao *et al.*, 2020). Tout d'abord, il a été démontré que la composition d'une communauté fongique et sa dynamique sont liées à l'âge des arbres hôtes (Bonet *et al.*, 2004 ; Agreda *et al.*, 2014). Twieg *et al.* (2007) ont montré que la diversité fongique était plus faible dans les jeunes peuplements de Douglas (5 ans) comparé aux peuplements les plus âgés (26, 65 et 100 ans). Les champignons spécifiques à l'hôte étaient plus importants dans ces jeunes peuplements. Les communautés d'ectomycorhizes étaient similaires uniquement dans les peuplements âgés de 65 et 100 ans. La modification des communautés fongiques le long d'un gradient d'âge peut s'expliquer par les différences de conditions du site, des modes de croissances des arbres, de concentration d'hydrates de carbone libre auprès des racines et du microclimat (Tomao *et al.*, 2020).

De manière générale, le pourcentage de couvert forestier influence favorablement la diversité mycorhizienne (Villeneuve *et al.*, 1989 ; Lagana *et al.*, 1999 ; Baral *et al.*, 2015). Santos-Silva *et al.* (2011) ont observé que selon le pourcentage de couvert forestier, la richesse de champignons mycorhiziens variait. Les peuplements avec un couvert forestier de 50% avaient une plus grande richesse spécifique que les peuplements avec un couvert forestier de 30%. Twieg *et al.* (2007) et Dighton & Mason (1985) ont trouvé des résultats similaires. La diversité de champignons vivant dans le bois est aussi dépendante du couvert forestier (Bassler *et al.*, 2010). Le pourcentage d'ouverture du couvert influence le microclimat notamment sur la disponibilité en eau, la température et sa variation ce qui peut modifier la décomposition du bois par les champignons (Rayner *et al.*, 1988). Même si l'influence du microclimat est négligeable sur la diversité des champignons vivant dans le bois comparé à d'autres variables (Krah *et al.*, 2018), le microclimat influence les communautés de champignons vivant sur des débris ligneux notamment les débris fins (Bassler *et al.*, 2010).

En milieu forestier, les champignons sont fortement dépendants de la composition, aux changements et la dynamique de la végétation (Packham *et al.*, 2002 ; Lauber *et al.*, 2008 ; Landi *et al.*, 2015 ; Guo *et al.*, 2023). En effet, les caractéristiques de la litière et les débris de l'arbre influencent les communautés de champignons saprotrophes (Vasutova *et al.*, 2017). La richesse en espèces ectomycorhiziennes est positivement influencée par la diversité en espèces d'arbres hôtes (Rumberger *et al.*, 2004 ; Cavard *et al.*, 2011).

Le bois mort est un facteur important pour certaines communautés fongiques. Selon son agencement (debout ou couché), la diversité fongique associée diffère à cause des conditions microclimatiques et la disponibilité en habitat (Pouska *et al.*, 2010 ; Shorohova & Kapitsa, 2014). En étant couché, la diversité fongique est positivement influencée par la taille des débris ligneux (Heilmann-Clausen & Christensen, 2004 ; Blaser *et al.*, 2013 ; Seibold *et al.*, 2015). Un bois mort avec un fort diamètre a une vitesse de décomposition faible (Tomao *et al.*, 2020) ce qui permet une coexistence et une succession écologique d'un plus grand nombre d'espèces (Grove & Forster, 2011 ; Parisi *et al.*, 2018). Néanmoins, la diversité fongique est aussi favorisée par l'abondance de débris ligneux fins (Lindner *et al.*, 2006). Le stade de décomposition du bois mort est important pour les communautés fongiques. Lepinay *et al.* (2021) ont trouvé que les champignons étaient moins actifs, abondants et diversifiés dans les jeunes stades de décomposition du bois. La richesse spécifique augmente selon l'avancement de la décomposition (Fischer *et al.*, 2012 ; Kubartova *et al.*, 2012 ; Penttila *et al.*, 2013) car il y aurait une diversité importante en micro habitats (Parisi *et al.*, 2018).

I.3.Ecologie des communautés

I.3.1. Structuration des communautés

Depuis de nombreuses années, les scientifiques cherchent à décrire les communautés écologiques et à les expliquer (Figure 10). Différents moyens ont été mis en œuvre pour étudier la structure des communautés à différentes échelles. A l'échelle intra-communauté, une des métriques couramment utilisées est la diversité alpha. Elle permet de calculer le nombre d'espèces présentes dans une communauté sans prendre en compte l'abondance des espèces. A plus large échelle, l'utilisation de la diversité beta permet d'observer des différences de diversité inter-communauté. Enfin à l'échelle d'une grande région géographique, la diversité gamma permet d'estimer le nombre d'espèces de tous les habitats.

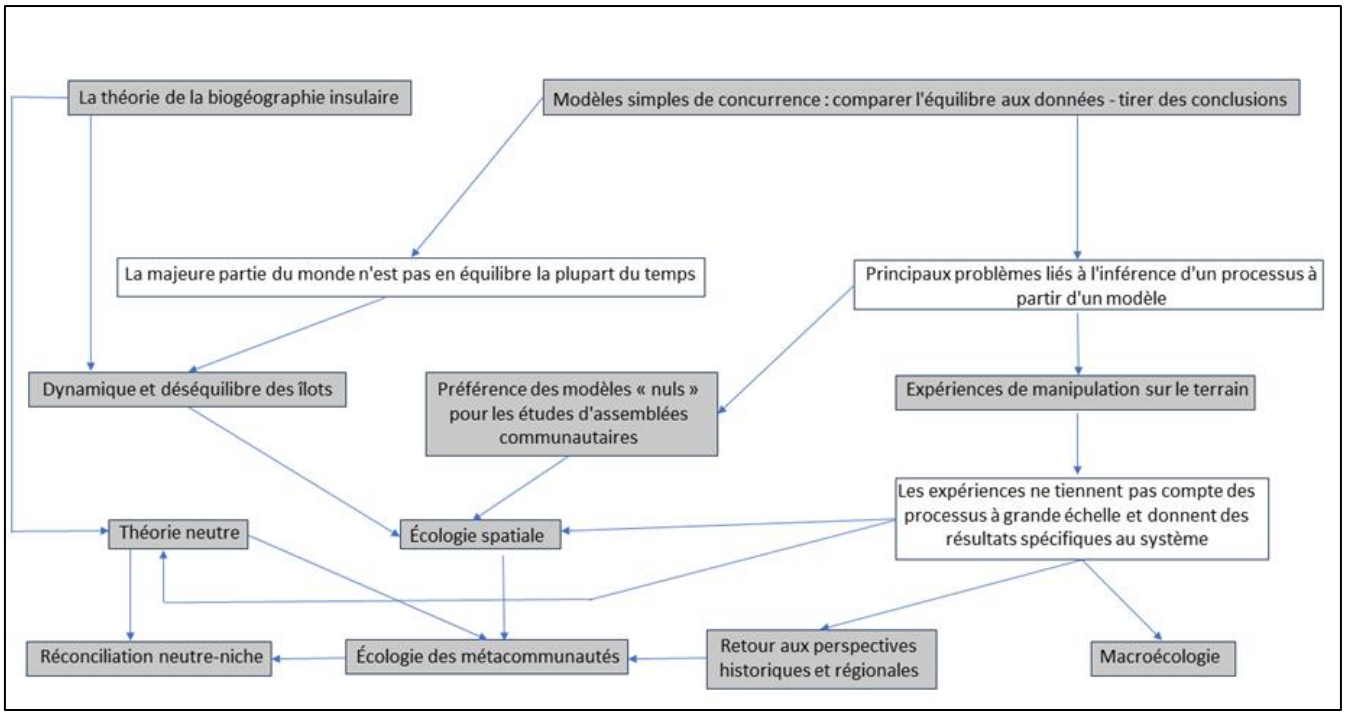


Figure 10- Principaux programmes de recherches, méthodes, cadres conceptuels et théories développés depuis le milieu du XXème siècle en écologie des communautés (cases grises) liés par leurs faiblesses (cases blanches) (Source : Vellend, 2016)

I.3.2. Synthèse de ces théories

En se basant sur les travaux de génétique des populations, Vellend (2016) a synthétisé ces nombreuses théories pour expliquer les différents patrons de compositions et d'abondance (Figure 11). La théorie se base sur quatre principes clés :

- Spéciation

La spéciation est un processus évolutif permettant l'apparition de nouvelles espèces à partir d'ancêtres communs au sein d'une communauté. La spéciation est la combinaison de la dérive génétique et de la sélection naturelle qui sont considérées comme des éléments essentiels à

l'évolution. La spéciation est un processus permettant d'augmenter la richesse spécifique au sein d'une communauté locale.

- Dispersion

La dispersion est le déplacement d'un organisme d'un habitat d'origine à un autre. Néanmoins, la dispersion n'est pas similaire à la migration animale qui traduit un déplacement cyclique entre les habitats. La dispersion peut ajouter de nouvelles espèces à la communauté locale augmentant ainsi sa diversité (diversité alpha) (MacArthur *et al.*, 1967). Cependant, la dispersion tend à homogénéiser la composition spécifique entre les communautés dans l'espace diminuant ainsi la diversité beta (Wright, 1940). L'arrivée d'une nouvelle espèce peut avoir des répercussions secondaires dans la communauté. Si la nouvelle espèce modifie les conditions biotiques et abiotiques, la composition et la diversité spécifique de la communauté risquent de changer (Vellend, 2016).

- Dérive écologique

La dérive écologique regroupe les processus démographiques stochastiques (mortalité, natalité et fécondité d'un organisme) qui peuvent expliquer les modifications d'abondance des espèces au sein d'une communauté. Si tous les paramètres démographiques sont identiques pour tous les organismes de la communauté, la dérive écologique sera le seul processus qui influencera la dynamique de la communauté (Vellend, 2010).

- Sélection

En écologie des communautés, la sélection est le processus par lequel certaines espèces sont favorisées et deviennent plus fréquentes dans la communauté par rapport d'autres espèces. Selon les caractéristiques environnementales du milieu et ses variations au cours du temps, la sélection peut modifier les espèces au sein de la communauté. Au sein d'une communauté, la sélection résulte des différences de valeur sélective entre les individus de différentes espèces (Vellend, 2010). La valeur sélective est une notion importante en écologie évolutive. Elle se définit comme la capacité d'un individu d'une espèce à se reproduire (Vellend, 2016). La sélection peut interagir avec la dérive écologique. Dans le cas où la sélection et la taille de la communauté sont importantes, la sélection domine la dérive écologique. A l'inverse, si la sélection et la taille de la communauté sont faibles, la dérive l'emporte sur la sélection (Vellend, 2010).

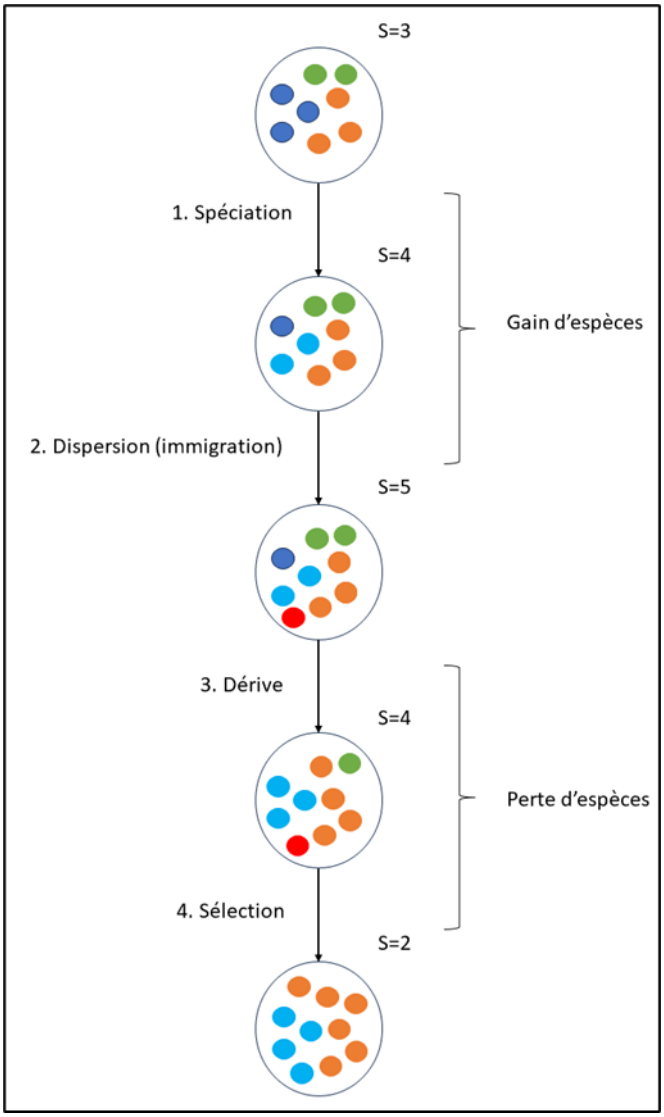


Figure 11- Les quatre processus qui peuvent modifier la richesse spécifique (S) dans une communauté. Un organisme est représenté par un petit cercle. Sa couleur correspond à une espèce (Source : Vellend 2016)

Ces quatre processus peuvent expliquer la structure des communautés à différentes échelles (Figure 12). Bien que ce modèle ait été développé pour la macrofaune et la flore, il peut aussi s'appliquer aux communautés des micro-organismes (Nemergut *et al.*, 2013).

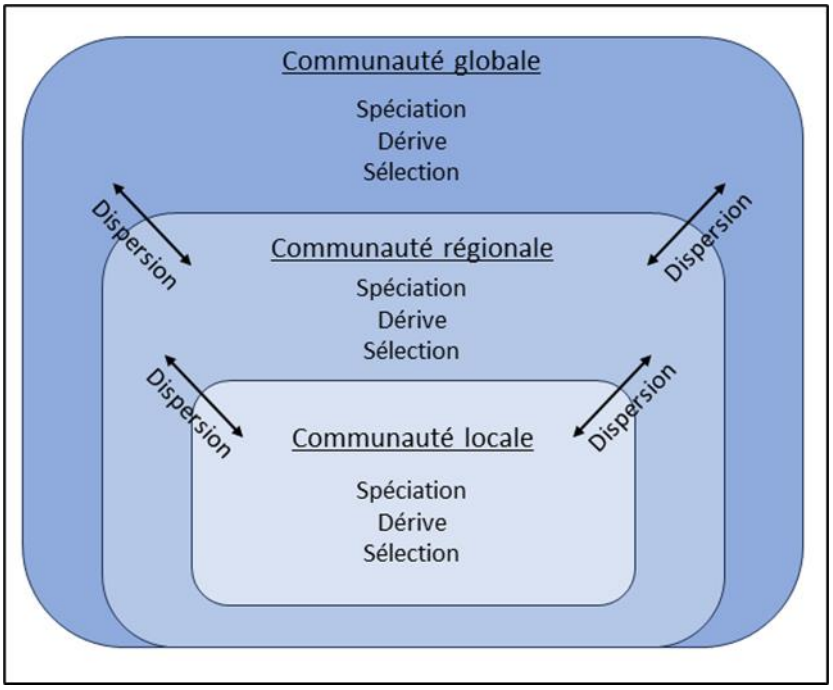


Figure 12- Représentation graphique de la théorie des communautés écologiques à différentes échelles spatiales (Source : Vellend 2016)

I.3.3. Rôle de la dispersion dans l'assemblage des communautés fongiques

La dispersion est un processus essentiel du cycle biologique des espèces. Elle influence la structuration des communautés écologiques et la dynamique des écosystèmes (Clobert *et al.*, 2012). Les champignons sont des organismes sessiles et ont souvent besoin du vent, de l'eau ou des animaux pour disséminer leurs spores (Van Der Pijl, 1969; Halbwachs & Bässler, 2015). Le mode de dispersion peut avoir des répercussions importantes sur l'assemblage des communautés et le fonctionnement des écosystèmes notamment après une perturbation (Borgmann-Winter *et al.*, 2023). Malgré les rôles essentiels des champignons dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Van Der Heijden *et al.*, 2008; Ostry & Laflamme, 2009), peu d'études se sont focalisées sur la dispersion des champignons comparé à celle des plantes (Borgmann-Winter *et al.*, 2023).

- Les champignons mycorhiziens

Pour expliquer la structuration des communautés mycorhiziennes, il est possible d'appliquer les processus proposés par Vellend (2010) et plus précisément la sélection et la dispersion (Jumpponen & Egerton-Warburton, 2005) (Figure 13). Initialement, la composition d'une communauté locale dépend de la présence de propagules allochtones (succession autogénique primaire) ou autochtones (succession autogénique secondaire) et de mycéliums actifs (succession autogénique secondaire) (Jumpponen & Egerton-Warburton, 2005).

Divers filtres biotiques et abiotiques influencent la continuité de la communauté locale. Les champignons mycorhiziens sont des organismes symbiotiques obligatoires. La présence d'un hôte compatible est le premier filtre sélectif. Au sein des champignons mycorhiziens, la spécificité d'un hôte varie fortement. Les champignons mycorhiziens arbusculaires ont un grand nombre d'espèces d'hôtes (Garbaye, 2013). Quant aux ectomycorhizes, la gamme d'hôtes peut varier d'une seule espèce ou (sous) genre à une association avec des angiospermes et des gymnospermes (Smith *et al.*, 2008; Molina & Horton, 2015). Les conditions environnementales influencent aussi la persistance de la communauté locale et constituent donc le deuxième filtre sélectif. En effet, les champignons mycorhiziens possèdent différentes niches écologiques ce qui aboutit à des réponses diverses aux modifications des conditions environnementales. La composition des communautés mycorhiziennes peut donc varier le long de gradients environnementaux tels le pH du sol, la disponibilité en humidité et l'état nutritionnel (Bogar & Peay, 2017). Le dernier filtre sélectif regroupe les interactions compétitrices et facilitatrices avec d'autres organismes du sol. Par exemple, la symbiose ectomycorhizienne peut être influencée par des bactéries auxiliaires mycorhiziennes (Barbieri *et al.*, 2012). Quel que soit le type de symbiose avec l'hôte, le premier organisme fongique qui colonise une racine possède majoritairement un avantage compétitif sur les autres (Kennedy *et al.*, 2009; Werner & Kiers, 2015).

L'établissement des espèces fongiques du pool régional est certes conditionné par les filtres biotiques et abiotiques mais aussi par leurs capacités de dispersion. Le fait que les spores soient dispersées par le vent a entretenu l'idée que la dispersion des champignons n'était pas limitée (Boeraeve, 2019). Néanmoins, la capacité de dispersion des champignons mycorhiziens peut varier selon les échelles spatiales. A l'échelle mondiale, la dispersion des spores semble improbable notamment suite à l'échec d'une plantation de *Pinus pantula* en Zambie sans leurs espèces mycorhiziennes d'origine (Pringle *et al.*, 2009). A une échelle locale, les diminutions en dépôt de spores ectomycorhiziennes et la colonisation des racines des plantules étaient négativement corrélées aux distances entre les parcelles forestières (0.5m à 5.4km) (Peay *et al.*, 2012). La dispersion des spores fongiques est aussi possible grâce aux animaux comme les mammifères (Johnson, 1996) et les invertébrés (Klironomos & Moutoglis, 1999; Lilleskov & Bruns, 2005; Vasutova *et al.*, 2019). Selon la taille de l'organisme et de sa zone de recherche alimentaire, les distances parcourues varient fortement (Boeraeve, 2019).

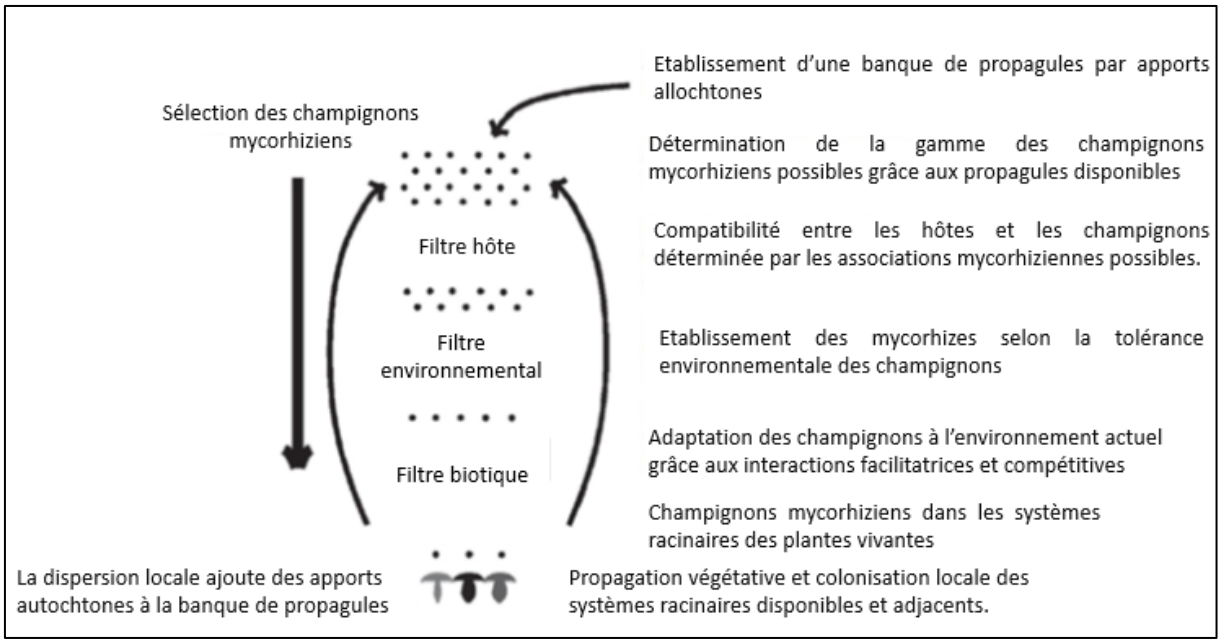


Figure 13- Modèle d'assemblage des communautés de champignons mycorhiziens à travers trois filtres sélectifs : le filtre hôte, le filtre environnemental et le filtre biotique (Source : Jumpponen & Egerton-Warburton, 2005)

- Les champignons saprophytes

Les champignons saprophytes se développent dans des ressources organiques et s'y nourrissent (Boddy & Hiscox, 2016). Ils doivent donc se propager continuellement vers de nouvelles ressources qui se répartissent de façon hétérogène dans l'espace et le temps dans les écosystèmes terrestres (Boddy, 1999). Ces ressources sont de diverses tailles (écailles de bourgeons à de grands troncs d'arbres) (Boddy & Hiscox, 2016).

La dispersion se fait essentiellement par des spores sexuées ou asexuées (Boddy & Hiscox, 2016). La propagation des spores est relativement rapide et peut s'étendre sur plusieurs kilomètres (Vilgalys & Sun, 1994; Hallenberg, 1995; Nordén & Larsson, 2000; Hallenberg & Küffer, 2001; Stenlid, 2008). Néanmoins, le peu de réserves alimentaires et la faible probabilité d'atterrir sur une ressource organique adéquate via anémochorie diminuent le temps de survie des spores. Dans le cas où la dispersion se fait par des animaux, le temps de survie augmente (Boddy & Jones, 2007; Boddy & Heilmann-Clausen, 2008). A l'inverse, la dispersion par mycélium permet au champignon d'avoir accès à une plus grande réserve en nutriments (Fricker *et al.*, 2008).

La colonisation d'une nouvelle ressource organique quel que soit la forme de dispersion (spore ou mycélium) est déterminée par la capacité enzymatique du champignon à utiliser les composés disponibles dans la ressource organique (Boddy & Hiscox, 2016). La colonisation perdure jusqu'à ce qu'il (i) soit chassé par une autre espèce, (ii) soit freiné voir tué par des conditions abiotiques défavorables, (iii) soit obligé à fructifier ou à croître hors de la ressource et (iv)

appauvrisse la réserve en nourriture (Boddy & Hiscox, 2016). Même si les premières espèces fongiques colonisatrices ont la capacité enzymatique de décomposer entièrement la ressource organique, la plupart du temps, d'autres espèces les remplacent dès que les conditions abiotiques et biotiques changent fortement (Boddy & Hiscox, 2016). L'ordre dans lequel les espèces colonisent la ressource organique modifie la composition et le développement de la future communauté fongique (Boddy & Hiscox, 2016). Par exemple, *Antrodiella hoehnelii* fructifie dans le bois essentiellement après *Inonotus nodulosus* et *Inonotus radiatus*. Quant à *Hericium coralloides*, sa fructification se fait après *Inonotus obliquus*, *Inonotus cuticularis* ou *Fomes fomentarius* (Niemela *et al.*, 1995; Holmer & Stenlid, 1997). Les espèces qui déterminent la colonisation future d'autres espèces exercent donc des effets prioritaires qui peuvent être stimulants ou inhibiteurs (Fukami *et al.*, 2010; Ottosson *et al.*, 2014; Boddy & Hiscox, 2016). En effet, la décomposition de la ressource entraîne des modifications comme le pH, la disponibilité des nutriments et la teneur en eau du bois (Boddy & Hiscox, 2016). Ces modifications peuvent agir comme moyen de défense (Boddy *et al.*, 2017) ou aider à sélectionner certaines espèces (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005; van der Wal *et al.*, 2013; Fukami, 2015; Hiscox *et al.*, 2015).

- Les champignons pathogènes

Afin de se reproduire et de survivre, les champignons pathogènes produisent un grand nombre de spores qui se dispersent essentiellement par le vent afin de coloniser des hôtes sensibles (Brown & Hovmøller, 2002). La dispersion éolienne peut s'étendre sur des centaines ou des milliers de kilomètres (Brown & Hovmøller, 2002). La dispersion à longue distance est une stratégie de survie importante pour ces champignons car elle leur permet de coloniser rapidement des nouvelles zones géographiques ou de migrer entre différents habitats selon les saisons (Gage *et al.*, 1999).

En conclusion, dans le cas de cette thèse, la fragmentation de l'habitat forestier pourrait modifier la sélection et la dispersion des communautés fongiques. En effet, les caractéristiques paysagères comme la topographie (Amend *et al.*, 2010), la structure et la complexité du couvert forestier (Norros *et al.*, 2014) pourraient favoriser ou limiter la dispersion des spores fongiques par le vent (Borgmann-Winter *et al.*, 2023).

I.4. Le metabarcoding de l'ADNe, un outil pour aborder la diversité des communautés du sol des forêts anciennes ?

I.4.1 L'ADNe et le metabarcoding, avantages et limites

Le metabarcoding de l'ADN environnemental offre des possibilités immenses en écologie (Zinger *et al.*, 2019) et peut-être considéré comme une technique révolutionnaire (Zinger *et al.*, 2021) pour la recherche fondamentale et la surveillance des espèces (Thomsen & Willerslev, 2015 ; Creer *et al.*, 2016 ; Bohan *et al.*, 2017 ; Taberlet *et al.*, 2018). En plus de permettre d'étudier le régime alimentaire des organismes (Valentini *et al.*, 2009 ; Deagle *et al.*, 2010) et les paléocommunautés (Willerslev *et al.*, 2003), le metabarcoding permet dorénavant de suivre plus facilement les espèces à des échelles biogéographiques plus grandes (Taberlet *et al.*, 2012 ; Drummond *et al.*, 2015). Il est désormais possible d'étudier le partitionnement spatial de la diversité (alpha, beta & gamma) d'organismes qui étaient très difficiles à étudier (les champignons, les bactéries, les protistes et les virus). Ces nouvelles informations ont permis de mieux comprendre ces communautés à l'échelle mondiale (Tedersoo *et al.*, 2014 ; Lima-Mendez *et al.*, 2015). Néanmoins, avant de pouvoir émettre des conclusions écologiquement fiables, il est nécessaire de traiter minutieusement les données issues de l'ADNe (Calderon-Sanou *et al.*, 2020).

En écologie, les analyses de diversité sont généralement basées sur des matrices de communautés avec soit l'abondance soit la présence/absence de chaque espèce. Dans le cas du metabarcoding de l'ADNe, les matrices des communautés sont différentes des matrices classiques. Les espèces sont remplacées par des séquences d'ADN groupées sous la forme d'unité taxonomique moléculaire opérationnelle (MOTU) et leur abondance par un nombre de lecture du séquençage (Calderon-Sanou *et al.*, 2020). Idéalement, une MOTU devrait correspondre à une seule espèce. Cependant, le manque de précision taxonomique et les erreurs techniques faites aux différentes étapes peuvent fortement modifier les résultats finaux.

Malgré ces contraintes, le metabarcoding de l'ADNe révèle, comparativement aux méthodes traditionnelles, un meilleur taux de détection ce qui permet d'améliorer la surveillance et la gestion de l'environnement (Sutherland *et al.*, 2013; Cristescu, 2014; Kelly *et al.*, 2014). Cependant, il ne faudrait pas considérer le metabarcoding de l'ADNe comme une alternative aux inventaires naturalistes traditionnels mais comme une technique complémentaire pour optimiser les inventaires de biodiversité (Frøslev *et al.*, 2019).

1.4.2 Application de l'ADNe et du metabarcoding pour identifier les champignons

Pendant de longues années, les seules manières pour inventorier et identifier les corps fructifères fongiques étaient la taxonomie, éventuellement l'isolement et la mise en culture (Lange, 1948; Hueck, 1953; Kjøller & Struwe, 1980; Rayner & Todd, 1980; Tyler, 1985; Schmit & Lodge, 2005). Dans les années 1990, des techniques basées sur l'ADN ont facilité ces identifications (Gardes & Bruns, 1996; Helgason *et al.*, 1998). L'utilisation de l'ADNe s'est répandue dans de nombreux travaux sur les communautés fongiques (Schmidt *et al.*, 2013; Pellissier *et al.*, 2014; Barnes *et al.*, 2016) et permet dorénavant de faire des inventaires fongiques à grande échelle (Tedersoo *et al.*, 2014). Toutefois, l'utilisation du metabarcoding de l'ADNe pour les inventaires fongiques est sujet à débat notamment pour identifier les espèces menacées (Runnel *et al.*, 2015; Frøslev *et al.*, 2019).

Les inventaires des corps fructifères fongiques nécessitent d'importantes compétences taxonomiques afin d'avoir des données viables (Newton *et al.*, 2003). De plus, tous les champignons ne fructifient pas. Dans les cas où ils produisent des corps fructifères, ces fructifications peuvent être minuscules, de faible durée ou souterraines (Taylor & Finlay, 2003; Lõhmus, 2009; van der Linde *et al.*, 2012). En parallèle, les variations climatiques entre les saisons influencent aussi la fructification des champignons (Newton *et al.*, 2003; O'Dell *et al.*, 2004). Néanmoins, ce type d'inventaire est parfaitement adapté pour identifier des espèces rares ou menacées qui ont des fructifications de longue durée de vie (Runnel *et al.*, 2015).

A l'inverse des inventaires traditionnels, les inventaires se basant sur le metabarcoding de l'ADNe peuvent fournir des échantillons taxonomiques plus importants des communautés fongiques en intégrant non seulement les champignons qui fructifient mais un grand nombre des champignons présents sur le site échantillonné. De plus, l'ADNe du sol est moins influencé par les variations climatiques saisonnières. Néanmoins, l'interprétation écologique des communautés fongiques est limitée en raison (i) d'un manque de connaissances sur une grande partie de la biodiversité fongique (Hibbett *et al.*, 2011) et (ii) des références de barcode pouvant être faussement annotées (Hibbett *et al.*, 2011; Hibbett *et al.*, 2016; Nilsson *et al.*, 2016; Yahr *et al.*, 2016). Récemment, Frøslev *et al.* (2019) ont comparé les conclusions obtenues avec des inventaires taxonomiques traditionnels et ceux basés sur l'ADNe. Les inventaires basés sur les corps fructifères fongiques ont identifié moins d'espèces au total et par site. En effet, certains genres comme les inocybes et les cortinaires sont plus faciles à identifier avec le metabarcoding de l'ADNe (Frøslev *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2008; Larsson *et al.*, 2009). Ils ont aussi confirmé que les inventaires se focalisant sur les corps fructifères fongiques étaient les plus adaptés pour relever les espèces qui sont sur liste rouge. Les auteurs concluent en affirmant que la combinaison des deux méthodologies sont complémentaires et que les coûts étaient à peu près équivalents.

I.5. Objectif général de la thèse

Peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur les micro-organismes du sol en forêts anciennes (Grilli *et al.*, 2017 ; Mony *et al.*, 2020 ; Berges & Dupouey, 2021). Depuis l'essor de l'emploi du metabarcoding de l'ADNe (Taberlet *et al.*, 2018), il est devenu possible d'étudier plus facilement les micro-organismes du sol et d'observer les conséquences des perturbations anthropiques sur leurs communautés (Boeraeve *et al.*, 2018; Mennicken *et al.*, 2020). Malgré des limitations techniques actuelles (Cristescu & Hebert, 2018 ; Calderon-Sanou *et al.*, 2020), l'emploi du metabarcoding de l'ADNe pour surveiller la biodiversité est justifié (Cristescu & Hebert, 2018) et complémentaire avec les inventaires basés sur les corps fructifères fongiques (Frøslev *et al.*, 2019).

Ma thèse a pour objectif général d'aborder la surveillance de la biodiversité évaluée par l'ADNe du sol de forêts anciennes et en particulier d'étudier (i) la réponse de la diversité spécifique du sol grâce au metabarcoding de l'ADNe, en particulier d'évaluer la réponse des champignons à une contrainte majeure sur ces forêts anciennes que représente leur fragmentation et de tester (ii) l'impact des interactions ectomycorhiziennes inter-espèces (réseaux mycorhiziens communs) sur la régénération et la croissance des hêtres en forêt ancienne. De façon plus précise, ma thèse vise à :

- Observer comment la proportion et le nombre de taches de forêts anciennes dans le paysage influencent les communautés des champignons du sol ;
- Tester l'influence des réseaux mycorhiziens sur la croissance des semis en forêts anciennes et récentes à travers une approche expérimentale ;
- Observer comment la qualité de l'habitat de forêts anciennes influencent les communautés de la biodiversité du sol, identifiées à partir du metabarcoding de l'ADNe.

Le volet 3 aura comme objectif d'évaluer les conséquences de la fragmentation forestière passée et présente sur les communautés fongiques du sol des forêts anciennes en comparant les réponses entre les guildes trophiques, les formes de croissance (considérée ici comme un proxy des capacités de dispersion) et les familles les plus abondantes (Figure 14). Très peu d'études s'intéressent aux conséquences de la fragmentation sur les champignons, notamment pour les champignons mycorhiziens (Mueller *et al.*, 2004 ; Crockatt, 2012 ; Fardila *et al.*, 2017). La diversité fongique réagit généralement négativement à la fragmentation de l'habitat mais l'ampleur de la réponse dépend aussi des guildes trophiques (Grilli *et al.*, 2017). Les hypothèses seront (i) que la diversité taxonomique fongique sera négativement corrélée à la fragmentation forestière (nombre de parcelles forestières) et ce plus précisément celle des champignons pathotrophes et symbiotrophes, (ii) la

diversité fongique sera quant à elle positivement corrélée à la quantité de forêts dans le paysage et (iii) que la fragmentation forestière limite la dispersion des espèces à faible capacité de dispersion.

Le volet 4 s'intéressera à l'influence des réseaux mycorhiziens communs sur la croissance et survie de plantules de hêtre (*Fagus sylvatica*) en forêt ancienne et récente (Figure 14). Face à la menace des changements globaux, il est primordial d'étudier les conditions favorisant la survie des plantules. Parmi les champignons du sol, les champignons mycorhiziens ont un rôle essentiel dans la croissance des plantes (Reid *et al.*, 1983 ; Smith *et al.*, 2008). Ils sont essentiels à la régénération des espèces d'arbres tempérées et sont responsables de l'effet « plante- nourrice » dans les écosystèmes naturels (García de Jalón *et al.*, 2020 ; Policelli *et al.*, 2020). Ces études suggèrent que les champignons mycorhiziens et leurs réseaux favorisent la régénération des plantules. Nous supposerons que leurs effets sur la croissance et la survie des plantules sont plus forts dans les forêts anciennes que dans les forêts récentes.

Le volet 5 étudiera les conséquences de la qualité de l'habitat en forêt ancienne sur la biodiversité évaluée par l'ADNe du sol, en testant notamment les corrélations avec la caractérisation de l'indicateur de biodiversité potentielle, l'IBP (Larrieu & Gonin, 2008) (Figure 14). Des études ont démontré des relations positives entre les facteurs de l'IBP et la composition et la richesse spécifique de plusieurs espèces forestières vivantes sur le bois (Larrieu *et al.*, 2019 ; Zeller *et al.*, 2022). Néanmoins, les facteurs de l'IBP n'ont pas encore été testés sur la biodiversité évaluée par l'ADNe du sol forestier. Nous présageons que (i) que les facteurs de l'IBP permettent d'expliquer la diversité taxonomique du sol et (ii) que l'influence des facteurs de l'IBP dépendent des différents phylums étudiés.

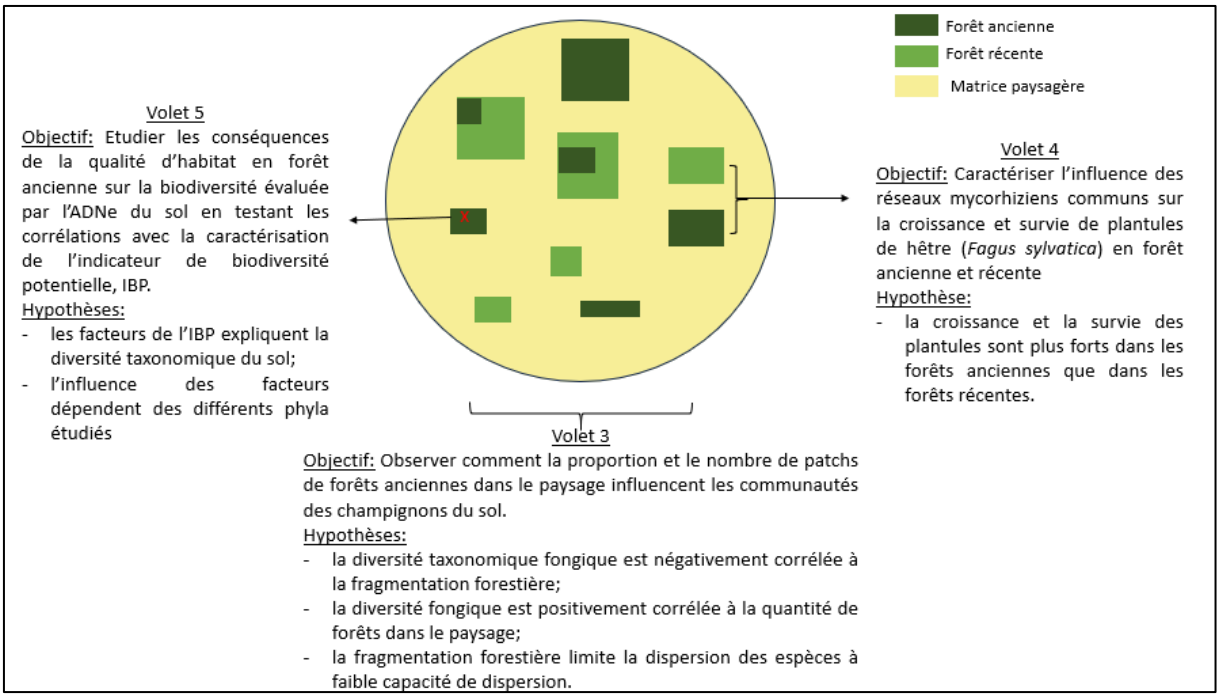


Figure 14- Schéma bilan de la thèse avec les différents objectifs

Références

Agreda T, Cisneros O, Agueda B, Fernandez-Toiran LM. 2014. Age class influence on the yield of edible fungi in a managed Mediterranean forest. *Mycorrhiza* **24**(2): 143-152.

Amend A, Garbelotto M, Fang Z, Keeley S. 2010. Isolation by landscape in populations of a prized edible mushroom Tricholoma matsutake. *Conservation Genetics* **11**: 795-802.

Angelstam P, Dönz-Breuss M. 2004. Measuring forest biodiversity at the stand scale: An evaluation of indicators in European forest history gradients. *Ecological Bulletins*: 305-332.

Assmann T. 1999. The ground beetle fauna of ancient and recent woodlands in the lowlands of north-west Germany (Coleoptera, Carabidae). *Biodiversity and Conservation* **8**(11): 1499-1517.

Baker SC, Spies TA, Wardlaw TJ, Balmer J, Franklin JF, Jordan GJ. 2013. The harvested side of edges: Effect of retained forests on the re-establishment of biodiversity in adjacent harvested areas. *Forest Ecology and management* **302**: 107-121.

Baker TP, Baker SC, Dalton PJ, Fountain-Jones NM, Jordan GJ. 2016. Temporal persistence of edge effects on bryophytes within harvested forests. *Forest Ecology and management* **375**: 223-229.

Baral S, Thapa-Magar KB, Karki G, Devkota S, Shrestha BB. 2015. Macrofungal diversity in community-managed sal (Shorea robusta) forests in central Nepal. *Mycology* **6**(3-4): 151-157.

Barbieri E, Ceccaroli P, Palma F, Agostini D, Stocchi V 2012. Ectomycorrhizal Helper Bacteria: The Third Partner in the Symbiosis. In: Zambonelli A, Bonito GM eds. *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Current Knowledge and Future Prospects*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 125-141.

Barnes CJ, Maldonado C, Froslev TG, Antonelli A, Ronsted N. 2016. Unexpectedly High Beta-Diversity of Root-Associated Fungal Communities in the Bolivian Andes. *Frontiers in Microbiology* **7**: 13.

Bassler C, Muller J, Dziock F, Brandl R. 2010. Effects of resource availability and climate on the diversity of wood-decaying fungi. *Journal of ecology* **98**(4): 822-832.

Bergès L, Dupouey J-L. 2017. Écologie historique et ancienneté de l'état boisé: concepts, avancées et perspectives de la recherche. *Revue forestière française* **69**: 297-318.

Berges L, Dupouey JL. 2021. Historical ecology and ancient forests: Progress, conservation issues and scientific prospects, with some examples from the French case. *Journal of Vegetation Science* **32**(1): 17.

Blaser S, Prati D, Senn-Irlet B, Fischer M. 2013. Effects of forest management on the diversity of deadwood-inhabiting fungi in Central European forests. *Forest Ecology and management* **304**: 42-48.

Boddy L. 1999. Saprotrophic cord-forming fungi: meeting the challenge of heterogeneous environments. *Mycologia* **91**(1): 13-32.

Boddy L, Heilmann-Clausen J 2008. Basidiomycete community development in temperate angiosperm wood. In: Boddy L, Frankland JC, West Pv, Boddy L, Frankland JC, West Pv, British Mycological S eds. *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 211-237.

Boddy L, Hiscox J. 2016. Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. *Microbiology Spectrum* **4**(6): 4.6. 17.

Boddy L, Hiscox J, Gilmartin EC, Johnston SR, Heilmann-Clausen J 2017. Wood decay communities in angiosperm wood. In: Dighton J, White JF eds. *The fungal community : its organization and role in the ecosystem*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis, 169-189.

Boddy L, Jones TH 2007. Mycelial responses in heterogeneous environments: parallels with macroorganisms. In: Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS, Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS eds. *Fungi in the Environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 112-140.

Boeraeve M. 2019. *The impact of forest fragmentation on mycorrhizal communities.* PhD, KU Leuven.

Boeraeve M, Honnay O, Jacquemyn H. 2019. Forest edge effects on the mycorrhizal communities of the dual-mycorrhizal tree species Alnus glutinosa (L.) Gaertn. *Science of the Total Environment* **666**: 703-712.

Boeraeve M, Honnay O, Mullens N, Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Thomaes A, Jacquemyn H. 2018. The impact of spatial isolation and local habitat conditions on colonization of recent forest stands by ectomycorrhizal fungi. *Forest Ecology and management* **429**: 84-92.

Bogar LM, Peay KG 2017. Processes maintaining the coexistence of ectomycorrhizal fungi at a fine spatial scale. In: Tedersoo L ed. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Cham: Springer, 79-105.

Bohan DA, Vacher C, Tamaddoni-Nezhad A, Raybould A, Dumbrell AJ, Woodward G. 2017. Next-Generation Global Biomonitoring: Large-scale, Automated Reconstruction of Ecological Networks. *Trends in Ecology & Evolution* **32**(7): 477-487.

Bonet JA, Fischer CR, Colinas C. 2004. The relationship between forest age and aspect on the production of sporocarps of ectomycorrhizal fungi in Pinus sylvestris forests of the central Pyrenees. *Forest Ecology and management* **203**(1-3): 157-175.

Borgmann-Winter BW, Stephens RB, Anthony MA, Frey SD, D'Amato AW, Rowe RJ. 2023. Wind and small mammals are complementary fungal dispersers. *Ecology*: 12.

Brin A, Brustel H, Jactel H. 2009. Species variables or environmental variables as indicators of forest biodiversity: a case study using saproxylic beetles in Maritime pine plantations. *Annals of Forest Science* **66**(3): 11.

Brin A, Valladares L, Ladet S, Bouget C. 2016. Effects of forest continuity on flying saproxylic beetle assemblages in small woodlots embedded in agricultural landscapes. *Biodiversity and Conservation* **25**(3): 587-602.

Brown JK, Hovmøller MS. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* **297**(5581): 537-541.

Brundrett MC 2017. Global Diversity and Importance of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Plants. In: Tedersoo L ed. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Cham: Springer International Publishing Ag, 533-556.

Brundrett MC, Tedersoo L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* **220**(4): 1108-1115.

Brunet J. 1993. Environmental and historical factors limiting the distribution of rare forest grasses in South Sweden. *Forest Ecology and management* **61**(3-4): 263-275.

Burrascano S, Keeton WS, Sabatini FM, Blasi C. 2013. Commonality and variability in the structural attributes of moist temperate old-growth forests: A global review. *Forest Ecology and management* **291**: 458-479.

Buse J. 2012. "Ghosts of the past": flightless saproxylic weevils (Coleoptera: Curculionidae) are relict species in ancient woodlands. *Journal of Insect Conservation* **16**(1): 93-102.

Buse J, Ranius T, Assmann T. 2008. An endangered longhorn beetle associated with old oaks and its possible role as an ecosystem engineer. *Conservation Biology* **22**(2): 329-337.

Calderon-Sanou I, Munkemuller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W. 2020. From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices? *Journal of biogeography* **47**(1): 193-206.

Caruso A, Rudolphi J, Rydin H. 2011. Positive Edge Effects on Forest-Interior Cryptogams in Clear-Cuts. *Plos One* **6**(11): 8.

Cateau E, Larrieu L, Vallauri D, Savoie J-M, Touroult J, Brustel H. 2015. Ancienneté et maturité: deux qualités complémentaires d'un écosystème forestier. *Comptes rendus biologies* **338**(1): 58-73.

Cavard X, Macdonald SE, Bergeron Y, Chen HYH. 2011. Importance of mixedwoods for biodiversity conservation: Evidence for understory plants, songbirds, soil fauna, and ectomycorrhizae in northern forests. *Environmental Reviews* **19**: 142-161.

Chang Y, Wang S, Sekimoto S, Aerts AL, Choi C, Clum A, LaButti KM, Lindquist EA, Yee Ngan C, Ohm RA, et al. 2015. Phylogenomic Analyses Indicate that Early Fungi Evolved Digesting Cell Walls of Algal Ancestors of Land Plants. *Genome Biol Evol* **7**(6): 1590-1601.

Chauvat M, Wolters V, Dauber J. 2007. Response of collembolan communities to land-use change and grassland succession. *Ecography* **30**(2): 183-192.

Clobert J, Baguette M, Benton TG, Clobert J. 2012. *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.

Compton JE, Boone RD. 2000. Long-term impacts of agriculture on soil carbon and nitrogen in New England forests. *Ecology* **81**(8): 2314-2330.

Correia M, Heleno R, da Silva LP, Costa JM, Rodríguez-Echeverría S. 2019. First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytologist* **222**(2): 1054-1060.

Corriol G, Hannoire C, Hamdi E. 2014. Réalisation de la liste rouge d'espèces menacées de champignons en Midi-Pyrénées selon la méthodologie UICN. Rapport final: Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées (CBNPMP).

Courty PE, Buee M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, Uroz S, Garbaye J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* **42**(5): 679-698.

Creer S, Deiner K, Frey S, Porazinska D, Taberlet P, Thomas WK, Potter C, Bik HM. 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution* **7**(9): 1008-1018.

Cristescu ME. 2014. From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **29**(10): 566-571.

Cristescu ME, Hebert PDN 2018. Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. In: Futuyma DJ ed. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 49*. Palo Alto: Annual Reviews, 209-230.

Crockatt ME. 2012. Are there edge effects on forest fungi and if so do they matter? *Fungal Biology Reviews* **26**(2-3): 94-101.

Cushman SA, McGarigal K. 2003. Landscape-level patterns of avian diversity in the Oregon Coast Range. *Ecological Monographs* **73**(2): 259-281.

da Silva PM, Carvalho F, Dirilgen T, Stone D, Creamer R, Bolger T, Sousa JP. 2016. Traits of collembolan life-form indicate land use types and soil properties across an European transect. *Applied Soil Ecology* **97**: 69-77.

Dajoz R, Lavoisier T, Lavoisier D. 1998. Les insectes et la forêt: rôle et diversité des insectes dans le milieu forestier. *Biofutur* **183**: 53.

Davison J, Moora M, Opik M, Adholeya A, Ainsaar L, Ba A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, et al. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* **349**(6251): 970-973.

De Camargo RX, Boucher-Lalonde V, Currie DJ. 2018. At the landscape level, birds respond strongly to habitat amount but weakly to fragmentation. *Diversity and Distributions* **24**(5): 629-639.

De Keersmaeker L, Onkelinx T, De Vos B, Rogiers N, Vandekerkhove K, Thomaes A, De Schrijver A, Hermy M, Verheyen K. 2015. The analysis of spatio-temporal forest changes (1775-2000) in Flanders (northern Belgium) indicates habitat-specific levels of fragmentation and area loss. *Landscape Ecology* **30**(2): 247-259.

De Schrijver A, Devlaeminck R, Mertens J, Wuyts K, Hermy M, Verheyen K. 2007. On the importance of incorporating forest edge deposition for evaluating exceedance of critical pollutant loads. *Applied Vegetation Science* **10**(2): 293-298.

Deagle BE, Chiaradia A, McInnes J, Jarman SN. 2010. Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: is what goes in what comes out? *Conservation Genetics* **11**(5): 2039-2048.

Decaens T, Jimenez JJ, Gioia C, Measey GJ, Lavelle P. 2006. The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology* **42**: S23-S38.

Devlaeminck R, De Schrijver A, Hermy M. 2005. Variation in throughfall deposition across a deciduous beech (Fagus sylvatica L.) forest edge in Flanders. *Science of the Total Environment* **337**(1-3): 241-252.

Dickie IA, Alexander I, Lennon S, Opik M, Selosse MA, van der Heijden MGA, Martin FM. 2015. Evolving insights to understanding mycorrhizas. *New Phytologist* **205**(4): 1369-1374.

Diedhiou AG, Dupouey JL, Buee M, Dambrine E, Laut L, Garbaye J. 2009. Response of ectomycorrhizal communities to past Roman occupation in an oak forest. *Soil Biology & Biochemistry* **41**(10): 2206-2213.

Dighton J, Mason PA 1985. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In: Moore D, Castellanoa LA, Wood D, Frankland JC eds. *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge: University Press Cambridge, 117-139.

Drummond AJ, Newcomb RD, Buckley TR, Xie D, Dopheide A, Potter BCM, Heled J, Ross HA, Tooman L, Grosser S, et al. 2015. Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment. *Gigascience* **4**: 19.

Dupouey J-L, Bachacou J, Cosserat R, Aberdam S, Vallauri D, Chappart G, Corvisier de Villèle M-A. 2007. Vers la réalisation d'une carte géoréférencée des forêts anciennes de France. *Le Monde des cartes* **191**: 85-98.

Dupouey J 2013. Minimum forestier et transition forestiere. *Colloq Nat. Vers Une Autre Cult. Des Eaux Des Forets*. Chambéry, France.

Dyer JM. 2010. Land-use legacies in a central Appalachian forest: differential response of trees and herbs to historic agricultural practices. *Applied Vegetation Science* **13**(2): 195-206.

EEA. 2016. Environmental indicator. EEA Report 30/2016. Copenhagen, Denmark: European Environment Agency.

Eyssartier G, Roux P. 2017. *Le guides des champignons: France et Europe*: Belin.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**: 487-515.

Fahrig L. 2013. Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of biogeography* **40**(9): 1649-1663.

Fahrig L 2017. Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. In: Futuyma DJ ed. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 48*. Palo Alto: Annual Reviews, 1-23.

Fahrig L, Arroyo-Rodriguez V, Bennett JR, Boucher-Lalonde V, Cazetta E, Currie DJ, Eigenbrod F, Ford AT, Harrison SP, Jaeger JAG, et al. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological conservation* **230**: 179-186.

Fahrig L, Watling JI, Arnillas CA, Arroyo-Rodriguez V, Jorger-Hickfang T, Muller J, Pereira HM, Riva F, Rosch V, Seibold S, et al. 2022. Resolving the SLOSS dilemma for biodiversity conservation: a research agenda. *Biological Reviews* **97**(1): 99-114.

Falco L, Coviella C. 2016. Contribution of Amynthas gracilis (Megascolecidae) and Octolasion cyaneum (Lumbricidae) to soil physical stability: a mesocosm experiment. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias* **48**(1): 115-127.

FAO 1999. State of the World's Forests 1999. Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations.

FAO 2015. Sustainable forest management.

Fardila D, Kelly LT, Moore JL, McCarthy MA. 2017. A systematic review reveals changes in where and how we have studied habitat loss and fragmentation over 20 years. *Biological conservation* **212**: 130-138.

Fernandez-Toiran LM, Agreda T, Olano JM. 2006. Stand age and sampling year effect on the fungal fruit body community in Pinus pinaster forests in central Spain. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **84**(8): 1249-1258.

Fischer AL, Moncalvo JM, Klironomos JN, Malcolm JR. 2012. Fruiting body and molecular rDNA sampling of fungi in woody debris from logged and unlogged boreal forests in northeastern Ontario. *Ecoscience* **19**(4): 374-390.

Flensted KK, Bruun HH, Ejrnaes R, Eskildsen A, Thomsen PF, Heilmann-Clausen J. 2016. Red-listed species and forest continuity - A multi-taxon approach to conservation in temperate forests. *Forest Ecology and management* **378**: 144-159.

Fletcher RJ, Didham RK, Banks-Leite C, Barlow J, Ewers RM, Rosindell J, Holt RD, Gonzalez A, Pardini R, Damschen EI, et al. 2018. Is habitat fragmentation good for biodiversity? *Biological conservation* **226**: 9-15.

Flinn KM, Marks PL. 2007. Agricultural legacies in forest environments: Tree communities, soil properties, and light availability. *Ecological applications* **17**(2): 452-463.

Fountain-Jones NM, Jordan GJ, Baker TP, Balmer JM, Wardlaw T, Baker SC. 2015. Living near the edge: Being close to mature forest increases the rate of succession in beetle communities. *Ecological applications* **25**(3): 800-811.

Franklin JF, Van Pelt R. 2004. Spatial aspects of structural complexity in old-growth forests. *Journal of Forestry* **102**(3): 22-28.

Fricker MD, Bebber D, Boddy L 2008. Mycelial networks: structure and dynamics. In: Boddy L, Frankland JC, West Pv, Boddy L, Frankland JC, West Pv, British Mycological S eds. *Ecology of saprotrophic basidiomycetes*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 3-18.

Frøslev TG, Jeppesen TS, Laessoe T, Kjoller R. 2007. Molecular phylogenetics and delimitation of species in Cortinarius section Calochroi (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**(1): 217-227.

Frøslev TG, Kjoller R, Bruun HH, Ejrnaes R, Hansen AJ, Laesoe T, Heilmann-Clausen J. 2019. Man against machine: Do fungal fruitbodies and eDNA give similar biodiversity assessments across broad environmental gradients? *Biological conservation* **233**: 201-212.

Fukami T. 2015. Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* **46**: 1-23.

Fukami T, Dickie IA, Paula Wilkie J, Paulus BC, Park D, Roberts A, Buchanan PK, Allen RB. 2010. Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecology Letters* **13**(6): 675-684.

Gage SH, Isard SA, Colunga-G M. 1999. Ecological scaling of aerobiological dispersal processes. *Agricultural and Forest Meteorology* **97**(4): 249-261.

Gao T, Hedblom M, Emilsson T, Nielsen AB. 2014. The role of forest stand structure as biodiversity indicator. *Forest Ecology and management* **330**: 82-93.

Garbaye J. 2013. *La symbiose mycorhizienne: une association entre les plantes et les champignons*. Versailles: Editions Quae.

García de Jalón L, Limousin J-M, Richard F, Gessler A, Peter M, Hättenschwiler S, Milcu A. 2020. Microhabitat and ectomycorrhizal effects on the establishment, growth and survival of Quercus ilex L. seedlings under drought. *Plos One* **15**(6): e0229807.

Gardes M, Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a Pinus muricata forest: Above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **74**(10): 1572-1583.

Geburek T, Milasowszky N, Frank G, Konrad H, Schadauer K. 2010. The Austrian Forest Biodiversity Index: All in one. *Ecological Indicators* **10**(3): 753-761.

Géoportail 2023. Carte.

Gerard F, Petit S, Smith G, Thomson A, Brown N, Manchester S, Wadsworth R, Bugar G, Halada L, Bezak P, et al. 2010. Land cover change in Europe between 1950 and 2000 determined employing aerial photography. *Progress in Physical Geography-Earth and Environment* **34**(2): 183-205.

GIP-Ecofor 2023a. CARTOFORA, le site de référence sur la cartographie des forêts anciennes en France métropolitaine.

GIP-Ecofor 2023b. Le projet Cartofora.

GIP-Ecofor 2023c. Les changements des surfaces forestières.

Gonin P, Larrieu L, Deconchat M. 2017. L'Indice de biodiversité potentielle (IBP): comment l'étendre à l'ensemble des forêts méditerranéennes? *Forêt Méditerranéenne* **38**(3): 335-342.

Gossner M, Engel K, Jessel B. 2008. Plant and arthropod communities in young oak stands: are they determined by site history? *Biodiversity and Conservation* **17**(13): 3165-3180.

Goodwin BJ, Fahrig L. 2002. How does landscape structure influence landscape connectivity? *Oikos* **99**(3): 552-570.

Grilli G, Longo S, Huais PY, Pereyra M, Verga EG, Urcelay C, Galetto L. 2017. Fungal diversity at fragmented landscapes: synthesis and future perspectives. *Current Opinion in Microbiology* **37**: 161-165.

Grilli G, Urcelay C, Galetto L, Davison J, Vasar M, Saks Ü, Jairus T, Öpik M. 2015. The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities in the roots of a ruderal forb is not related to the forest fragmentation process. *Environmental Microbiology* **17**(8): 2709-2720.

Grove SJ, Forster L. 2011. A decade of change in the saproxylic beetle fauna of eucalypt logs in the Warra long-term log-decay experiment, Tasmania. 2. Log-size effects, succession, and the functional significance of rare species. *Biodiversity and Conservation* **20**(10): 2167-2188.

Guo J, Wei B, Liu J, Eissenstat DM, Yu S, Gong X, Wu J, He X, Yu M. 2023. Linkages between Plant Community Composition and Soil Microbial Diversity in Masson Pine Forests. *Plants* **12**(9): 1750.

Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD, Lovejoy TE, Sexton JO, Austin MP, Collins CD, et al. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances* **1**(2): 9.

Haddad NM, Gonzalez A, Brudvig LA, Burt MA, Levey DJ, Damschen EI. 2017. Experimental evidence does not support the Habitat Amount Hypothesis. *Ecography* **40**(1): 48-55.

Halbwachs H, Bässler C. 2015. Gone with the wind–a review on basidiospores of lamellate agarics. *Mycosphere* **6**(1): 78-112.

Hallenberg N. 1995. Dispersal abilities and distributional patterns in Aphyllophorales, with emphasis on corticioid fungi. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **30**(3): 95-100.

Hallenberg N, Küffer N. 2001. Long-distance spore dispersal in wood-inhabiting basidiomycetes. *Nordic Journal of Botany* **21**(4): 431-436.

Háněl L. 2001. Succession of soil nematodes in pine forests on coal-mining sands near Cottbus, Germany. *Applied Soil Ecology* **16**(1): 23-34.

Hawksworth DL, Lucking R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum* **5**(4): 17.

Heilmann-Clausen J, Boddy L. 2005. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial ecology* **49**: 399-406.

Heilmann-Clausen J, Christensen M. 2004. Does size matter? On the importance of various dead wood fractions for fungal diversity in Danish beech forests. *Forest Ecology and management* **201**(1): 105-119.

Heiniger C, Barot S, Ponge JF, Salmon S, Botton-Divet L, Carmignac D, Dubs F. 2014. Effect of habitat spatiotemporal structure on collembolan diversity. *Pedobiologia* **57**(2): 103-117.

Heithecker TD, Halpern CB. 2007. Edge-related gradients in microclimate in forest aggregates following structural retention harvests in western Washington. *Forest Ecology and management* **248**(3): 163-173.

Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**(6692): 431-431.

Hennon PE. 1995. Are heart rot fungi major factors of disturbance in gap-dynamic forests? *Northwest Science* **69**(4): 284-293.

Hermy M, Honnay O, Firbank L, Grashof-Bokdam C, Lawesson JE. 1999. An ecological comparison between ancient and other forest plant species of Europe, and the implications for forest conservation. *Biological conservation* **91**(1): 9-22.

Hermy M, Verheyen K. 2007. Legacies of the past in the present-day forest biodiversity: a review of past land-use effects on forest plant species composition and diversity. *Ecological Research* **22**(3): 361-371.

Herrault PA, Larrieu L, Cordier S, Gimmi U, Lachat T, Ouin A, Sarthou JP, Sheeren D. 2016. Combined effects of area, connectivity, history and structural heterogeneity of woodlands on the species richness of hoverflies (Diptera: Syrphidae). *Landscape Ecology* **31**(4): 877-893.

Hibbett D, Abarenkov K, Koljalg U, Opik M, Chai B, Cole J, Wang Q, Crous P, Robert V, Helgason T, et al. 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia* **108**(6): 1049-1068.

Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* **25**(1): 38-47.

Hicke JA, Allen CD, Desai AR, Dietze MC, Hall RJ, Hogg EH, Kashian DM, Moore D, Raffa KF, Sturrock RN, et al. 2012. Effects of biotic disturbances on forest carbon cycling in the United States and Canada. *Global Change Biology* **18**(1): 7-34.

Hiscox J, Savoury M, Müller CT, Lindahl BD, Rogers HJ, Boddy L. 2015. Priority effects during fungal community establishment in beech wood. *The ISME journal* **9**(10): 2246-2260.

Hjalten J, Stenbacka F, Pettersson RB, Gibb H, Johansson T, Danell K, Ball JP, Hilszczanski J. 2012. Micro and Macro-Habitat Associations in Saproxylic Beetles: Implications for Biodiversity Management. *Plos One* **7**(7): 11.

Hobbie EA. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* **87**(3): 563-569.

Hofmeister J, Hosek J, Brabec M, Hedl R, Modry M. 2013. Strong influence of long-distance edge effect on herb-layer Vegetation in forest fragments in an agricultural landscape. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **15**(6): 293-303.

Holah JC, Wilson MV, Hansen EM. 1993. Effects of a native forest pathogen, Phellinus weirii, on Douglas-fir forest composition in western Oregon. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **23**(12): 2473-2480.

Holmer L, Stenlid J. 1997. Competitive hierarchies of wood decomposing basidiomycetes in artificial systems based on variable inoculum sizes. *Oikos*: 77-84.

Holmes MA, Matlack GR. 2018. Assembling the forest herb community after abandonment from agriculture: Long-term successional dynamics differ with land-use history. *Journal of ecology* **106**(5): 2121-2131.

Hovel KA, Lipcius RN. 2001. Habitat fragmentation in a seagrass landscape: patch size and complexity control blue crab survival. *Ecology* **82**(7): 1814-1829.

Hueck H. 1953. Myco-sociological methods of investigation. *Vegetatio Acta Geobotanica* **4**(2): 84-101.

Hyde KD. 2022. The numbers of fungi. *Fungal diversity* **114**(1): 1-1.

Irmler U, Arp H, Notzold R. 2010. Species richness of saproxylic beetles in woodlands is affected by dispersion ability of species, age and stand size. *Journal of Insect Conservation* **14**(3): 227-235.

IUCN 2016. Resolution WCC-2016-Res-046-EN, Assessing the global applicability of the concept of ancient forests as understood in European forest policy and management.In IUCN. *IUCN Resolutions, Recommendations and other Decisions*. Gland, Switzerland.

Jamoneau A, Chabrerie O, Moron E, Saguez R, Decocq G 2010. Biogéographie historique et diversité végétale des massifs forestiers en Picardie. In: Galochet M, Glon E eds. *Des milieux aux territoires forestiers : itinéraires biogéographiques*: Artois Presses Université, 67-84.

Jansen A, Robertson A, Thompson L, Wilson A. 2004. Development and application of a method for the rapid appraisal of riparian condition. *River and Riparian Land Management Technical Guideline* **4**: 1-14.

Janssen P. 2016. *Influences relatives de l'ancienneté et de la maturité sur la biodiversité: implications pour la conservation en forêts de montagne.* PhD, Université Grenoble Alpes.

Johnson CN. 1996. Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology & Evolution* **11**(12): 503-507.

Jumpponen A, Egerton-Warburton LM. 2005. Mycorrhizal fungi in successional environments: a community assembly model incorporating host plant, environmental, and biotic filters. *Mycology Series* **23**: 139.

Karst J, Jones MD, Hoeksema JD. 2023. Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution* **7**(4): 501-+.

Kati V, Devillers P, Dufrene M, Legakis A, Vokou D, Lebrun P. 2004. Testing the value of six taxonomic groups as biodiversity indicators at a local scale. *Conservation Biology* **18**(3): 667-675.

Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Martone RG, Lowell N, Thomsen PF, Mach ME, Bennett M, Prahler E, Caldwell MR, et al. 2014. Harnessing DNA to improve environmental management. *Science* **344**(6191): 1455-1456.

Kennedy PG, Peay KG, Bruns TD. 2009. Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: are priority effects a rule or an exception? *Ecology* **90**(8): 2098-2107.

Keren S, Svoboda M, Janda P, Nagel TA. 2020. Relationships between Structural Indices and Conventional Stand Attributes in an Old-Growth Forest in Southeast Europe. *Forests* **11**(1): 13.

Kimberley A, Blackburn GA, Whyatt JD, Smart SM. 2014. Traits of plant communities in fragmented forests: the relative influence of habitat spatial configuration and local abiotic conditions. *Journal of ecology* **102**(3): 632-640.

Kjøller A, Struwe S. 1980. Microfungi of decomposing red alder leaves and their substrate utilization. *Soil Biology and Biochemistry* **12**(4): 425-431.

Klironomos J, Moutoglis P. 1999. Colonization of nonmycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan, Folsomia candida. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 277-281.

Koerner W, Dupouey JL, Dambrine E, Benoit M. 1997. Influence of past land use on the vegetation and soils of present day forest in the Vosges mountains, France. *Journal of ecology* **85**(3): 351-358.

Kopali A, Gixhari B, Vrapi H, Ismaili H, Uka R. 2014. Impact of biodiversity (pedo-fauna) in the biological qualities of soil in biological and conventional agro-ecosystems, in apple tree (Malus domestica). *Online Int. Interdiscip. Res. J* **4**: 61-69.

Krah FS, Seibold S, Brandl R, Baldrian P, Muller J, Bassler C. 2018. Independent effects of host and environment on the diversity of wood-inhabiting fungi. *Journal of ecology* **106**(4): 1428-1442.

Kranabetter JM, Friesen J, Gamiet S, Kroeger P. 2005. Ectomycorrhizal mushroom distribution by stand age in western hemlock - lodgepole pine forests of northwestern British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* **35**(7): 1527-1539.

Kubartova A, Ottosson E, Dahlberg A, Stenlid J. 2012. Patterns of fungal communities among and within decaying logs, revealed by 454 sequencing. *Molecular Ecology* **21**(18): 4514-4532.

Kujawska MB, Rudawska M, Wilgan R, Leski T. 2021. Similarities and Differences among Soil Fungal Assemblages in Managed Forests and Formerly Managed Forest Reserves. *Forests* **12**(3): 353.

Lagana A, Loppi S, De Dominicis V. 1999. Relationship between environmental factors and the proportions of fungal trophic groups in forest ecosystems of the central Mediterranean area. *Forest Ecology and management* **124**(2-3): 145-151.

Lallemant T, Touzet T, Gervaise A. 2017. Une méthodologie nationale pour le géoréférencement et la vectorisation des cartes d'état-major, minutes au 1/40 000. *Revue forestière française* **69**(4): 341-352.

Landi M, Salerni E, Ambrosio E, D'Aguanno M, Nucci A, Saveri C, Perini C, Angiolini C. 2015. Concordance between vascular plant and macrofungal community composition in broadleaf deciduous forests in central Italy. *Iforest-Biogeosciences and Forestry* **8**: 279-286.

Landres PB, Verner J, Thomas JW. 1988. Ecological uses of vertebrate indicator species: a critique. *Conservation Biology* **2**(4): 316-328.

Lange M. 1948. *The agarics of Maglemose: a study in the ecology of the agarics*.

Larrieu L, Cabanettes A, Delarue A. 2012. Impact of silviculture on dead wood and on the distribution and frequency of tree microhabitats in montane beech-fir forests of the Pyrenees. *European Journal of Forest Research* **131**(3): 773-786.

Larrieu L, Gonin P. 2008. L'indice de Biodiversité Potentielle (IBP): une méthode simple et rapide pour évaluer la biodiversité potentielle des peuplements forestiers. *Revue forestière française* **6**: 727-748.

Larrieu L, Gosselin F, Archaux F, Chevalier R, Corriol G, Dauffy-Richard E, Deconchat M, Gosselin M, Ladet S, Savoie JM, et al. 2018. Cost-efficiency of cross-taxon surrogates in temperate forests. *Ecological Indicators* **87**: 56-65.

Larrieu L, Gosselin F, Archaux F, Chevalier R, Corriol G, Dauffy-Richard E, Deconchat M, Gosselin M, Ladet S, Savoie JM, et al. 2019. Assessing the potential of routine stand variables from multi-taxon data as habitat surrogates in European temperate forests. *Ecological Indicators* **104**: 116-126.

Larsen BB, Miller EC, Rhodes MK, Wiens JJ. 2017. Inordinate Fondness Multiplied and Redistributed: The Number of Species on Earth and the New Pie of Life. *Quarterly Review of Biology* **92**(3): 229-265.

Larsson E, Ryberg M, Moreau PA, Mathiesen AD, Jacobsson S. 2009. Taxonomy and evolutionary relationships within species of section Rimosae (Inocybe) based on ITS, LSU and mtSSU sequence data. *Persoonia* **23**: 86-98.

Larsson T. 2001. Biodiversity evaluation tools for European forests. *Criteria and Indicators for Sustainable Forest Management at the Forest Management Unit Level* **75**.

Lathuillière L, Gironde-Ducher M. 2021. Méthode d'identification et de caractérisation des forêts anciennes grâce aux archives forestières. *Rendez-vous Techniques de l'ONF*(71-72): 27-33.

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* **40**(9): 2407-2415.

Le Tacon F, Maurice J-P. 2019. *L'odyssée des champignons*. Versailles: Editions Quae.

Le Tacon Fo 2021. La Déforestation Essai Sur un Problème Planétaire. Versailles: Quae.

Lepinay C, Jiráska L, Tláskal V, Brabcová V, Vrška T, Baldrian P. 2021. Successional Development of Fungal Communities Associated with Decomposing Deadwood in a Natural Mixed Temperate Forest. *Journal of Fungi* **7**(6): 412.

Li H, Reynolds JF. 1995. On definition and quantification of heterogeneity. *Oikos* **73**(2): 280-284.

Liang MX, Johnson D, Burslem D, Yu SX, Fang M, Taylor JD, Taylor AFS, Helgason T, Liu XB. 2020. Soil fungal networks maintain local dominance of ectomycorrhizal trees. *Nature communications* **11**(1): 7.

Lilleskov EA, Bruns TD. 2005. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, Tomentella sublilacina, via soil food webs. *Mycologia* **97**(4): 762-769.

Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, Decelle J, Colin S, Carcillo F, Chaffron S, Ignacio-Espinosa JC, Roux S, Vincent F, et al. 2015. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* **348**(6237): 9.

Lindenmayer DB, Fischer J, Fischer J. 2006. *Habitat fragmentation and landscape change an ecological and conservation synthesis*. Washington [D.C.] ;: Island Press.

Lindenmayer DB, Margules CR, Botkin DB. 2000. Indicators of biodiversity for ecologically sustainable forest management. *Conservation Biology* **14**(4): 941-950.

Lindgren JP, Cousins SAO. 2017. Island biogeography theory outweighs habitat amount hypothesis in predicting plant species richness in small grassland remnants. *Landscape Ecology* **32**(9): 1895-1906.

Lindner DL, Burdsall HH, Stanosz GR. 2006. Species diversity of polyporoid and corticioid fungi in northern hardwood forests with differing management histories. *Mycologia* **98**(2): 195-217.

Lõhmus A. 2009. Factors of species-specific detectability in conservation assessments of poorly studied taxa: The case of polypore fungi. *Biological conservation* **142**(11): 2792-2796.

MacArthur RH, Wilson EO, Wilson EO. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Magura T, Bogyó D, Mizser S, Nagy DD, Tóthmérész B. 2015. Recovery of ground-dwelling assemblages during reforestation with native oak depends on the mobility and feeding habits of the species. *Forest Ecology and management* **339**: 117-126.

Marchand P, Houle G. 2006. Spatial patterns of plant species richness along a forest edge: What are their determinants? *Forest Ecology and management* **223**(1-3): 113-124.

Marozas V, Grigaitis V, Brazaitis G. 2005. Edge effect on ground vegetation in clear-cut edges of pine-dominated forests. *Scandinavian Journal of Forest Research* **20**: 43-48.

Martin CA. 2018. An early synthesis of the habitat amount hypothesis. *Landscape Ecology* **33**(11): 1831-1835.

Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, Hibbett DS. 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* **14**(12): 760-773.

McGee GG, Leopold DJ, Nyland RD. 1999. Structural characteristics of old-growth, maturing, and partially cut northern hardwood forests. *Ecological applications* **9**(4): 1316-1329.

Melero Y, Stefanescu C, Pino J. 2016. General declines in Mediterranean butterflies over the last two decades are modulated by species traits. *Biological conservation* **201**: 336-342.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of past and present-day landscape structure on forest soil microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 118.

Meyer P, Schmidt M. 2011. Accumulation of dead wood in abandoned beech (Fagus sylvatica L.) forests in northwestern Germany. *Forest Ecology and management* **261**(3): 342-352.

Mikusinski G, Bubnicki JW, Churski M, Czeszczewik D, Walankiewicz W, Kuijper DPJ. 2018. Is the impact of loggings in the last primeval lowland forest in Europe underestimated? The conservation issues of Bialowieza Forest. *Biological conservation* **227**: 266-274.

Molina R, Horton TR 2015. Mycorrhiza specificity: its role in the development and function of common mycelial networks. In: Horton TR ed. *Mycorrhizal networks*. Dordrecht: Springer, 1-39.

Mony C, Vandenkoornhuyse P, Bohannan BJM, Peay K, Leibold MA. 2020. A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Frontiers in Microbiology* **11**: 16.

Moore JC, Berlow EL, Coleman DC, de Ruiter PC, Dong Q, Hastings A, Johnson NC, McCann KS, Melville K, Morin PJ, et al. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* **7**(7): 584-600.

Morel L, Dujol B, Courtial C, Vasseur M, Leroy B, Ysnel F. 2019. Spontaneous recovery of functional diversity and rarity of ground-living spiders shed light on the conservation importance of recent woodlands. *Biodiversity and Conservation* **28**(3): 687-709.

Mueller GM, Bills GF, Foster MS, Mueller GM, Bills GF, Foster MS. 2004. *Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Muller-Landau HC. 2014. Plant diversity rooted in pathogens. *Nature* **506**(7486): 44-45.

Newton AC, Davy LM, Holden E, Silverside A, Watling R, Ward SD. 2003. Status, distribution and definition of mycologically important grasslands in Scotland. *Biological conservation* **111**(1): 11-23.

Nicotra AB, Chazdon RL, Iriarte SV. 1999. Spatial heterogeneity of light and woody seedling regeneration in tropical wet forests. *Ecology* **80**(6): 1908-1926.

Nielsen UN, Ayres E, Wall DH, Bardgett RD. 2011. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European journal of soil science* **62**(1): 105-116.

Niemela T, Renvall P, Penttila R. 1995. Interactions of fungi at late stages of wood decomposition. *Annales Botanici Fennici* **32**(3): 141-152.

Nilsson RH, Wurzbacher C, Bahram M, Coimbra VR, Larsson E, Tedersoo L, Eriksson J, Ritter CD, Svantesson S, Sánchez-García M. 2016. Top 50 most wanted fungi. *MycoKeys*(12): 29-40.

Nordén B, Larsson KH. 2000. Basidiospore dispersal in the old-growth forest fungus Phlebia centrifuga (Basidiomycetes). *Nordic Journal of Botany* **20**(2): 215-219.

Norros V, Rannik U, Hussein T, Petaja T, Vesala T, Ovaskainen O. 2014. Do small spores disperse further than large spores? *Ecology* **95**(6): 1612-1621.

Noss RF. 1990. Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology* **4**(4): 355-364.

O'Dell TE, Lodge DJ, Mueller GM 2004. Approaches to sampling macrofungi: Inventory and Monitoring Methods. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*: Elsevier academic press, 163-168.

Ostry M, Laflamme G. 2009. Fungi and diseases—natural components of healthy forests. *Botany* **87**(1): 22-25.

Ottosson E, Nordén J, Dahlberg A, Edman M, Jönsson M, Larsson K-H, Olsson J, Penttilä R, Stenlid J, Ovaskainen O. 2014. Species associations during the succession of wood-inhabiting fungal communities. *Fungal Ecology* **11**: 17-28.

Ouimette AP, Ollinger SV, Lepine LC, Stephens RB, Rowe RJ, Vadeboncoeur MA, Tumber-Davila SJ, Hobbie EA. 2020. Accounting for Carbon Flux to Mycorrhizal Fungi May Resolve Discrepancies in Forest Carbon Budgets. *Ecosystems* **23**(4): 715-729.

Packham JM, May TW, Brown MJ, Wardlaw TJ, Mills AK. 2002. Macrofungal diversity and community ecology in mature and regrowth wet eucalypt forest in Tasmania: A multivariate study. *Austral Ecology* **27**(2): 149-161.

Palfner G, Casanova-Katny MA, Read DJ. 2005. The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce Picea sitchensis (Bong.) Carr. in Northern England. *Mycorrhiza* **15**(8): 571-579.

Palmero-Iniesta M, Espelta JM, Gordillo J, Pino J. 2020. Changes in forest landscape patterns resulting from recent afforestation in Europe (1990-2012): defragmentation of pre-existing forest versus new patch proliferation. *Annals of Forest Science* **77**(2): 15.

Palo A, Ivask M, Liira J. 2013. Biodiversity composition reflects the history of ancient semi-natural woodland and forest habitats-Compilation of an indicator complex for restoration practice. *Ecological Indicators* **34**: 336-344.

Parisi F, Pioli S, Lombardi F, Fravolini G, Marchetti M, Tognetti R. 2018. Linking deadwood traits with saproxylic invertebrates and fungi in European forests - a review. *Iforest-Biogeosciences and Forestry* **11**: 423-436.

Peay KG, Garbelotto M, Bruns TD. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* **91**(12): 3631-3640.

Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* **21**(16): 4122-4136.

Pellissier L, Niculita-Hirzel H, Dubuis A, Pagni M, Guex N, Ndiribe C, Salamin N, Xenarios I, Goudet J, Sanders IR, et al. 2014. Soil fungal communities of grasslands are environmentally structured at a regional scale in the Alps. *Molecular Ecology* **23**(17): 4274-4290.

Pellissier V, Berges L, Nedeltcheva T, Schmitt MC, Avon C, Cluzeau C, Dupouey JL. 2013. Understorey plant species show long-range spatial patterns in forest patches according to distance-to-edge. *Journal of Vegetation Science* **24**(1): 9-24.

Penttila R, Junninen K, Punttila P, Siitonen J. 2013. Effects of forest restoration by fire on polypores depend strongly on time since disturbance - A case study from Finland based on a 23-year monitoring period. *Forest Ecology and management* **310**: 508-516.

Peterken G, Game M. 1984. Historical factors affecting the number and distribution of vascular plant species in the woodlands of central Lincolnshire. *The Journal of Ecology* **72**: 155-182.

Pflug EE, Buchmann N, Siegwolf RTW, Schaub M, Rigling A, Arend M. 2018. Resilient Leaf Physiological Response of European Beech (Fagus sylvatica L.) to Summer Drought and Drought Release. *Frontiers in Plant Science* **9**: 11.

Pickles BJ, Simard SW 2017. Mycorrhizal networks and forest resilience to drought. In: Johnson NC, Gehring C, Jansa J eds. *Mycorrhizal mediation of soil : fertility, structure, and carbon storage*. Amsterdam: Elsevier, 319-339.

Plećaš M, Gagić V, Janković M, Petrović-Obradović O, Kavallieratos NG, Tomanović Ž, Thies C, Tscharntke T, Ćetković A. 2014. Landscape composition and configuration influence cereal aphid–parasitoid–hyperparasitoid interactions and biological control differentially across years. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **183**: 1-10.

Plieninger T, Gaertner M, Hui C, Huntsinger L. 2013. Does land abandonment decrease species richness and abundance of plants and animals in Mediterranean pastures, arable lands and permanent croplands? *Environmental Evidence* **2**: 1-7.

Policelli N, Horton TR, Hudon AT, Patterson TR, Bhatnagar JM. 2020. Back to Roots: The Role of Ectomycorrhizal Fungi in Boreal and Temperate Forest Restoration. *Frontiers in Forests and Global Change* **3**: 15.

Ponge JF, Chevalier R. 2006. Humus Index as an indicator of forest stand and soil properties. *Forest Ecology and management* **233**(1): 165-175.

Ponge JF, Gillet S, Dubs F, Fedoroff E, Haese L, Sousa JP, Lavelle P. 2003. Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. *Soil Biology & Biochemistry* **35**(6): 813-826.

Pouska V, Svoboda M, Lepsova A. 2010. The diversity of wood-decaying fungi in relation to changing site conditions in an old-growth mountain spruce forest, Central Europe. *European Journal of Forest Research* **129**(2): 219-231.

Principe A, van der Maaten E, van der Maaten-Theunissen M, Struwe T, Wilmking M, Kreyling J. 2017. Low resistance but high resilience in growth of a major deciduous forest tree (Fagus sylvatica L.) in response to late spring frost in southern Germany. *Trees-Structure and Function* **31**(2): 743-751.

Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC, Klironomos JN. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* **40**: 699-715.

Ranius T. 2002. Osmoderma eremita as an indicator of species richness of beetles in tree hollows. *Biodiversity and Conservation* **11**(5): 931-941.

Raty M, Huhta V. 2004a. Communities of Enchytraeidae (Oligochaeta) in planted birch stands as compared with natural forests in central Finland. *Biology and Fertility of Soils* **40**(6): 413-420.

Raty M, Huhta V. 2004b. Earthworm communities in birch stands with different origin in central Finland. *Pedobiologia* **48**(3): 283-291.

Rayner ADM, Boddy L, Boddy L. 1988. *Fungal decomposition of wood : its biology and ecology*. Chichester ;: J. Wiley.

Rayner ADM, Todd NK 1980. Population and Community Structure and Dynamics of Fungi in Decaying Wood. In: Woolhouse HW ed. *Advances in Botanical Research*: Academic Press, 333-420.

Read DJ, Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New Phytologist* **157**(3): 475-492.

Regos A, Dominguez J, Gil-Tena A, Brotons L, Ninyerola M, Pons X. 2016. Rural abandoned landscapes and bird assemblages: winners and losers in the rewilding of a marginal mountain area (NW Spain). *Regional Environmental Change* **16**(1): 199-211.

Reid CPP, Kidd FA, Ekwebelam SA. 1983. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. *Plant and Soil* **71**(1-3): 415-432.

Remy E, Wuyts K, Boeckx P, Ginzburg S, Gundersen P, Demey A, Van Den Bulcke J, Van Acker J, Verheyen K. 2016. Strong gradients in nitrogen and carbon stocks at temperate forest edges. *Forest Ecology and management* **376**: 45-58.

Robertson O, Maron M, Buckley Y, McAlpine C. 2013. Incidence of competitors and landscape structure as predictors of woodland-dependent birds. *Landscape Ecology* **28**: 1975-1987.

Rochel X, Abadie J, Avon C, Bergès L, Chauchard S, Defever S, Grel A, Jeanmonod J, Leroy N, Dupouey J-L. 2017. Quelles sources cartographiques pour la définition des usages anciens du sol en France? *Revue forestière française* **69**(4-5): 353-370.

Rumberger MD, Munzenberger B, Bens O, Ehrig F, Lentzsch P, Huttl RF. 2004. Changes in diversity and storage function of ectomycorrhiza and soil organoprofile dynamics after introduction of beech into Scots pine forests. *Plant and Soil* **264**(1-2): 111-126.

Runnel K, Tamm H, Lohmus A. 2015. Surveying wood-inhabiting fungi: Most molecularly detected polypore species form fruit-bodies within short distances. *Fungal Ecology* **18**: 93-99.

Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Topel M, Jacobsson S, Larsson E. 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: A case study in Inocybe (Basidiomycota). *Bmc Evolutionary Biology* **8**: 14.

Santos-Silva C, Goncalves A, Louro R. 2011. Canopy cover influence on macrofungal richness and sporocarp production in montado ecosystems. *Agroforestry Systems* **82**(2): 149-159.

Schiestl-Aalto P, Ryhti K, Makela A, Peltoniemi M, Back J, Kulmala L. 2019. Analysis of the NSC Storage Dynamics in Tree Organs Reveals the Allocation to Belowground Symbionts in the Framework of Whole Tree Carbon Balance. *Frontiers in Forests and Global Change* **2**: 14.

Schmidt PA, Balint M, Greshake B, Bandow C, Rombke J, Schmitt I. 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology & Biochemistry* **65**: 128-132.

Schmit JP, Lodge DJ 2005. Classical methods and modern analysis for studying fungal diversity. In: Dighton J, White JF, Oudemans P eds. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem (third ed.)*: CRC Press, 193-214.

Seastedt TR. 1984. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review of Entomology* **29**: 25-46.

Sebek P, Barnouin T, Brin A, Brustel H, Dufrene M, Gosselin F, Meriguet B, Micas L, Noblecourt T, Rose O, et al. 2012. A test for assessment of saproxylic beetle biodiversity using subsets of "monitoring species". *Ecological Indicators* **20**: 304-315.

Seibold S, Bassler C, Brandl R, Gossner MM, Thorn S, Ulyshen MD, Muller J. 2015. Experimental studies of dead-wood biodiversity - A review identifying global gaps in knowledge. *Biological conservation* **191**: 139-149.

Setala H, McLean MA. 2004. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* **139**(1): 98-107.

Shorohova E, Kapitsa E. 2014. Influence of the substrate and ecosystem attributes on the decomposition rates of coarse woody debris in European boreal forests. *Forest Ecology and management* **315**: 173-184.

Sigurdson BD, Gudleifsson BE. 2013. Impact of afforestation on earthworm populations in Iceland. *Icelandic Agricultural Sciences* **26**: 21-36.

Siitonen J. 2001. Forest management, coarse woody debris and saproxylic organisms: Fennoscandian boreal forests as an example. *Ecological Bulletins* **49**: 11-41.

Siitonen J, Saaristo L. 2000. Habitat requirements and conservation of Pytho kolwensis, a beetle species of old-growth boreal forest. *Biological conservation* **94**(2): 211-220.

Simard S, Asay A, Beiler K, Bingham M, Deslippe J, He X, Philip L, Song Y, Teste F 2015. Resource transfer between plants through ectomycorrhizal fungal networks. In: Horton TR ed. *Mycorrhizal networks*. Dordrecht: Springer, 133-176.

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**(6642): 579-582.

Similä M, Kouki J, Mönkkönen M, Sippola A-L, Huhta E. 2006. Co-variation and indicators of species diversity: can richness of forest-dwelling species be predicted in northern boreal forests? *Ecological Indicators* **6**(4): 686-700.

Sitzia T, Semenzato P, Trentanovi G. 2010. Natural reforestation is changing spatial patterns of rural mountain and hill landscapes: A global overview. *Forest Ecology and management* **259**(8): 1354-1362.

Smith S, Read D, Read D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Spake R, Ezard THG, Martin PA, Newton AC, Doncaster CP. 2015. A meta-analysis of functional group responses to forest recovery outside of the tropics. *Conservation Biology* **29**(6): 1695-1703.

Spake R, van der Linde S, Newton AC, Suz LM, Bidartondo MI, Doncaster CP. 2016. Similar biodiversity of ectomycorrhizal fungi in set-aside plantations and ancient old-growth broadleaved forests. *Biological conservation* **194**: 71-79.

Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**(5): 1028-1046.

Spencer J, Kirby K. 1992. An inventory of ancient woodland for England and Wales. *Biological conservation* **62**(2): 77-93.

Spies TA, Franklin JF. 1991. The structure of natural young, mature, and old-growth Douglas-fir forests in Oregon and Washington. *Wildlife and vegetation of unmanaged Douglas-fir forests*: 91-109.

Stenlid J 2008. Population biology of forest decomposer Basidiomycetes. In: Boddy L, Frankland JC, West Pv, Boddy L, Frankland JC, West Pv, British Mycological S eds. *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. Amsterdam: Elsevier, 105-122.

Sterkenburg E, Bahr A, Durling MB, Clemmensen KE, Lindahl BD. 2015. Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *New Phytologist* **207**(4): 1145-1158.

Stiers M, Willim K, Seidel D, Ehbrecht M, Kabal M, Ammer C, Annighofer P. 2018. A quantitative comparison of the structural complexity of managed, lately unmanaged and primary European beech (Fagus sylvatica L.) forests. *Forest Ecology and management* **430**: 357-365.

Stokland JN, Siitonen J, Jonsson BG. 2012. *Biodiversity in Dead Wood*. Cambridge: Cambridge University Press.

Su NE, Jarvie S, Yan YZ, Gong XQ, Li FS, Han P, Zhang Q. 2022. Landscape context determines soil fungal diversity in a fragmented habitat. *Catena* **213**: 11.

Sutherland WJ, Bardsley S, Clout M, Depledge MH, Dicks LV, Fellman L, Fleishman E, Gibbons DW, Keim B, Lickorish F, et al. 2013. A horizon scan of global conservation issues for 2013. *Trends in Ecology & Evolution* **28**(1): 16-22.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*: Oxford University Press.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* **21**(8): 2045-2050.

Taylor AF, Finlay RD. 2003. Effects of liming and ash application on below ground ectomycorrhizal community structure in two Norway spruce forests. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* **3**: 63-76.

Taylor DL, Hollingsworth TN, McFarland JW, Lennon NJ, Nusbaum C, Ruess RW. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs* **84**(1): 3-20.

Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**(6213): 1078-+.

Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**(4): 217-263.

Teste FP, Simard SW, Durall DM, Guy RD, Jones MD, Schoonmaker AL. 2009. Access to mycorrhizal networks and roots of trees: importance for seedling survival and resource transfer. *Ecology* **90**(10): 2808-2822.

Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation* **183**: 4-18.

Tomao A, Bonet JA, Castano C, de-Miguel S. 2020. How does forest management affect fungal diversity and community composition? Current knowledge and future perspectives for the conservation of forest fungi. *Forest Ecology and management* **457**: 15.

Twieg BD, Durall DM, Simard SW. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* **176**(2): 437-447.

Tyler G. 1985. Macrofungal flora of Swedish beech forest related to soil organic matter and acidity characteristics. *Forest Ecology and management* **10**(1): 13-29.

Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, et al. 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular ecology resources* **9**(1): 51-60.

Vallauri D, Grel A, Granier E, Dupouey J-L. 2012. Les forêts de Cassini. Analyse quantitative et comparaison avec les forêts actuelles. Marseille: WWF/ INRA.

Van Den Meersschaut D, Vandekerkhove K 2000. Development of a stand-scale forest biodiversity index based on the state forest inventory. In: Hansen M, Burk T eds. *Integrated tools for natural resources inventories in the 21st century. Gen. Tech. Rep. NC-212.* St. Paul, MN: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station, 340-350.

Van Der Heijden MG, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**(3): 296-310.

van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**(4): 1406-1423.

van der Linde S, Holden E, Parkin PI, Alexander IJ, Anderson IC. 2012. Now you see it, now you don't: The challenge of detecting, monitoring and conserving ectomycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* **5**(5): 633-640.

Van Der Pijl L 1969. Ecological Dispersal Classes, Established on the Basis of the Dispersing Agents. In: van der Pijl L ed. *Principles of dispersal in higher plants*. Berlin: Springer, 19-76.

van der Wal A, Geydan TD, Kuyper TW, De Boer W. 2013. A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *Fems Microbiology Reviews* **37**(4): 477-494.

Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Menke N, Meyer P, Verschelde P. 2009. When nature takes over from man: Dead wood accumulation in previously managed oak and beech woodlands in North-western and Central Europe. *Forest Ecology and management* **258**(4): 425-435.

Vannette RL, Leopold DR, Fukami T. 2016. Forest area and connectivity influence root-associated fungal communities in a fragmented landscape. *Ecology* **97**(9): 2374-2383.

Vasutova M, Edwards-Jonasova M, Baldrian P, Cermak M, Cudlin P. 2017. Distinct environmental variables drive the community composition of mycorrhizal and saprotrophic fungi at the alpine treeline ecotone. *Fungal Ecology* **27**: 116-124.

Vasutova M, Mleczko P, Lopez-Garcia A, Macek I, Boros G, Sevcik J, Fujii S, Hackenberger D, Tuf IH, Hornung E, et al. 2019. Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **29**(5): 413-434.

Vellend M. 2010. Conceptual synthesis in community ecology. *Quarterly Review of Biology* **85**(2): 183-206.

Vieilledent G, Courbaud B, Kunstler G, Dhôte J-F, Clark JS. 2010. Individual variability in tree allometry determines light resource allocation in forest ecosystems: a hierarchical Bayesian approach. *Oecologia* **163**: 759-773.

Vilgalys R, Sun BL. 1994. Assessment of species distributions in Pleurotus based on trapping of airborne basidiospores. *Mycologia* **86**(2): 270-274.

Villeneuve N, Grandtner MM, Fortin JA. 1989. Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic macrofungi in the Laurentide Mountains of Quebec. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **67**(9): 2616-2629.

Vodka S, Cizek L. 2013. The effects of edge-interior and understorey-canopy gradients on the distribution of saproxylic beetles in a temperate lowland forest. *Forest Ecology and management* **304**: 33-41.

Watling JI, Arroyo-Rodriguez V, Pfeifer M, Baeten L, Banks-Leite C, Cisneros LM, Fang R, Hamel-Leigue AC, Lachat T, Leal IR, et al. 2020. Support for the habitat amount hypothesis from a global synthesis of species density studies. *Ecology Letters* **23**(4): 674-681.

Werner GD, Kiers ET. 2015. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist* **205**(4): 1515-1524.

Wesolowski T. 2005. Virtual conservation: How the European Union is turning a blind eye to its vanishing primeval forests. *Conservation Biology* **19**(5): 1349-1358.

Westgate MJ, Tulloch AIT, Barton PS, Pierson JC, Lindenmayer DB. 2017. Optimal taxonomic groups for biodiversity assessment: a meta-analytic approach. *Ecography* **40**(4): 539-548.

Whitman AA, Hagan JM. 2007. An index to identify late-successional forest in temperate and boreal zones. *Forest Ecology and management* **246**(2-3): 144-154.

Whittaker RH. 1969. New Concepts of Kingdoms of Organisms: Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* **163**(3863): 150-160.

Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brand TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* **300**(5620): 791-795.

Willim K, Stiers M, Annighofer P, Ammer C, Ehbrecht M, Kabal M, Stillhard J, Seidel D. 2019. Assessing Understory Complexity in Beech-dominated Forests (Fagus sylvatica L.) in Central EuropeFrom Managed to Primary Forests. *Sensors* **19**(7): 13.

Willis KJ. 2018. State of the world's fungi 2018. Report. Richmond, UK.

Winter S, Moller GC. 2008. Microhabitats in lowland beech forests as monitoring tool for nature conservation. *Forest Ecology and management* **255**(3-4): 1251-1261.

With KA, Pavuk DM, Worchuck JL, Oates RK, Fisher JL. 2002. Threshold effects of landscape structure on biological control in agroecosystems. *Ecological applications* **12**(1): 52-65.

Wolff JO, Schauber EM, Edge WD. 1997. Effects of Habitat Loss and Fragmentation on the Behavior and Demography of Gray-Tailed Voles: Efectos de la Pérdida y Fragmentación de Hábitat Sobre el Comportamiento y la Demografía de Ratones de Campo de Cola Gris. *Conservation Biology* **11**(4): 945-956.

Wu YT, Wubet T, Trogisch S, Both S, Scholten T, Bruelheide H, Buscot F. 2013. Forest Age and Plant Species Composition Determine the Soil Fungal Community Composition in a Chinese Subtropical Forest. *Plos One* **8**(6): 12.

Wuyts K, De Schrijver A, Staelens J, Gielis M, Geudens G, Verheyen K. 2008. Patterns of throughfall deposition along a transect in forest edges of silver birch and Corsican pine. *Canadian Journal of Forest Research* **38**(3): 449-461.

Yahr R, Schoch CL, Dentinger BTM. 2016. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **371**(1702): 11.

Yeates GW, Hawke MF, Rijkse WC. 2000. Changes in soil fauna and soil conditions under Pinus radiata agroforestry regimes during a 25-year tree rotation. *Biology and Fertility of Soils* **31**(5): 391-406.

Zeller L, Baumann C, Gonin P, Heidrich L, Keye C, Konrad F, Larrieu L, Meyer P, Sennhenn-Reulen H, Muller J, et al. 2022. Index of biodiversity potential (IBP) versus direct species monitoring in temperate forests. *Ecological Indicators* **136**: 15.

Zeller L, Förster A, Keye C, Meyer P, Roschak C, Ammer C. 2023. What does literature tell us about the relationship between forest structural attributes and species richness in temperate forests?–A review. *Ecological Indicators* **153**: 110383.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Balint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, et al. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* **28**(8): 1857-1862.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F. 2021. metabaR: An r package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(4): 586-592.

II. Méthodes et matériels généraux



II.1. Les forêts anciennes d'Occitanie

La région Occitanie est la deuxième plus grande région française avec une superficie de 73 360 km^2. Elle est composée de 13 départements et son paysage régional se scinde en quatre entités : le Massif Central, le massif pyrénéen, le pourtour méditerranéen et les plaines/collines de la Garonne. Cette diversité paysagère offre des contrastes climatiques avec des influences montagnarde, méditerranéenne, continentale et atlantique (Région Occitanie, 2019).

Les forêts recouvrent 2 640 000 hectares ce qui fait de l'Occitanie la deuxième région forestière française (CNPF Occitanie, 2023). Même si la couverture forestière est estimée à 36%, elle varie au sein des départements. L'Ariège est le département le plus boisé (53%). Les Pyrénées-Orientales (48%) et la Lozère (45%) suivent. Les départements les moins boisés sont le Tarn-et-Garonne et le Gers avec seulement 19% et 13% respectivement (CNPF Occitanie, 2023).

Les forêts sont essentiellement composées d'essences feuillues (77% de la surface soit 1,9 millions d'hectares) (CNPF Occitanie, 2023; ONF, 2023). Les essences feuillues sont principalement le chêne pubescent (*Quercus pubescens* - 600 000 hectares), le hêtre (*Fagus sylvatica* - 240 000 hectares) et le châtaignier (*Castanea* sp - 177 000 hectares) (CNPF Occitanie, 2023). Le reste de la surface forestière totale est occupée par des essences résineuses (CNPF Occitanie, 2023; ONF, 2023). Les essences les plus communes sont le sapin pectiné (*Abies alba* - 80 000 hectares) notamment dans la partie pyrénéenne (Aude, Ariège et Hautes-Pyrénées) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* - minimum 100 000 hectares) est essentiellement présent dans le Massif central (Lozère et Aveyron) mais aussi dans les Pyrénées. Des essences telles le douglas (*Pseudotsuga menziesii*) , pin noir (*Pinus nigra*) et l'épicéa commun (*Picea abies*) ont été introduits après la Seconde Guerre Mondiale et recouvrent des dizaines de milliers d'hectares au sud du Massif Central (CNPF Occitanie, 2023).

D'après Bergès and Dupouey (2017), seulement 1/2 de la superficie forestière actuelle était présente sur la carte de l'Etat-Major. D'après les cartes de Cassini (fin du XVIIIème siècle), la superficie totale en France était occupée par 12,6% de forêts (Vallauri *et al.*, 2012). Quant aux anciennes régions des Midi-Pyrénées et du Languedoc-Roussillon, les superficies forestières étaient de 7,4% et 5,5% respectivement. En 2012, les superficies de ces forêts anciennes ne représentaient que 4,5% et 4,2% respectivement (Vallauri *et al.*, 2012).

Durant cette thèse, nous avons centré nos études sur les forêts anciennes de plaine dans les départements du Gers, des Hautes-Pyrénées et de la Haute-Garonne. Ces forêts ont été choisies car ces départements ont déjà des couvertures forestières faibles (IGN, 2023).

II.2. Dynamique passée, actuelle et future du hêtre dans le Sud-Ouest en France

Le hêtre (*Fagus sylvatica*) est une espèce arborescente importante des forêts européennes et française (E Silva, 2010) (Figure 15). Avec sa longue durée de vie, le hêtre est considéré comme une des rares dryades en Europe. En effet, le hêtre est une espèce sciaphile de fin de succession écologique traduisant un climax des milieux forestiers (Walbott, 2018). En Europe de l'Ouest, en contexte de plaine, la limite de répartition du hêtre se situe dans le sud-ouest de la France. En France, le hêtre est aussi présent dans les zones montagnes jusqu'à 1700m d'altitude (Ozenda, 1985). L'espèce peut s'établir dans des endroits plus méridionaux mais uniquement en altitude comme dans les montagnes de Montseny en Espagne (Penuelas & Boada, 2003; E Silva, 2010). Néanmoins, la limite précise de l'aire potentielle de l'espèce dans le sud-ouest n'est pas sûre (E Silva, 2010). La gestion forestière influencerait la répartition du hêtre dans cette région (Comps, 1972; E Silva, 2010) au point qu'il est impossible de savoir la répartition exacte du hêtre sous notre climat actuel (Comps, 1972). Les conclusions de Comps (1972) illustraient déjà la dominance du chêne pédonculé (*Quercus robur*) et du chêne pubescent (*Quercus pubescens*) dans les forêts du sud-ouest en France. Le hêtre s'implantait aux abords du piémont pyrénéen et sur les versants nord adaptés à ces besoins. Ses travaux montrent déjà les vestiges de pseudo-hêtraies qui prennent la forme de bosquets, de petits bois et des peuplements de hêtre pur. Les gestionnaires forestiers ont longtemps délaissé le hêtre face à des espèces plus productives (le châtaignier et le pin) ou ayant une valeur économique plus importante (le chêne) (Bolte *et al.*, 2007; Leuschner *et al.*, 2009). Des études en Europe Centrale et de l'Ouest ont montré qu'en absence de gestion forestière, le hêtre pouvait recoloniser des forêts dominées par le chêne (Lemee, 1990; Vera, 2000).

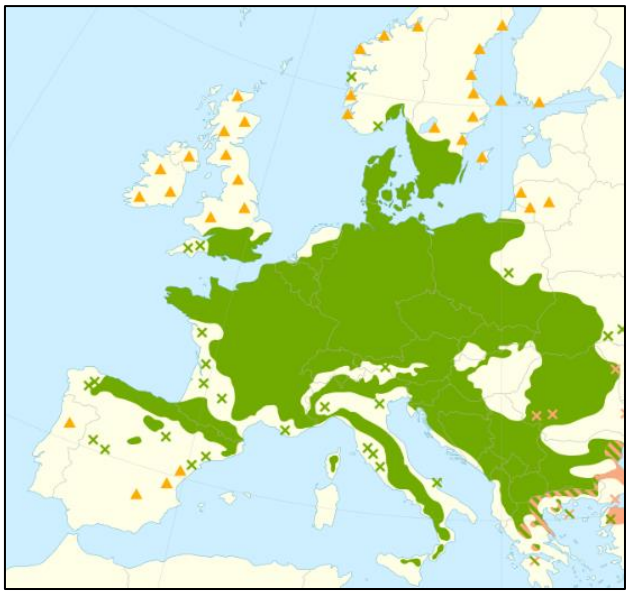


Figure 15- Répartition actuelle du hêtre (Fagus sylvatica) en Europe Centrale et de l'Ouest. Les triangles oranges correspondent aux populations introduites et naturalisées (Source : EUFORGEN (2023))

L'espèce étant une espèce mésophile, elle serait davantage sensible aux changements climatiques (Cheaib *et al.*, 2012) en raison d'un déficit hydrique estival (E Silva, 2010) et les températures hivernales (Seynave *et al.*, 2008). Les températures hivernales deviendraient trop douces ce qui empêcheraient la levée de dormance des faînes (Walbott, 2018). Piedallu *et al.* (2009) ont modélisé les conséquences du changement climatique sur la répartition du hêtre en France selon les scenarii A2 et B2 du GIEC entre 2010-2040, 2040-2070 et 2070-2100 (Figure 16). Le scénario A2 est le plus pessimiste en prédisant une croissance exponentielle de concentration en gaz à effet de serre. Le scénario B2 est une approche intermédiaire avec une vision de durabilité environnementale locale (IPCC, 2007). Leurs résultats ont montré que les surfaces favorables au hêtre entre les périodes 1961-1990 et 2011-2040 sont divisées par deux. A la fin du XXIème siècle, les surfaces propices au hêtre auront diminué de 80 à 93%. Les hêtraies de plaine seraient les plus impactées par les changements climatiques et ce dès le milieu du XXIème siècle. Uniquement les zones montagneuses seraient épargnées des changements climatiques d'ici la fin du XXIème siècle avec le scénario A2. Il apparaîtrait même des zones forestières en montagne à plus haute altitude qu'actuellement qui permettraient l'établissement du hêtre grâce à des conditions écologiques favorables suite aux changements climatiques. Cependant, ces zones restent marginales (Piedallu *et al.*, 2009). Toutefois, même si ces modélisations se basent la distribution actuelle des peuplements, elles ne prennent pas en compte l'influence passée des activités anthropiques sur les peuplements actuels.

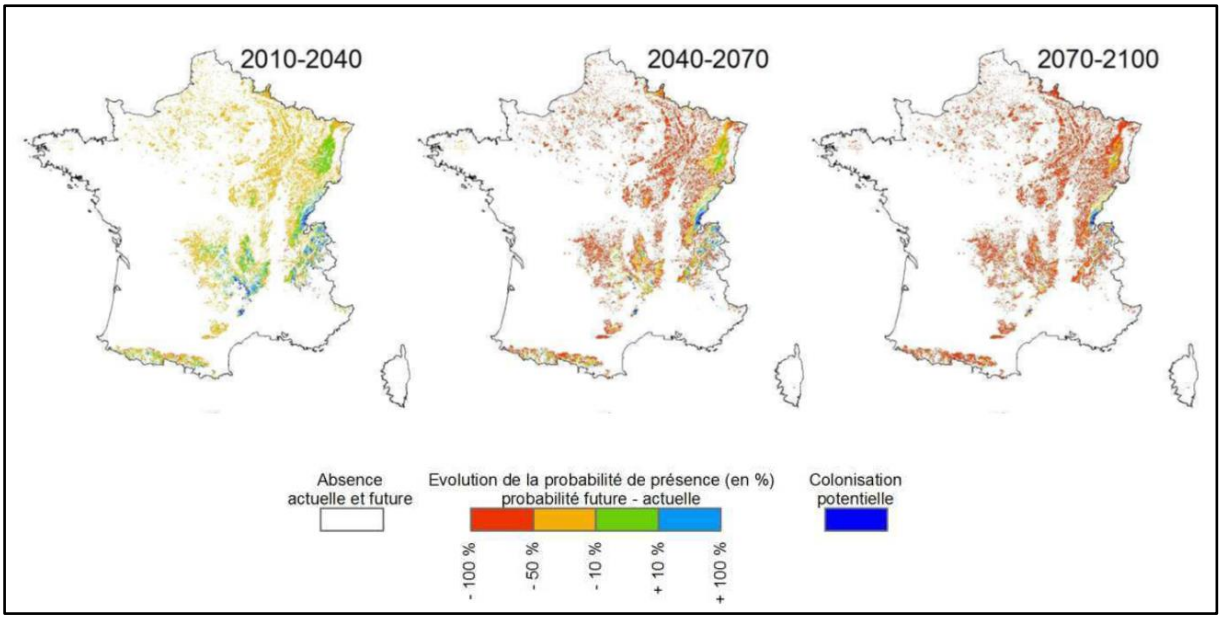


Figure 16- Evolution prévisible de la distribution possible du hêtre entre 1961-1990 et les périodes 2010-2040, 2040-2070, et 2070-2100 (GCM HadCM3-A2). Corine Land Cover 2006 a permis d'estimer les surfaces forestières (Source : Piedallu et al. (2009))

II.2. Sélection des parcelles

Le choix des parcelles à inventorier s'est basé sur un ensemble de parcelles inventoriées dans le cadre d'un projet sur les vieilles forêts (Savoie *et al.*, 2011; Savoie *et al.*, 2015; Gouix *et al.*, 2019). La liste de départ comprenait 257 placettes réparties en 187 sites forestiers. Par la suite, le choix des sites s'est fait en prenant en compte la décorrélation entre le nombre de taches et la superficie des forêts anciennes dans un buffer (ou zone tampon) de 1km de rayon (soit 314ha) . Le rayon d'un km fut choisi selon les conclusions de Mennicken *et al.* (2020). Les variations d'espèces fongiques notamment pour les MOTUs fongiques saprotrophes et symbiotrophes sont mieux expliquées par une structure paysagère définie par un rayon supérieur à 500m. Ces opérations ont été faites sur ArcGIS 10.8.1 (ESRI, 2020). L'obtention de la couche de forêts anciennes a été possible grâce à la digitalisation des minutes 1 : 40 000 de la carte d'Etat-Major et l'emploi du plug in Historical map de QGIS (Favre *et al.*, 2013; Herrault *et al.*, 2015; Karasiak *et al.*, 2016). Cette couche nous renseigne sur l'état forestier au XIXème siècle. Il a été observé que les conséquences des activités anthropiques sur les communautés fongiques du sol perdurent pendant plusieurs siècles après leurs arrêts (Diedhiou *et al.*, 2009; Boeraeve *et al.*, 2018; Mennicken *et al.*, 2020). Afin d'affiner la sélection des parcelles, nous avons contrôlé le type de station forestière échantillonnée et équilibré le stade de maturité des peuplements. Le stade de maturité des peuplements prenait en compte le nombre et la disposition de très très gros bois vivants, de très gros bois vivants et de bois morts (Gouix *et al.,* 2019). Au total, 46 parcelles « *hêtraie-chênaie sessiflore* » furent échantillonnées de novembre à mi-décembre 2020. Pour le volet 3, nous avons veillé à la non-superposition des buffers pour garantir l'indépendance statistique de nos observations. Parmi les parcelles échantillonnées, 41 et 43 parcelles furent sélectionnées pour les analyses pour les volets 3 et 5 respectivement (Figure 17).

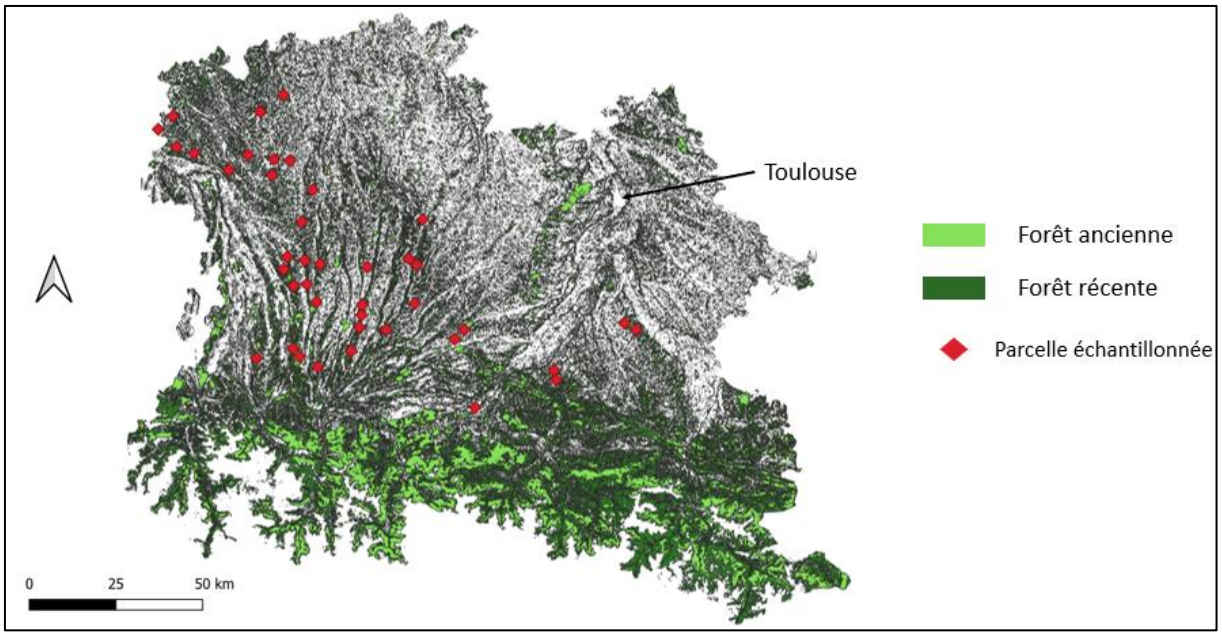


Figure 17- Localisation des sites d'échantillonnage ayant servi pour les volets 3 et 5

Pour le volet 4, le choix des parcelles forestières a été pensé avec le Parc Naturel Régional des Pyrénées Ariégeoises dans le cadre de leur projet LIFE intégré ARTISAN (Accroître la Résilience des Territoires au changement climatique par l'Incitation aux Solutions d'Adaptation fondées sur la Nature) (Figure 18). Préalablement, le Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées avait effectué des inventaires mycologiques dans ces forêts (Hannoire & Corriol, 2021). L'objectif principal était d'avoir des paires de sites (forêt ancienne et récente) du même village . Il a été démontré que les forêts anciennes et récentes n'ont pas les mêmes espèces mycorhiziennes (Boeraeve *et al.*, 2018; Correia *et al.*, 2021) et les espèces mycorhiziennes n'ont pas le même effet bénéfique sur la croissance de la plantule (Ahangar *et al.*, 2012). Le choix des parcelles manquantes a été fait avec l'outil Géoportail en utilisant les cartes de l'Etat-major. Les parcelles furent échantillonnées en automne 2021.

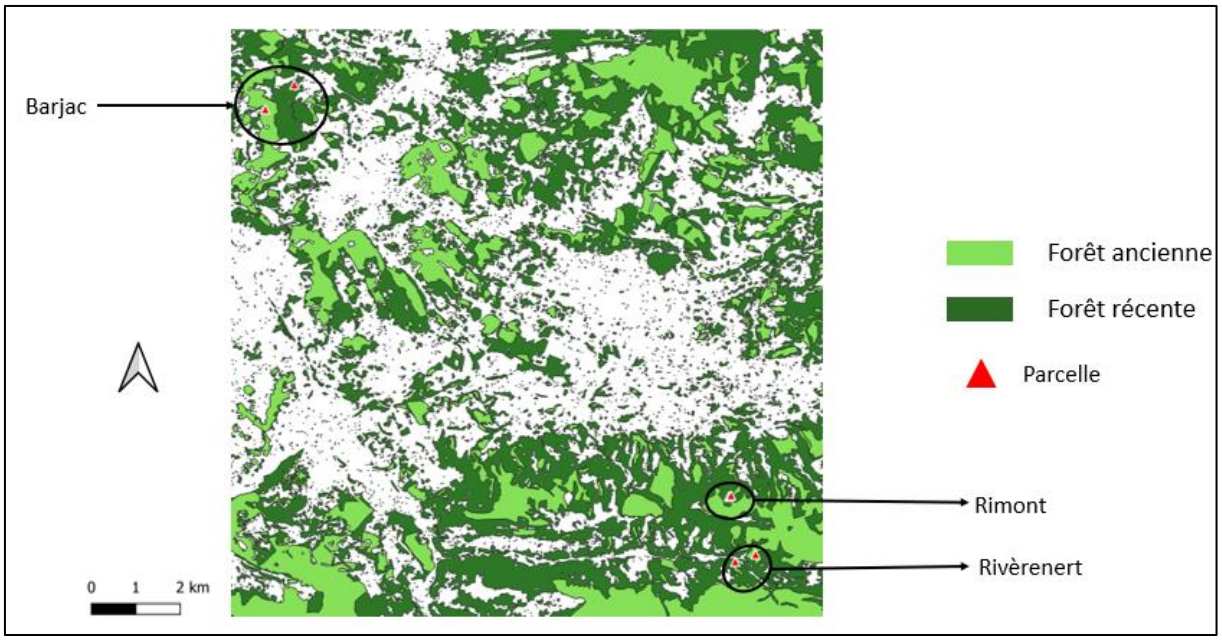


Figure 18- Localisation des parcelles forestières pour le volet 4

II.3. Description des peuplements forestiers échantillonnés

Durant l'été 2022, Thomas Nivet, stagiaire de M1, a étudié la structure forestière des parcelles matures et non matures. La surface des parcelles était de 1ha et les parcelles ont été évaluées circulairement. Il a été décidé de sélectionner les extrémités du gradient de maturité à cause des contraintes temporels du stage. Les parcelles matures étaient au nombre de 15 et les parcelles non matures étaient au nombre de 14.

En général, les parcelles non matures présentent des surfaces terrières plus faibles et plus variables que les parcelles matures. La mesure de la surface terrière a été faite par un tour d'horizon relascopique. La surface terrière mesure le volume occupé par les arbres et se mesure à 1,30 m de hauteur. Dans les peuplements non matures, les surfaces terrières totales sont comprises entre 9 et 34,5 m²/ha (moyenne : 22,75 m²/ha). Alors que dans les peuplements matures, les valeurs oscillaient entre 11 et 32,5 m²/ha (moyenne : 24,83 m²/ha). Même si la surface terrière semble variable entre les peuplements non matures et matures, il n'y a pas de différence significative (p-value : 0,4201). Pour chaque parcelle, le diamètre des arbres qui avaient une surface terrière supérieure ou égale 0,5 m²/ha a été mesuré. Le diamètre moyen des arbres était significativement plus important dans les peuplements matures (moyenne : 50 cm ; min : 33,35 cm ; max : 63,45 cm) que dans les peuplements non matures (moyenne : 42,36 cm ; min : 35,65 cm ; max :52,80 cm).

Dans les parcelles non matures, le nombre moyen de chênes était de 14 (min : 5 ; max : 35) et le nombre moyen de hêtres était de 8 (min : 1 ; max : 21). La surface terrière moyenne du chêne était de 11,85 m²/ha (min : 3,50 m²/ha ; max : 28 m²/ha) alors que la surface terrière moyenne du hêtre

était de 6,92 m²/ha (min : 0,50 m²/ha ; max : 18,50 m²/ha). Dans les parcelles matures, la moyenne de chênes était de 10 (min : 1 ; max : 22) et la moyenne de hêtres était de 15 (min : 4 ; max : 25). La surface terrière moyenne du hêtre (moyenne : 13,37 m²/ha ; min : 3 m²/ha ; max : 21,5 m²/ha) était plus forte que celle du chêne (moyenne : 8,5 m²/ha ; min : 1 m²/ha ; max : 19,5 m²/ha). Dans les forêts non matures, le diamètre moyen du chêne (moyenne : 50,88 m² ; min : 36,40 m² ; max : 67,80 m²) était supérieur à celui du hêtre (moyenne : 46,97 m² ; min : 19,90 m² ; max : 72,56 m²).

II.4. Echantillonnage du sol et traitement

L'échantillonnage a été fait à l'échelle d'un hectare (Figure 19). Chaque carotte de sol était collectée par une pelle à partir des 10 premiers centimètres de profondeur de sol incluant l'horizon A mais en retirant les plus gros débris de la litière. Entre chaque prélèvement de sol, un faux prélèvement était effectué afin d'enlever les débris du point d'échantillonnage précédent dans un rayon de 1m (Donald *et al.*, 2021). La pelle était rincée à l'éthanol et l'eau distillée entre chaque site d'échantillonnage. Au final, 16 échantillons composites du sol ont été prélevés par site. Le jour même au laboratoire, 15g de chaque échantillon composite ont été mis dans des sachets de thé propres et séchés avec 50g de gel de silice. Le gel de silice était changé tous les deux jours jusqu'à ce que l'échantillon soit sec. Ce type de prélèvement permet de faire un échantillonnage exhaustif des communautés du sol, et de produire des données de diversité pour les champignons mycorhiziens. En répliquant localement l'échantillonnage, les biais liés aux fausses exclusions sont réduits.

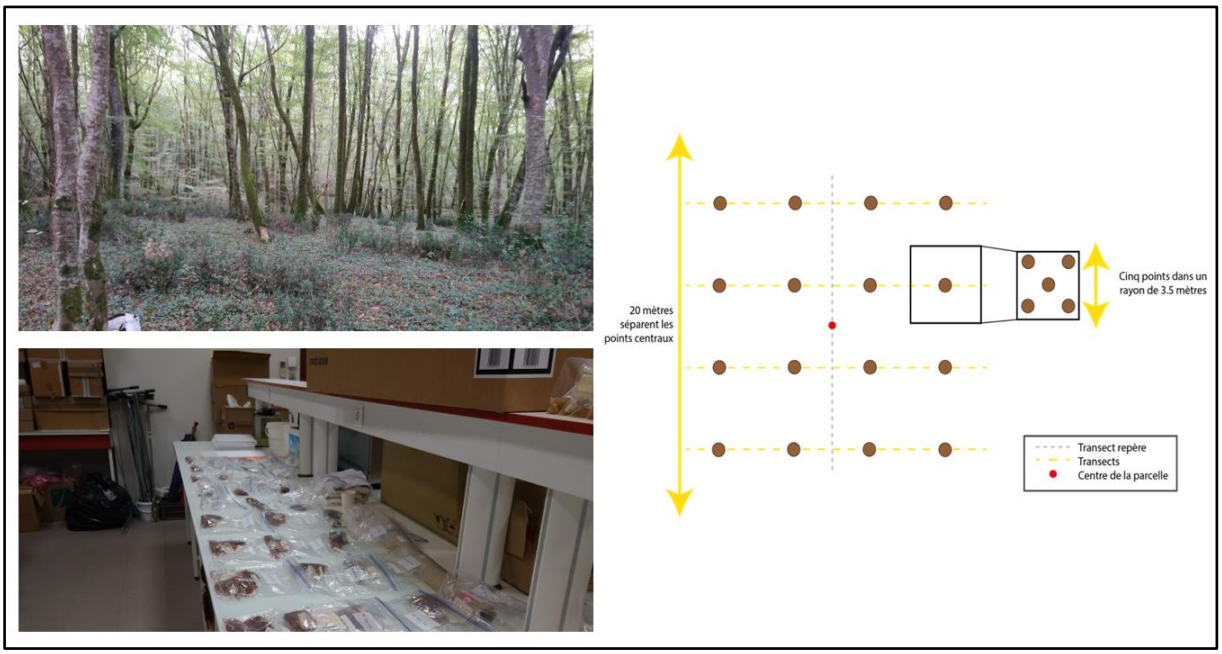


Figure 19- Dispositif expérimental d'échantillonnage du sol

L'ADN du sol a été extrait des échantillons secs (environ 15g de sol) entre fin janvier et mi-mars 2021 et en janvier 2022 avec le kit Macherey Nagel NucleoSpin R Soil (Réf. 740780.250). Néanmoins, avant de pouvoir émettre des conclusions écologiquement fiables, il a été nécessaire de traiter minutieusement les données issues de l'ADNe (Calderon-Sanou *et al.*, 2020) (Figure 20). Le protocole est similaire à Mennicken *et al.* (2020). Les amplifications ont ciblé les amorces d'ADNr nucléaires ITS1 (FWD : 18.S GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (Epp *et al.*, 2012)) et une version modifiée de Rev : 5.8S CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTK (Taberlet *et al.*, 2018). Chaque PCR a été faite avec un ensemble unique d'amorces, définies par un ensemble unique de 8 marqueurs nucléotidiques ajoutés aux amorces universelles. Cette préparation permet de repérer les séquences d'échantillons comme décrit dans Taberlet *et al.* (2018). Des témoins négatifs sans réactifs de PCR ont été pris en compte (représentant environ 6% de nos réactions). Toutes les réactions de PCR ont été dupliquées avec à chaque fois des paires d'amorces distinctes. Chaque réplicat avait sa propre PCR. Les conditions de PCR étaient similaires à celles de Nagati *et al.* (2018). Toutes les réactions de PCR ont été regroupées pour préparer une bibliothèque Illumina- Miseq. Il était possible de repérer les réplicats et les échantillons séquencés dans la bibliothèque avec l'emploi de 8 marqueurs nucléotidiques. Enfin la bibliothèque a été envoyée à l'entreprise Fasteris pour un séquençage dans deux directions de deux fois 250 paires de bases.

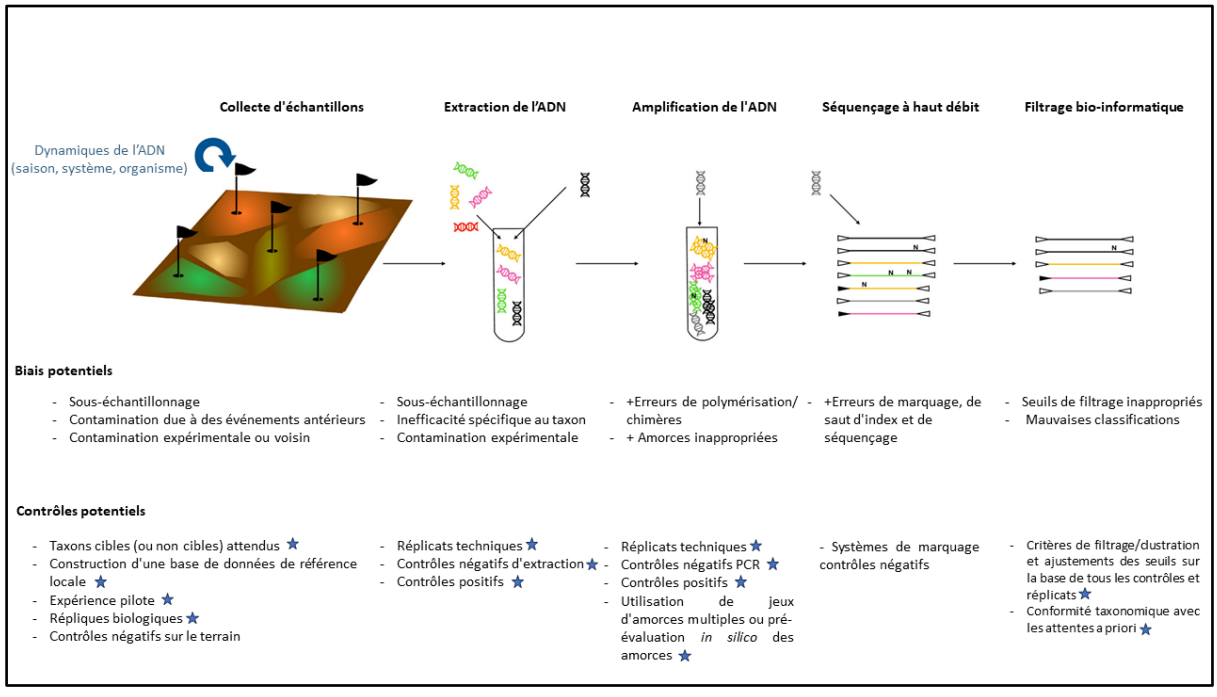


Figure 20- Résumé des différentes sources de contamination et protection à mettre en œuvre. Les étoiles bleues indiquent les contrôles effectués (Modifié de Zinger et al. (2019))

L'analyse bio-informatique a été réalisée durant l'hiver 2022 avec les OBITools (Boyer *et al.*, 2016). L'utilisation de pipelines et d'outils bio-informatique permettent de traiter ces données et de les corriger (Zinger *et al.*, 2021). Le traitement des séquences a consisté à :

- Un alignement des « reads » afin d'obtenir des séquences complètes (Paired – end read pairing) ;
- La vérification des qualités des séquences (FASTQ) et d'alignement (longueur supérieure à 60 bp pour les champignons par exemple) ;
- Le rassemblement des séquences identiques, l'élimination des singletons ;
- Une attribution des séquences aux échantillons (Demultiplexing) ;
- Un calcul de la similarité entre séquence, cherchant à attribuer un nom de cluster à 97% (Clustering) à chaque séquence, permettant le passage de la séquence unique au regroupement par MOTU ;
- Une suppression des séquences sur-représentées dans les témoins négatifs et de potentiels contaminants ;
- Une assignation à la séquence ou au groupe de séquences les plus similaires, d'après la comparaison à Genbank par la fonction ecotag des obitools ;
- Une suppression des séquences non assignées aux champignons (sur la base d'un minimum de 60% de similarité aux bases de données).

A l'aide des bases de données FUNGuild (Nguyen *et al.*, 2016) et Fungaltraits (Flores-Moreno *et al.*, 2019), il a été possible d'assigner pour une majorité de MOTUs un rang taxonomique, un régime alimentaire et des informations fonctionnelles sur la croissance. Une fois les étapes de vérification faites, il est par la suite possible d'étudier la diversité des communautés avec les nombres de Hill, une approche conseillée par Alberdi and Gilbert (2019).

Pour étudier le fonctionnement des écosystèmes (Cardinale *et al.*, 2002) ou déterminer l'étendue de la niche d'une espèce (Forister *et al.*, 2015), il est nécessaire de calculer divers indices de diversité. En écologie moléculaire pour calculer la diversité, les nombres de Hill ont deux avantages (i) l'interprétation de la mesure et son unité de mesure sont toujours identiques (Tuomisto, 2010 ; Chao *et al.*, 2014) et (ii) la sensibilité aux espèces rares peut être modifiée par un paramètre q nommé « ordre » de diversité (Alberdi & Gilbert, 2019) (Figure 21). Plus la valeur q est grande, plus les espèces rares sont négligées vis-à-vis des espèces abondantes (Alberdi & Gilbert, 2019).

$$ {}^{q}D = \left(\sum_{i=1}^{S} p_i^q \right)^{1/(1-q)} = \left({}^{q}\lambda \right)^{1/(1-q)}, q \neq 1 $$

Figure 21-Equation proposée par Hill (1973) pour calculer les nombres de Hill (source : Alberdi & Gilbert (2019)) où S correspond à la richesse spécifique, i est une espèce du milieu d'étude, p_i est l'abondance relative d'une espèce et q est le paramètre

Il est possible de calculer les indices de diversité alpha, beta et gamma avec les nombres de Hill selon les équations proposées par Jost (2007), Chao *et al.* (2012) et Chiu *et al.* (2014) (Figure 22). Dans notre cas, nos études se sont basées sur la diversité alpha.

Alpha

$$ {}^{q}D_{\alpha} = \frac{1}{N} \left\{ \sum_{i=1}^{S} \sum_{j=1}^{N} \left(w_j p_{ij} \right)^q \right\}^{1/(1-q)} $$

Gamma

$$ {}^{q}D_{\gamma} = \left\{ \sum_{i=1}^{S} \left(\sum_{j=1}^{N} w_j p_{ij} \right)^q \right\}^{1/(1-q)} $$

Beta

$$ {}^{q}D_{\beta} = {}^{q}D_{\gamma} / {}^{q}D_{\alpha} $$

Figure 22- Equations basées sur les nombres de Hill permettant de calculer différents ordres de diversité (source : Alberdi & Gilbert (2019)) où S est le nombre de MOTU, i désigne chaque MOTU, N est le nombre de sous-systèmes (échantillons), j correspond à chaque sous-système, wj est le poids relatif du sous-système j et pi est l'abondance relative du MOTU i.

II.5. Autres analyses communes aux trois axes

Différentes données ont été récupérées afin de décrire les caractéristiques écologiques des parcelles. La première catégorie de données récupérées concerne les sols dominants dans les zones d'études avec le site Géoportail (2023). Les données proviennent de « l'Inventaire, Gestion et Conservation des Sols (IGCS) - volet Référentiels Régionaux Pédologiques (RRP) ». Les sols dominants étaient des brunisols, calcosols, colluviosols, luvisols et néoluvisols. Ces données ne furent pas utilisées dans nos études.

Une fois les parcelles sélectionnées, les données climatiques furent extraites des bases de données de WorldClim (Fick & Hijmans, 2017) à une résolution spatiale 30 secondes (environ 1 km^2). Les variables extraites dérivent des données mensuelles de température et de pluviométrie afin d'être adaptées biologiquement. Les variables bioclimatiques décrivent les tendances annuelles (ex : température ou précipitations annuelles), la saisonnalité (ex : amplitude annuelle de la température et des précipitations) et des facteurs environnementaux particuliers (ex : température du mois le plus froid et chaud). Il a été décidé de ne pas prendre en compte les variables climatiques dans les

différents modèles utilisés dans les prochains chapitres car elles ne ressortaient pas significatives dans les analyses. La résolution spatiale n'étant pas assez précise, les valeurs différaient peu entre les parcelles échantillonnées.

Pour chaque point d'échantillonnage, cinq carottes de sol de 10 cm de profondeur ont été prélevées (mélangeant l'horizon A et une partie de l'horizon B) dans un rayon de 3,5 m et regroupées dans un échantillon composite. Les analyses physico-chimiques du sol ont été faites sur les échantillons composites de terre fine après un tamisage à 2mm dans plusieurs laboratoires, car les données ont été générées dans le cadre de différents projets : laboratoire d'analyse des sols d'INRAE à Arras, le Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (LEFE) à Toulouse et le laboratoire Géosciences Environnement Toulouse (GET). Pour chaque parcelle échantillonnée, les mesures suivantes ont été faites :

- Distribution granulométrique (NF ISO 13320) sur les échantillons composites des sols ;
- Teneur en carbone total et organique (NF ISO 10694) sur les échantillons composites des sols, des horizons A et B ;
- Teneur en azote total (NF ISO 13878) sur les échantillons composites des sols, des horizons A et B ;
- Teneur en pH (H2O) et pH (KCl) (NF ISO 10390) sur les échantillons composites des sols, des horizons A et B ;
- Teneur en phosphore par la méthode Olsen (NF ISO 10304) sur les échantillons composites des sols ;
- Teneur en éléments grossiers (ISO 13320) sur les échantillons composites des sols ;
- La capacité d'échange cationique avec les teneurs en cations échangeables (Ca, K, Mg, Na, Si) sur les échantillons composites des sols.

Références

Ahangar MA, Dar GH, Bhat ZA. 2012. Growth response and nutrient uptake of blue pine (Pinus wallichiana) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions. *Annals of Forest Research* **55**(2): 217-227.

Alberdi A, Gilbert MTP. 2019. A guide to the application of Hill numbers to DNA-based diversity analyses. *Molecular ecology resources* **19**(4): 804-817.

Bergès L, Dupouey J-L. 2017. Écologie historique et ancienneté de l'état boisé: concepts, avancées et perspectives de la recherche. *Revue forestière française* **69**: 297-318.

Boeraeve M, Honnay O, Mullens N, Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Thomaes A, Jacquemyn H. 2018. The impact of spatial isolation and local habitat conditions on colonization of recent forest stands by ectomycorrhizal fungi. *Forest Ecology and management* **429**: 84-92.

Bolte A, Czajkowski T, Kompa T. 2007. The north-eastern distribution range of European beech - a review. *Forestry* **80**(4): 413-429.

Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources* **16**(1): 176-182.

Calderon-Sanou I, Munkemuller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W. 2020. From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices? *Journal of biogeography* **47**(1): 193-206.

Cardinale BJ, Palmer MA, Collins SL. 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**(6870): 426-429.

Chao A, Chiu C-H, Jost L. 2014. Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* **45**: 297-324.

Chao A, Chiu CH, Hsieh TC. 2012. Proposing a resolution to debates on diversity partitioning. *Ecology* **93**(9): 2037-2051.

Cheaib A, Badeau V, Boe J, Chuine I, Delire C, Dufrene E, Francois C, Gritti ES, Legay M, Page C, et al. 2012. Climate change impacts on tree ranges: model intercomparison facilitates understanding and quantification of uncertainty. *Ecology Letters* **15**(6): 533-544.

Chiu CH, Jost L, Chao A. 2014. Phylogenetic beta diversity, similarity, and differentiation measures based on Hill numbers. *Ecological Monographs* **84**(1): 21-44.

CNPF Occitanie 2023. Les forêts occitanes.

Comps B. 1972. *Essai sur le déterminisme écologique du Hêtre (Fagus sylvatica L.) en Aquitaine.* PhD, Université de Bordeaux 1 Bordeaux.

Correia M, Espelta JM, Morillo JA, Pino J, Rodriguez-Echeverria S. 2021. Land-use history alters the diversity, community composition and interaction networks of ectomycorrhizal fungi in beech forests. *Journal of ecology* **109**(8): 2856-2870.

Diedhiou AG, Dupouey JL, Buee M, Dambrine E, Laut L, Garbaye J. 2009. Response of ectomycorrhizal communities to past Roman occupation in an oak forest. *Soil Biology & Biochemistry* **41**(10): 2206-2213.

Donald J, Murienne J, Chave J, Iribar A, Louisanna E, Manzi S, Roy M, Tao SL, Orivel J, Schimann H, et al. 2021. Multi-taxa environmental DNA inventories reveal distinct taxonomic and functional diversity in urban tropical forest fragments. *Global Ecology and Conservation* **29**: 13.

E Silva D. 2010. *Ecologie du hêtre (Fagus sylvatica L) en marge sud-ouest de son aire de distribution.* PhD, Nancy-Université Nancy.

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP, Haile J, Esposito A, Riaz T, Erseus C, Gusarov VI, Edwards ME, Johnsen A, et al. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* **21**(8): 1821-1833.

ESRI 2020. Release 10.8. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.

EUFORGEN 2023. *Fagus sylvatica*.

Favre C, Grel A, Granier E, Cosserat-Mangeot R, Bachacou J, Dupouey J 2013. Digitalisation des cartes anciennes. Manuel pour la vectorisation de l'usage des sols et le géoréférencement des minutes 1: 40000 de la carte d'Etat-Major. v. 12.7. 3: INRA Nancy.

Fick SE, Hijmans RJ. 2017. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*.

Forister ML, Novotny V, Panorska AK, Baje L, Basset Y, Butterill PT, Cizek L, Coley PD, Dem F, Diniz IR, et al. 2015. The global distribution of diet breadth in insect herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(2): 442-447.

Géoportail 2023. Carte.

Gouix N, Savoie JM, Bouteloup R, Corriol G, Cuypers T, Hannoire C, Infante Sanchez M, Maillé S, Marc D. 2019. Inventaire et caractérisation des noyaux de « vieilles forêts de plaine » Pour une continuité de la trame forestière entre Pyrénées et Massif-Central. Rapport final: Conservatoire d'espaces naturels Midi-Pyrénées / Ecole d'ingénieurs de Purpan.

Hannoire C, Corriol G. 2021. Etude mycologique de 6 forêts témoins du réseau du PNR Pyrénées ariégeoises (Barjac, Camarade, Montgauch, Rimont, Rivèrenert , Sainte-Croix-Volvestre) – Etude 2020-2021: Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées (CBNPMP).

Herrault P-A, Sheeren D, Fauvel M, Paegelow M. 2015. Vectorisation automatique des forêts dans les minutes de la carte d'état-major du 19e siècle. *Revue internationale de géomatique* **25**(1): 35-51.

Hill MO. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**(2): 427-432.

IGN 2023. La surface forestière.

IPCC. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. Geneva, Switzerland: IPCC.

Jost L. 2007. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* **88**(10): 2427-2439.

Karasiak N, Dereclenne A-C, Herrault PA, Fauvel M, Ladet S, Sheeren D 2016. Historical Map: un plug-in expérimental QGIS pour la vectorisation de l'occupation des sols dans les minutes de la carte d'État-Major datant du 19ème siècle. *Journée technique INRA en géo-informatique*. 14 p.

Lemee G. 1990. Les réserves biologiques de la Tillaie et du Gros-Fouteau en forêt de Fontainebleau, écocomplexes climaciques. *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques* **137**(1): 47-62.

Leuschner C, Kockemann B, Buschmann H. 2009. Abundance, niche breadth, and niche occupation of Central European tree species in the centre and at the margin of their distribution range. *Forest Ecology and management* **258**(7): 1248-1259.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of past and present-day landscape structure on forest soil microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 118.

Nagati M, Roy M, Manzi S, Richard F, Desrochers A, Gardes M, Bergeron Y. 2018. Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal forest. *Plant and Soil* **432**(1-2): 345-357.

ONF 2023. Les forêts occitanes, un potentiel à révéler.

Ozenda P. 1985. *La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen*: Masson Paris.

Penuelas J, Boada M. 2003. A global change-induced biome shift in the Montseny mountains (NE Spain). *Global Change Biology* **9**(2): 131-140.

Piedallu C, Perez V, Gégout J-C, Lebourgeois FF, Bertrand R. 2009. Impact potentiel du changement climatique sur la distribution de l'Epicéa, du Sapin, du Hêtre et du Chêne sessile en France. *Revue forestière française* **61**(6): 567-593.

Région Occitanie. 2019. Programme régional de la forêt et du bois Région Occitanie 2019 – 2029.

Savoie J, Bartoli M, Brin A, Brustel H, Corriol G, Hannoire C, Harrel M, Larrieu L, Sarthou V, Valladares L. 2011. Forêts pyrénéennes anciennes de Midi-Pyrénées. Rapport d'Etude de la phase 1 du projet FEDER 2008-2011: Ecole d'Ingénieurs de PURPAN/DREAL Midi-Pyrénées.

Savoie J, Bartoli M, Brin A, Brustel H, Corriol G, Hannoire C, Harrel M, Larrieu L, Sarthou V, Valladares L. 2015. Vieilles forêts pyrénéennes de Midi-Pyrénées. Deuxième phase. Évaluation et cartographie des sites. Recommendations. Rapport final: Ecole d'Ingénieurs de PURPAN.

Seynave I, Gegout JC, Herve JC, Dhote JF. 2008. Is the spatial distribution of European beech (Fagus sylvatica L.) limited by its potential height growth? *Journal of biogeography* **35**(10): 1851-1862.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*: Oxford University Press.

Tuomisto H. 2010. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* **33**(1): 2-22.

Vallauri D, Grel A, Granier E, Dupouey J-L. 2012. Les forêts de Cassini. Analyse quantitative et comparaison avec les forêts actuelles. Marseille: WWF/ INRA.

Vera FWM 2000. Grazing ecology and forest history. Wallingford, Oxon ;: CABI Pub.

Walbott M. 2018. *Rôles des facteurs locaux dans la distribution et la persistance des communautés à hêtre (Fagus sylvatica) en marge d'aire de répartition.* PhD, Université de Bordeaux Talence.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Balint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, et al. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* **28**(8): 1857-1862.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F. 2021. metabaR: An r package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(4): 586-592.

III. Comment la fragmentation et la quantité d'habitats influencent les communautés fongiques du sol en forêts anciennes ?



Préambule

Le but de ce chapitre est de contribuer à une meilleure connaissance de l'influence du paysage sur les communautés fongiques des forêts anciennes. De façon plus précise, il vise à observer comment la proportion et le nombre de taches de forêts anciennes dans le paysage influencent les communautés fongiques.

La décorrélation entre la quantité et le nombre d'habitats en forêts anciennes a été possible. Cependant, lors de l'analyse des résultats, la proportion de forêts anciennes était fortement corrélée positivement à la proportion de forêts totales dans le buffer d'un km de rayon. Plusieurs modèles ont été faits afin de prendre en compte ou non cette corrélation. Dans le cas où le meilleur modèle avait comme variables explicatives la proportion de forêts anciennes et récentes dans le paysage, il a été décidé de ne pas l'interpréter dans la partie discussion.

Cette étude avait été présentée sous la forme d'un poster en octobre 2021 lors des Rencontres d'Ecologie des Paysages à Rennes. Par la suite, l'étude a été présentée oralement lors de l'ACFAS (Association Canadienne Crançaise pour l'Avancement des Sciences) en mai 2022, les Journées Jean Chevaugeon en septembre 2022 et à la British Society Ecology en décembre 2022. Ce chapitre a été soumis à la revue *Landscape Ecology* début juillet 2024. L'article a été publié et est en libre accès depuis le 8 février 2024.

Influence of ancient forest habitat fragmentation and habitat amount on soil fungal communities

Alexandre Raimbault[1,2], Antoine Brin[1,2], Sophie Manzi[3], Jean Marie Savoie[1,2], Laure Gandois[4], Priscia Oliva[5], Océane Fogliani[8], Coralie Roy – Camille[1,6], Léonie Gratacap[2] et Mélanie Roy[6,7,8]

[1]Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Université de Toulouse, Toulouse, France

[2]DYNAFOR, INRAE, Castanet-Tolosan, France

[3]IPBS, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[4]LEFE, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[5]GET, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, IRD, Toulouse, France

[6]EDB, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[7]IRL IFAECI Instituto Franco-Argentino para el Estudio del Clima y sus Impactos, CNRS, CONICET, UBA, IRD, Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina

[8]Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue (UQAT), Rouyn-Noranda, Canada

Abstract

Fungi represent a large part of soil biodiversity as well as an essential role for tree hydromineral nutrition, survival, and carbon cycling. While their local diversity has proven to be shaped by abiotic and biotic factors related to soil, climate and vegetation, their response to landscape fragmentation is still debated. In this paper, we focus on ancient forests characterized by the presence of beech at low elevation, a habitat particularly fragmented in South-West France. We aim to assess the effect of past and present forest fragmentation and quantity on soil fungal and functional group diversity. We expect a negative impact of fragmentation and a positive effect of forest quantity on soil fungal diversity, in addition to an influence of local soil factors. Soils from 41 1-ha ancient forest plots across South-West France were sampled along gradients of past and present forest fragmentation and quantity, before their fungal diversity was characterized by metabarcoding of environmental DNA. Hill numbers have been computed and applied to all fungi, trophic guilds, and growth forms. We find that past forest fragmentation negatively impacts on soil fungal diversity and in particular for symbiotrophs, while the present forest quantity has a positive impact. In contrast, the species richness of pathotrophic fungi shows a negative correlation with past forest fragmentation. The diversity of fungal groups with lower dispersal abilities (e.g., corticioid, microfungi) is negatively impacted by past forest fragmentation, while the diversity of wind-dispersed fungi (e.g., agaricoid) is not influenced by any landscape descriptors. Our results show the complexity of fungal responses to past and present forest fragmentation and demonstrate the long-lasting effect of past fragmentation as well as the positive impact of recent forest quantity in the landscape on fungal diversity associated with ancient forest soils. Our study also highlights the huge diversity of fungi unraveled by eDNA

metabarcoding in this habitat, and the potential of such techniques to study the landscape ecology of soil communities.

III.1. Introduction

Forest biodiversity suffers from several anthropogenic pressures including deforestation and intensive management that lead to habitat loss and fragmentation (Curtis et al. 2018; Haddad et al. 2015). Habitat fragmentation is defined as the breaking apart of a large continuous area into several smaller patches (Fahrig 2003). Positive and negative effects of habitat fragmentation have been observed on biodiversity, with these contrasting findings contributing to an intense debate in landscape ecology (Fahrig et al. 2019; Fletcher et al. 2018). This debate demonstrates the importance of properly disentangling the influence of habitat loss from the influence of fragmentation per se (Fahrig 2003, 2017). Indeed, in real-word landscapes, those drivers are often intertwined, making it difficult to tease apart their respective effects (Didham et al. 2012). Patch size and isolation have long been used as predictors of fragmentation, until Fahrig (2013) challenged the classical view of patch as a natural unit for species population and communities and formulated the Habitat Amount Hypothesis (HAH). It postulates that the effects of patch size and isolation on species density could both be encompassed in the effects of the amount of habitat present in the landscape. Since then, several studies have tested this hypothesis and the HAH for various groups of organisms including plants, birds, arthropods, and mammals (Martin 2018; Watling et al. 2020). It has therefore been suggested that the HAH should be used as a baseline of habitat loss effects, above which fragmentation effects should be contrasted to assess its importance in driving species diversity (Martin 2018).

Fungi represent a major part of terrestrial diversity, are present worldwide and play major roles in ecosystem functioning (Aslani et al. 2022). While their diversity patterns at local scale are partly explained by climate, soil, plant communities, and disturbances such as fire (Tedersoo et al. 2014), knowledge about the influence of landscape factors are still scarce (Mony et al. 2020). Grilli et al. (2017) suggest that fragmentation has negative effects on fungal diversity, with important magnitude variations according to the trophic guild. For instance, ectomycorrhizal fungi (symbionts with trees) and saproxylic fungi (dead wood dwelling species) were found to be sensitive to habitat fragmentation while pathogenic fungi were not (Boeraeve et al. 2019; Grilli et al. 2017). The question remains as to whether fungal groups with potentially lower dispersal abilities (such as gasteroid ones, like truffles, and corticioid fungi as suggested by Harrington et al. (2021)) would be more sensitive to landscape fragmentation. Indeed, dispersal limitations have predominantly been described for populations at scales larger than the landscape (circa 100 km, Douhan et al. 2011).

In European forest ecosystems, considering the effect of present and past fragmentation is particularly important, since forest fragmentation level is known to have been higher 150 years ago (Cateau et al. 2015; Hermy and Verheyen 2007). Forests remnants presently defined as ancient are still visible although often surrounded by recent forest patches (Dupouey et al. 2002a; Vallauri et al. 2012). Ancient vs. recent above-ground forest differences may however be hidden by recent transformation (e.g., logging, plantation). Nevertheless, beech is often present and major differences have been observed in specific lichen (Fritz et al. 2008), beetles (Assmann 1999; Desender et al. 1999), vascular plants (Hermy et al. 1999) and springtails species (Ponge et al. 2006). These organisms share common traits such as a low dispersal capacity and high sensibility to habitat stability. Moreover, ancient forests soils show a lower pH and higher organic matter content (Dupouey et al. 2002b, Berges and Dupouey 2021).

A few studies have evidenced the impact of present/past forest fragmentation on fungal - in particular ectomycorrhizal - communities associated with ancient forests as well as the effect of habitat quantity in the landscape (Hofmeister et al. 2014; Mennicken et al. 2020, Boeraeve et al. 2018a). These pioneering studies highlight the need to further investigate the effect of past and present forest fragmentation on fungal diversity as well as taxonomical and functional groups, in particular symbiotrophic fungi. Recently, the use of environmental DNA metabarcoding (Taberlet et al. 2018) has promoted the study of complex fungal communities and even their functional diversity, through the use of taxonomical databases (Nguyen et al. 2016; Põlme et al. 2020). However, soil metabarcoding remains biased in estimating the response of diversity, because of possible overestimation of rare species and real abundances. The use of Hill numbers (Hill, 1973) has been recommended to overcome this bias for plant and fungal eDNA (Calderon-Sanou et al. 2020). It therefore provides an analytical framework to study the response of soil diversity to landscape fragmentation through environmental metabarcoding.

Our study compares the response of soil fungal diversity associated with ancient forests to past and present fragmentation, while controlling for the quantity of surrounding forests in the landscape. We focused our study in the lowlands of South-West France, where fragmentation of ancient forests is particularly high (Vallauri et al. 2012). Moreover, soil variables are important drivers of fungal communities (Tedersoo et al. 2014) and may explain part of the variation in diversity. We therefore hypothesize that: (1) fungal diversity would be negatively correlated with the number of forest patches (i.e., forest fragmentation); (2) fungal and in particular symbiotroph diversity would be positively correlated with the quantity of forest in the landscape and (3) fungi with low dispersal abilities would show a stronger response to fragmentation as compared to wind-dispersed fungi.

III.2. Material and Methods

III.2.1. Plot selection and measurement of forest fragmentation and quantity

The choice of plots used for the study was based on a regional inventory in South-West France of 257 plots within 187 ancient lowland forest sites (Gouix et al. 2019; Savoie et al. 2011, 2015). From this inventory, 50 plots of a unique habitat (*Fagus sylvatica* and *Quercus petraea* forest) were identified using an *a priori* analysis to avoid the autocorrelation between the fragmentation (number of patches of ancient forests) and the area of ancient forests in a buffer zone of one km radius (Figure 23). The buffer zone is a fixed surface around a given patch of habitat (i.e., 314 ha), defined based on a previous study of fungal communities (Mennicken et al. 2020). An ancient forest GIS layer was obtained by digitizing the 1:40,000 minutes of the Ordnance survey map using QGIS Historical map plug-in (Favre et al. 2013; Herrault et al. 2015; Karasiak et al. 2016). The past fragmentation and ancient forest quantity were retrieved from ancient forest maps, while present forest fragmentation and quantity were obtained from IGN-BD Topo edition 2019 (https://geoservices.ign.fr/bdtopo). The lack of autocorrelation between present fragmentation and forest quantity was also checked (Figure S1). All spatial analysis was performed using ArcGIS 10.8.1 (ESRI 2020). Additionally, we ensured no overlap of buffers to ensure statistical observation independence. From the initial subset of plots, 41 were selected, covering a total of 707,780 ha (Figure S2; N 43.4311°, E 0.5723°). Site position is provided in the associated DRYAD Archive (https://doi.org/10.5061/dryad.gmsbcc2tg; to be released upon publication).

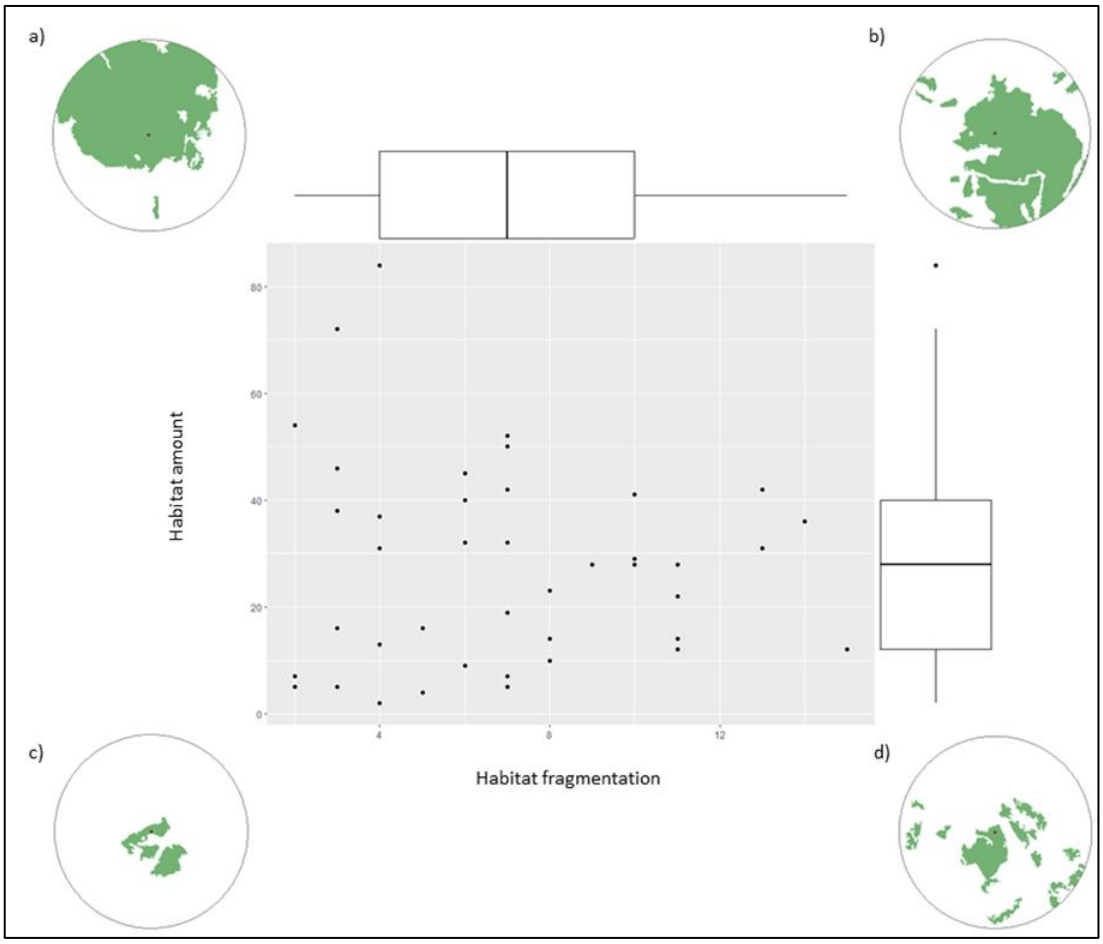


Figure 23-Distribution of sampled sites according to the number of patches and the proportion of ancient forest in the 1km buffer. The boxplots show the distribution of values for the number of patches (habitat fragmentation) and the quantity of ancient forest in the buffer (habitat amount). Different landscape structures illustrating extremes in the amount and fragmentation of ancient forest in a buffer zone are presented: (a) high proportion of ancient forest and low fragmentation of ancient forest, (b) high proportion of ancient forests and high fragmentation of ancient forest, (c) low proportion of ancient forest and low fragmentation of ancient forest and (d) low proportion of ancient forest and high fragmentation of ancient forest.

III.2.2. Soil fungal eDNA sampling

Each ancient forest plot was centered on the 1 ha - inventories from Gouix et al. (2019). Within each plot, 16 sampling points were positioned every 20 m (Figure S3) following recommendations of Donald et al. (2021) for soil eDNA sampling. For each sample point, five 10-cm depth soil cores were taken (mixing horizon A and part of horizon B) in a radius of 3.5 m and pooled in a composite sample. Rocks, large roots, litter, and organic debris were removed at the collecting step. After sampling each forest patch, the shovel was cleaned with 2% bleach to reduce cross-contamination by eDNA. Within each patch the shovel was dipped in soil near the next sampling point to avoid carrying soil debris from a point to another (Donald et al. 2021). All composite soil samples (c. 100g/sampling point) were stored on ice for a maximum of 12h. The samples were subsequently homogenized, and 15g from each composite soil sample were transferred to a tea bag

mesh surrounded by 45g of silica gel in a clean Ziploc bag using a clean plastic spoon. The silica gel was replaced every 24h to ensure a rapid and complete drying at room temperature in the field. The dry samples were then stored until DNA extraction. The leftovers of the composite soil sample were pooled at the plot level and fully air-dried for further chemical analyses. In addition, c. 100g of separated samples of horizon A and horizon B (10cm depth) were collected at the center of the plot for chemical analyses.

III.2.3. Molecular biology and sequencing

The DNA extraction was achieved using a Macherey-Nagel NucleoSpin R Soil kit (Allentown, Pennsylvania, USA) following Mennicken et al. (2020) and targeted the soil environmental DNA. Negative controls (one/series) were included and the extraction resulted in 100uL of DNA solution, stored at -20°C. Amplifications targeted the fungal ITS1 (Fwd: ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG from Epp et al. (2012) and a modified version of Rev: 5.8S_Fungi CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTK, Taberlet et al. 2018). For each PCR, a unique set of primers composed of eight nucleotide markers was used to differentiate the different samples during bioinformatic processing (Taberlet et al. 2018). Negative and positive PCR controls were included, and each PCR was done twice with a different pair of tagged - primers. Empty wells were included in each PCR plate to keep unused tag-combination and evaluate possible tag-jumps (Negative sequencing controls). The PCR protocol follows Mennicken et al. (2020). The use of eight-nucleotide tags located in 5´ position of each primer and their unique combination (in Forward and Reverse) for each PCR made it possible to pool all reactions and prepare a unique library. The sequencing was performed by Fasteris company (Life Science Genesupport SA, Plan-les-Ouates, Switzerland), in 2*250 bp using the Miseq V3 technology.

II.2.4. Bioinformatics

The raw sequences (fastq for R1 and R2 sequences) were received after quality checks and analyzed with OBItools (Boyer et al. 2016) on the GenoToul cluster (Toulouse, France). The quality filters enabled the removal of sequences unaligned between the R1 and R2 files, sequences shorter than 60 nucleotides and having a qphred score below 50. The bioinformatic analyses was identical to Mennicken et al. (2020), except for the taxonomic identification step requiring an updated reference database. Following recommended practices for the analysis of fungal communities, the Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) were defined using the "sumaclust" clustering function (Mercier et al. 2013) with a threshold value of 97% (Nilsson et al. 2008). Taxonomic identification of MOTUs was done using the ecotag function (Boyer et al. 2016), comparing our sequences through a global alignment among GenBank reference sequences (Benson et al. 2012). As a result, our sequences were assigned to a putative species as well as a genus, family, and order based on the Genbank taxonomy. The metabaR package (Zinger et al. 2021) was used to detect potential

contaminants from our dataset, and non-fungi sequences as well as sequences over-represented in our negative controls were removed. Finally, from taxonomic identification, fungal guilds and growth forms were assigned to each MOTUs recognized at the species or genus level using the FUNGUILD database (Nguyen et al. 2016). Raw sequences are all deposited in the DRYAD Archive (https://doi.org/10.5061/dryad.gmsbcc2tg; to be released upon publication).

III.2.5. Soils analysis

The following parameters were characterized in the LEFE laboratory (Toulouse, France) on the soil composite fine fraction (<2mm): particle size distribution (NF ISO 13320), total and organic carbon content (NF ISO 10694), total nitrogen content (NF ISO 13878), pH (H2O), pH (KCl) (NF ISO 10390) and phosphorus content (Olsen method, EN ISO 10304). Coarse element contents were also quantified (ISO 13320). The cation exchange capacity (CEC) and exchangeable cations contents (Ca, K, Mg, Na, Si) were also measured on the same size fraction (GET, Toulouse, France). The CEC was measured after determining the excess of cobaltihexamine ions in the exchange solution by spectrocolorimetry after 2h stirring (Aran et al., 2008). The determination of exchangeable cations (for Ca, Na, Mg and K) was carried out by ICP-OES. The samples collected from horizon A and B were only measured for pH (H2O), pH (KCl), organic carbon and total nitrogen content. All parameters were included in further statistical analysis.

III.2.6. Statistical analysis on fungal diversity

All statistical analysis were performed with RStudio 4.1.0 software (R Core Team 2021). The sample coverage was calculated for each plot (Hsieh et al. 2016) to check if our sample coverage was sufficient and comparable between sites.

To describe the diversity at the plot level, Hill numbers (Hill 1973) were calculated using the hillR package (Li 2018) for different q values. The larger the q value, the less contribution rare species have (Alberdi and Gilbert 2019). We used three values for q: q=0 (specific richness), q=1 (Shannon's index) and q=2 (inverse of Simpson's index).

To integrate the effect of soil properties (26 variables) in our models, a principal component analysis was carried out and the three principal axis were extracted using FactoMineR (Le et al. 2008) package. To check for collinearity among the landscape variables, a Spearman coefficient with a Bonferroni correction was used from corrplot and Hmisc packages (Harrell 2023; Taiyun and Viliam 2021).

To test the effects of forest quantity and fragmentation on alpha diversity (q=0, 1 and 2) of all soil fungi, fungal guilds (symbiotroph, pathotroph, saprotroph), and contrasted growth forms (gasteroid, agaricoid, corticioid, microfungi), linear models were tested through the lme4 package (Bates et al. 2015). All input variables were first standardized, and each model was adapted to comply with linear model conditions (normality and heteroscedasticity of residuals). All models included the first 3 PCA axes related to soil variability as co-variables. To deal with the correlation between ancient and present forest quantity, we built a set of models with or without those variables, to test for the significance of their relationship with each response variable. The first model considered the quantity of ancient forest in the landscape. The second model considered the quantity of present forest. The third model included the quantity of both ancient and present forest. In the last model, neither the quantity of ancient nor present forest were incorporated. The final models therefore do not include correlated variables. For each diversity index-fungal group combination, the best model (among the four candidate models) was selected using the AICcmodavg package (Mazerolle 2020). When the delta AICc between different models was < 2, we computed model-average estimates and the 95% confidence interval for parameters appearing in selected models (Mazerolle 2006). Effect size of each factor for a given model was extracted and represented using effectsize package (Ben-Shachar et al. 2020). Spatial autocorrelation was finally checked for each model using the linear model and the DHARMa package (Hartig 2022).

III.3. Results

III.3.1. Taxonomic and functional characterization of soil fungal diversity

In total, 23,456,299 sequences pass the quality filters, resulting in 5,134 fungal MOTUs clustered at 97% of identity. The species richness averages 1239 MOTUs per site (845< >1897) and the number of sequences per site averages 572,105 reads (211,117< >1,011,713). The average sample coverage per site is 0.89 (0.85< >0.91) indicating a high sampling coverage of fungal communities. The identification of trophic guilds was possible for 61.5% MOTUs and 81.6% reads (Figure 24a and b), revealing the dominance of symbiotrophic fungi in reads and MOTUs (Cortinariaceae, Russulaceae, Inocybaceae and Thelephoraceae, Figure S4). Finally, the most abundant growth forms are agaricoid, corticioid, gasteroid and microfungi (37% MOTUs, 60% reads, Figure 24c and d).

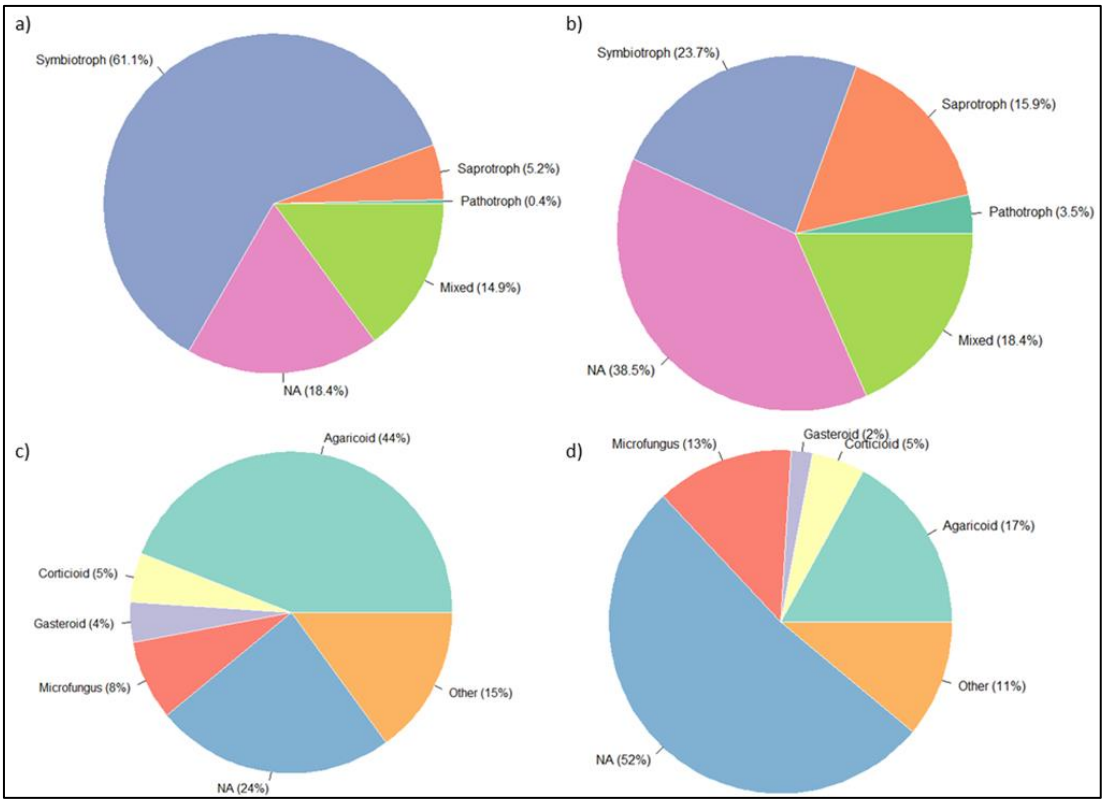


Figure 24- Pie charts showing a, c) the distribution of MOTUs according to read counts and b, d) to the number of MOTUs. For the trophic guild (a,b), the "Mixed" class includes different combinations of trophic guilds. The "Not assigned" class contains MOTUs to which no trophic guild could be assigned for lack of taxonomic or functional information. For the growth form (c,d), the "Other" category includes different combinations of growth mode and other types of growth mode. The "Not assigned" category contains MOTUs to which no growth mode could be assigned due to the lack of taxonomic and functional information.

III.3.2. Site characteristics and selection of co-variables

The landscape is described through its fragmentation (number of patches in the buffer) and the habitat amount (quantity in the buffer). On average, 7 ancient forest patches are present in each buffer zone (2<>15), and ancient forest covers 28% of the surface (2<>84%). Considering the present forest, on average 7 patches are present per buffer zone (1<>14), and the present forest covers in average 47% of the surface (9<>93%).

Soil parameters are synthesized in the form of a PCA (Figure S5a and b) whose three first dimensions explained 59.6% of sites variability. The first axis is driven by pH, C/N and P Olsen; the second one by percentage of carbon and coarse material and the third one by percentage of Si, K, and CEC (Table S1). For all models, no significant spatial correlation in residuals was found.

III.3.3. Responses of the soil fungal diversity

Our results show that forest fragmentation has a significant negative effect on the diversity of the whole community, independently from the weight given to rare species (for q=0, 1, 2; Figure 25; Table 1). However, this effect is detected only for past forest fragmentation. The same models show a

significant positive effect of present forest quantity in the landscape (for q=0, 1, 2; Figure 25; Tableau 1). The significant and positive effect of PCA axis 1 on the three levels of q evidences the importance of soil pH, P – Olsen and C/N ratio for soil fungal diversity. Present fragmentation is always included in the best model, but never shows a significant effect on soil fungal diversity. Past fragmentation, present forest quantity and PCA axis 1 show a similar effect size, considered as medium for the three q values (Figure 25; Tableau 1).

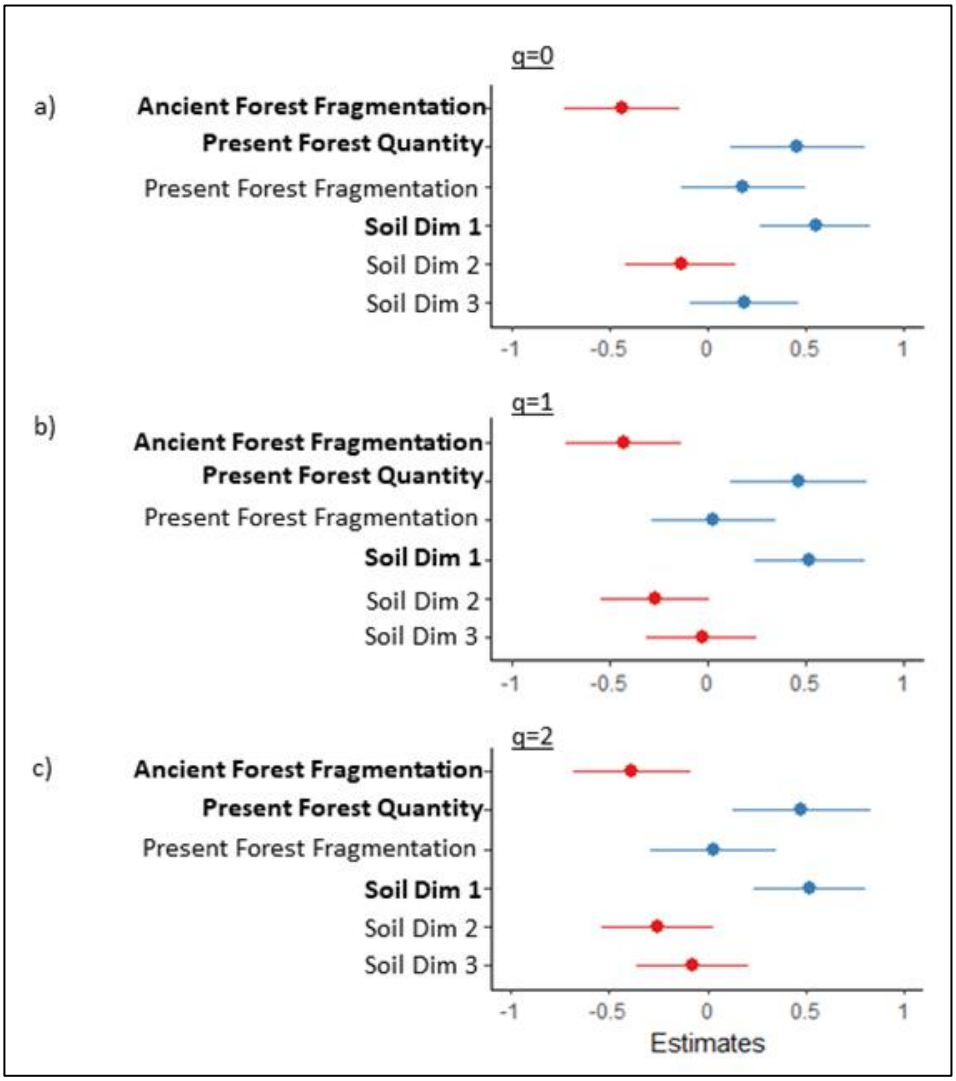


Figure 25- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the diversity (q=0, 1 and 2) of all fungi. Red error bars indicate a negative effect, blue ones a positive effect. Explanatory variables written in bold have a significant effect.

Tableau 1- Results of linear regressions for all fungi and each trophic guild and for the three Hill number (species richness, q=0; Shannon index q=1; inverse of Simpson index, q=2). For each explanatory variables, estimates are in brackets and the 95% confidence interval in square brackets.

	Hill number	R2 adj	Ancient forest fragmentation	Present forest fragmentation	Ancient forest quantity	Present forest quantity	Soil Dim 1	Soil Dim 2	Soil Dim 3
All fungi	q=0	0.33	**(-82.75) ; [-138.61 , -26.88]**	(34.28) ; [-25.69 , 94.26]		**(86.91) ; [21.25 , 152.58]**	**(104.64) ; [51.61, 157.68]**	(-26.28) ; [-79.22, 26.66]	(35.32) ; [-17.63, 88.26]
	q=1	0.30	**(-11.93) ; [-21.2 , -2.66]**	(0.85) ; [-9.1 , 10.8]		**(14.8) ; [3.9 , 25.68]**	**(16.04) ; [7.24 , 24.84]**	(-7.84) ; [-16.62, 0.94]	(-2.44) ; [-11.22 , 6.34]
	q=2	0.32	**(-7.33) ; [-12.33 , -2.33]**	(0.46) ; [-4.91 , 5.83]		**(7.82) ; [1.94 , 13.7]**	**(8.84) ; [4.09 , 13.6]**	(-4.55) ; [-9.29 , 0.19]	(-0.5) ; [-5.24 , 4.24]
Pathotrophs	q=0	0.09	**(-3.77) ; [-7.01 , -0.53]**	(-0.47) ; [-3.54 , 2.61]			(0.15) ; [-2.92 , 3.22]	(-0.17) ; [-3.27 , 2.94]	**(3.54) ; [0.37 , 6.71]**
	q=1	-0.07	(-0.4) ; [-2.28 , 1.49]	(-0.98) ; [-2.96 , 0.99]		(-1.5) ; [-3.72 , 0.72]	(-0.02) ; [-1.81 , 1.77]	(0.3) ; [-1.48 , 2.09]	(-0.32) ; [-2.11, 1.48]
	q=2	-0.10	(-0.24) ; [-1.61 , 1.12]	(-0.5) ; [-1.89 , 0.88]		(-0.85) ; [-2.49 , 0.78]	(-0.05) ; [-1.34 , 1.25]	(0.16) ; [-1.14 , 1.46]	(-0.37) ; [-1.68 , 0.94]
Saprotrophs	q=0	0.10	(-10.43) ; [-21.13 , 0.26]	(0.83) ; [-10.58, 12.25]	(7.17) ; [-4.13 , 18.46]	(10.04) ; [-2.37 , 22.46]	**(11.27) ; [1.11 , 21.43]**	(0.71) ; [-9.4 , 10.82]	(5.73) ; [-4.4 , 15.86]
	q=1	NA	(-0.02) ; [-0.16 , 0.12]	(-0.05) ; [-0.18 , 0.08]			(-0.07) ; [-0.20 , 0.06]	(0.07) ; [-0.07 , 0.20]	(0.06) ; [-0.07 , 0.19]
	q=2	NA	(-0.05) ; [-0.21 , 0.12]	(-0.03) ; [-0.18 , 0.12]			(-0.08) ; [-0.23 , 0.07]	(0.05) ; [-0.11 , 0.21]	(0.11) ; [-0.04 , 0.27]
Symbiotrophs	q=0	0.43	**(-16.30) ; [-31.05 , -1.56]**	(14.35) ; [-1.48 , 30.18]		**(24.28) ; [6.95 , 41.61]**	**(36.95) ; [23.00 , 51.00]**	(-10.89) ; [-24.86 , 3.09]	(8.90) ; [-5.08 , 22.87]
	q=1	0.41	(-4.43) ; [-8.94 , 0.08]	(0.6) ; [-3.96 , 5.15]	(-4.3) ; [-12.06 , 3.46]	**(7.71) ; [0.58 , 14.85]**	**(10.41) ; [6.39 , 14.43]**	**(-5.59) ; [-9.61 , -1.58]**	(-0.71) ; [-4.72 , 3.31]
	q=2	0.33	**(-2.97) ; [-5.90 , -0.04]**	(0.30) ; [-2.85 , 3.44]		**(3.89) ; [0.44 , 7.33]**	**(5.81) ; [3.03 , 8.59]**	**(-3.45) ; [-6.22 , -0.67]**	(0.24) ; [-2.54 , 3.01]

III.3.4. Responses of the different fungal guilds

The diversity of symbiotrophs is also negatively impacted by past fragmentation and positively influenced by forest quantity (Figure 26a and b; Tableau 1) and the first axis of the PCA (driven by pH, C/N, P Olsen), i.e., following the fungal diversity pattern except for q=1. However, the effect size for PCA axis 1 is higher (0.68) as compared to the effect of landscape factors (Figure 26a and b; Tableau 1). By contrast, only the species richness of pathotrophs is negatively correlated with ancient forest fragmentation (q=0 only, Figure 26c, Tableau 1), and not significantly shaped by the present forest quantity. Pathotroph species richness (q=0) is also positively influenced by the soil PCA third dimension (i.e., CEC, Si and K concentration), while the saprotroph species richness (q=0) is significantly shaped by the first dimension of the soil PCA, as are all fungi and in particular symbiotroph diversity (Tableau 1). Effect sizes for pathotroph species richness show that forest fragmentation and PCA Axis 3 have similar small to medium effects (average of -0.38 and 0.36 respectively; Figure 26c). Again, for all trophic modes and orders of q, present fragmentation never shows a significant effect on soil fungal diversity but remains included in best models. Ancient and total forest quantity are often removed from best models for pathotrophs and saprotrophs (Tableau 1).

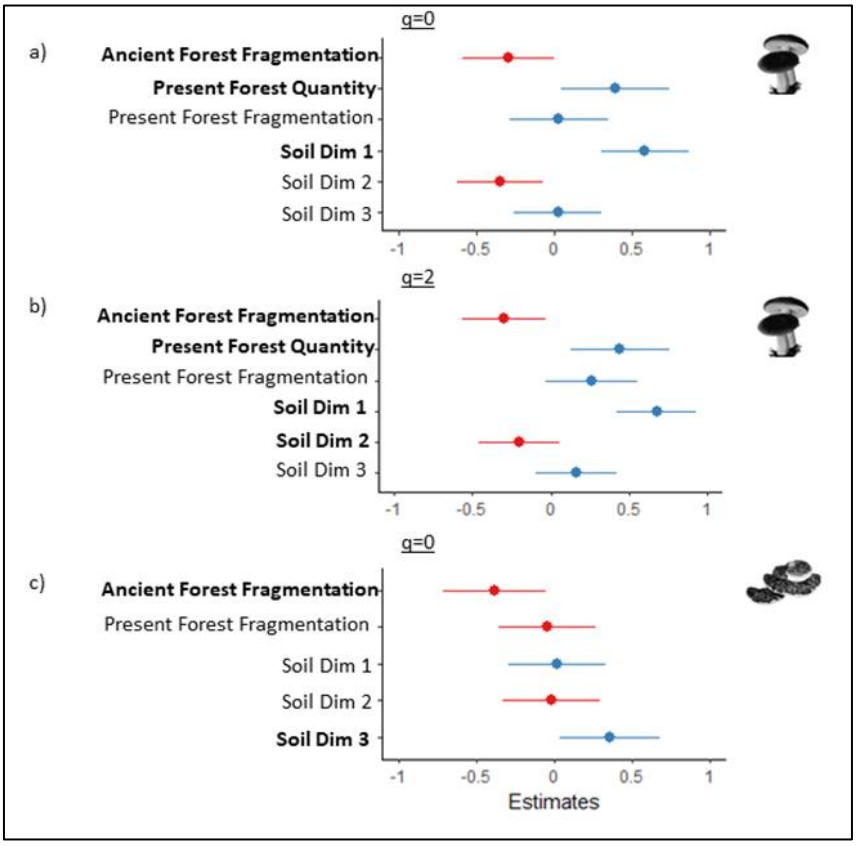


Figure 26- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the diversity of symbiotrophic (q=0 and 2, a and b respectively) and pathotrophic fungi (q=0, c). Red error bars indicate a negative effect, blue ones a positive effect. Explanatory variables written in bold have a significant effect.

III.3.5. Responses of the different fungal growth forms

Our results show that forest fragmentation has a negative effect only on the species richness (q=0) of growth forms associated with a possibly limited dispersal (corticoid, gasteroid, microfungi, Figure 27, Tableau 2). Again, only past forest fragmentation has a negative effect on the diversity of these growth forms and present fragmentation was never significant although included in best models. However, past fragmentation is positively correlated with the diversity of most abundant corticioids (q=1 and 2, Tableau 2). Agaricoid diversity and corticioid species richness (q=0, Figure 27a and b) are also significantly correlated with the present forest quantity (q=1 only). Only for gasteroids do, both ancient and present forest quantity have a positive effect on species richness (Tableau 2, Figure 27c). The first soil PCA axis has a significant effect on all growth forms diversity and q levels (except gasteroid q=0). In most cases, this effect is positive, except for microfungi (Figure 27d, Tableau 2). Additionally, the soil PCA second axis (mostly % of coarse material and C in composite samples and horizons) is negatively correlated with agaricoid and corticioid diversities. Agaricoid diversity is also positively correlated with the soil PCA third axis (driven by CEC, Si and K concentrations). Effect sizes comparison for corticioids shows that effects of soil PCA axis 1 and forest quantity are both medium to large, while past fragmentation and other soil PCA axis having smaller effects (Tableau 2, Figure 27b). For gasteroids, whose species richness is influenced by the two first PCA axis, and both present and past forest quantity, all effect size are relatively similar and considered as medium (Tableau 2, Figure 27).

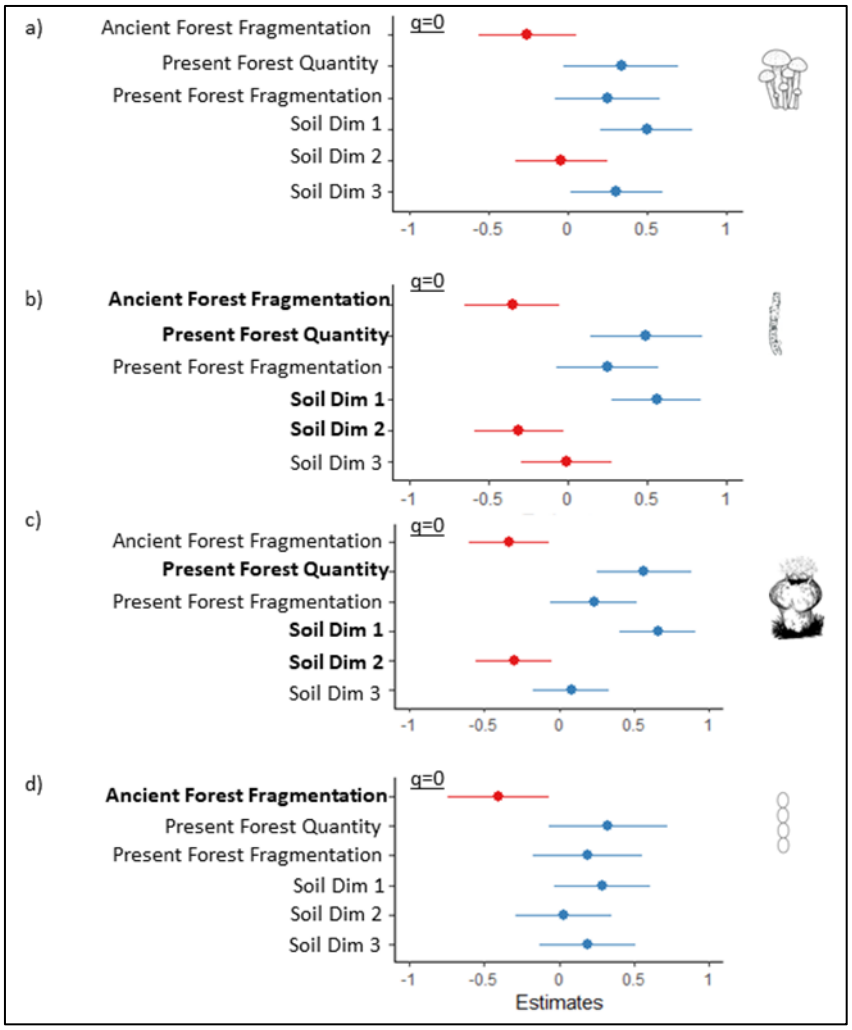


Figure 27- Size effects of the explanatory variables for the best model (delta AICc=0) explaining the species richness (q=0) of agaricoid (a), corticioid (b), gasteroid fungi (c) and microfungi (d). Red error bars indicate a negative effect, blue ones a positive effect. Explanatory variables written in bold have a significant effect.

.

Tableau 1- Results of linear regressions for the diversity of fungal growth forms and for the three Hill number (species richness, q=0; Shannon index q=1; inverse of Simpson index, q=2). For each explanatory variables, estimates are in brackets and the 95% confidence interval in square brackets.

	Hill number	R2 adj	Ancient forest fragmentation	Present forest fragmentation	Ancient forest quantity	Present forest quantity	Soil Dim 1	Soil Dim 2	Soil Dim 3
Agaricoid	q=0	0.23	(-7.43) ; [-18.26 , 3.4]	(6.5) ; [-5.26 , 18.26]	(8.45) ; [-2.81, 19.71]	(11.86) ; [-0.44 , 24.17]	**(16.42) ; [6.21 , 26.63]**	(-0.52) ; [-10.66 , 9.61]	**(11.25) ; [1.15 , 21.35]**
	q=1	0.16	(-3.12) ; [-6.63 , 0.4]	(0.89) ; [-2.67 , 4.46]	(-3.23) ; [-9.31 , 2.85]	(5.21) ; [-0.27 , 10.69]	**(4.78) ; [1.63 , 7.92]**	(-2.52) ; [-5.66 , 0.62]	(-0.23) ; [-3.37 , 2.91]
	q=2	0.12	(-1.48) ; [-3.92, 0.95]	(-0.26) ; [-2.95 , 2.42]		(2.5) ; [-0.29 , 5.3]	**(3.05) ; [0.74 , 5.37]**	(-1.61) ; [-3.92 , 0.69]	(0.21) ; [-2.08 , 2.5]
Corticioid	q=0	0.44	**(-4.54) ; [-8.20 , -0.89]**	(3.18) ; [-0.75 , 7.10]		**(7.76) ; [3.47 , 12.06]**	**(9.01) ; [5.54 , 12.48]**	**(-4.12) ; [-7.58 , -0.66]**	(1.11) ; [-2.35 , 4.58]
	q=1	NA	**(0.14) ; [0.05 , 0.23]**	(0.05) ; [-0.05 , 0.15]	(0.08) ; [-0.02 , 0.19]	(0.1) ; [-0.02 , 0.22]	**(0.25) ; [0.16 , 0.34]**	(0.05) ; [-0.04 , 0.14]	(-0.02) ; [-0.11 , 0.07]
	q=2	NA	**(0.23) ; [0.12, 0.35]**	(0.04) ; [-0.08 , 0.16]	(0.08) ; [-0.06 , 0.22]		**(0.25) ; [0.13 , 0.37]**	(0.08) ; [-0.03 , 0.2]	(-0.02) ; [-0.14 , 0.09]
Gasteroid	q=0	0.29	(-1.64) ; [-3.33, 0.05]	(1.21) ; [-0.46 , 2.89]	**(2.2) ; [0.54 , 3.86]**	**(2.66) ; [0.84 , 4.47]**	**(2.98) ; [1.51 , 4.46]**	**(-1.6) ; [-3.08 , -0.13]**	(-0.03) ; [-1.5 , 1.44]
	q=1	0.35	(0.19) ; [-0.79 , 1.17]	(-0.03) ; [-1.07 , 1.01]	(0.81) ; [-0.23 , 1.84]	(0.86) ; [-0.3 , 2.02]	**(2.28) ; [1.34 , 3.22]**	(-0.65) ; [-1.58 , 0.29]	(0.31) ; [-0.63 , 1.25]
	q=2	0.30	(0.01) ; [-0.8 , 0.82]	(-0.15) ; [-1.01 , 0.71]	(0.73) ; [-0.12 , 1.59]	(0.69) ; [-0.27 , 1.66]	**(1.75) ; [0.97 , 2.53]**	(-0.58) ; [-1.35 , 0.2]	(0.28) ; [-0.5 , 1.05]
Microfungus	q=0	0.11	**(-10.59) ; [-20.58 , -0.6]**	(3.72) ; [-6.96 , 14.4]	(8.46) ; [-1.96 , 18.88]	(9.92) ; [-1.64 , 21.48]	(7.75) ; [-1.73 , 17.24]	(1.71) ; [-7.7, 11.12]	(6.3) ; [-3.12, 15.73]
	q=1	0.23	(-1.15) ; [-3.01 , 0.72]	(-1.57) ; [-3.35 , 0.20]			**(-2.65) ; [4.42 , -0.88]**	(0.01) ; [-1.77 , 1.80]	(0.88) ; [-0.94 , 2.71]
	q=2	0.30	(-0.47) ; [-1.34 , 0.41]	(-0.65) ; [-1.49 , 0.18]			**(-1.62) ; [2.45 , -0.79]**	(0.06) ; [-0.78 , 0.91]	(0.22) ; [-0.64 , 1.08]

III.4. Discussion

Our study on fungal diversity from ancient forests soils of South-West France, joins recent works exploring the landscape ecology of microbial communities. Our results illustrate the mixed effect of both present forest quantity and past landscape fragmentation on soil fungi, and the need to consider several landscape descriptors when studying hyper-diverse communities such as fungal ones as suggested by Su et al. (2022).

Our results evidence the negative relationship between past forest fragmentation and the local diversity of fungal communities associated with ancient forest soils, whatever the Hill numbers used to describe the fungal diversity. We therefore validate our first hypothesis, but only for past and not present forest fragmentation. This pattern could reflect an extinction debt for fungal communities in ancient forests (Jackson and Sax, 2010). Dispersal limitations could explain this result, which is further supported by the negative relationship between past forest fragmentation and microfungi and corticioid diversity, and the lack of effect for the wind-dispersed agaricoid fungi. Several studies point out the dispersal limitations of either ectomycorrhizal or dead wood associated fungi in fragmented habitats (Abrego and Salcedo, 2014; Boeraeve et al. 2018b; Peay et al. 2012) but did not necessarily highlight this legacy effect. Considering the current dynamic of forests throughout Europe, ancient forests would appear to be less and less fragmented (Palmero-Iniesta et al. 2020). However, our results suggest a long-lasting legacy effects of forest fragmentation on soil fungal communities, opening major questions on the conservation of these unique habitats, as well as their positive impact on surrounded forest biodiversity.

Following our second hypothesis and the HAH hypothesis, the present quantity of forest in the landscape has a positive effect on soil fungal diversity. This result highlights the importance of considering the negative impact of habitat loss, not only of fragmentation, on fungal communities. Moreover, in our study zone, the forest cover doubled on average compared to the records of the 19th century, potentially creating new habitats for fungal diversity. However, only the present and not ancient forest quantity has a positive effect on soil fungi diversity, contrasting with Mennicken et al. (2020). The landscape context is clearly different from the Cevennes National Park where this previous study took place. Indeed, quantities of ancient and present forest were particularly contrasted (Mennicken et al. 2020), and present forest fragmentation was reduced but was not studied per se. Future meta-analyses would be particularly useful to integrate these different results and contribute to a larger synthesis on the effect of forest quantity for soil fungal communities. More generally, including landscape descriptors should be considered in future studies on soil fungal communities, as they could explain part of diversity changes, exactly as soil characteristics do. On this

aspect our results confirm the importance of soil factors such as pH, C/N ratio and P Olsen, as observed in large-scale analysis on fungal diversity (Tedersoo et al. 2014).

Through the analysis of eDNA metabarcoding, our results also show the variable response across trophic guilds. We evidence a negative relationship between forest fragmentation and symbiotroph diversity for at least two Hill numbers. This guild was the most abundant in MOTUs and reads, as in most temperate forest soils, including ancient forest ones (Mennicken et al. 2020; Spake et al. 2016). The dominant families (Fig. Suppl. S3) belonged to symbiotroph fungi and in particular ectomycorrhizal ones, which is also highlighted by studies based on fruiting bodies in ancient forests (Hannoire and Corriol 2019). Our results show that their diversity – as well as all fungal ones – is also positively influenced by the present forest quantity, and that both landscape and soil factors have a similar range of effects. Compared to studies testing the effect of the forest extent, that focused on the patch size (Peay et al. 2012), our results invite further consideration of the HAH in studies on symbiotrophs, and in particular for ectomycorrhizal fungi. For other trophic guilds, thar are less abundant in our dataset, results are more heterogeneous. Only the species richness of pathotrophs is strongly negatively influenced by the past forest fragmentation, which confirms the negative impact of fragmentation for pathogenic dead wood associated species (Abrego and Salcedo 2014). Inventories on ancient and old-growth beech forests have already highlighted the importance of ancient forests for the conservation of dead-wood associated fungi (Dvorak et al. 2017; Parmasto 2001). Using soil eDNA may underestimate their diversity (Frøslev et al. 2019) but has at least confirmed the importance of ancient forests, especially the less fragmented ones, for the conservation of this trophic guild.

Using taxonomical and functional databases also allows for the investigation of if wind dispersed fungi were less impacted by landscape factors as compared with fungi with more limited dispersal abilities. Our results clearly show that agaricoid fungi – that are often wind dispersed- are not affected by forest fragmentation nor quantity forest in the landscape. As with many fungi, their diversity is rather influenced by pH, C/N ratio and P Olsen in soils. On the other hand, fungi with low dispersal abilities show different response to landscape gradients. Corticioid and microfungi species richness is negatively impacted by past fragmentation, while gasteroid fungi diversity is both positively influenced by past and present forest quantity. Gasteroid species can be dispersed by large mammals (i.e., wild boar, particularly abundant in South-West France) or even small mammals (Borgmann-Winter et al. 2023), that are frequent in forest habitats including ancient forests. The lack of fragmentation effect suggests that mammal dispersal occurs at least at the landscape scale. Recent reviews on fungal dispersal by mammals also confirm this trend (Vašutová et al. 2019), and dispersal limitations may rather apply for corticoid and microfungi in our case. Indeed, corticioid

fungi dispersal is generally overlooked but may occur even at shorter distance (e.g., insect dispersal, Harrington et al. 2021). Many species show a high degree of endemism (Ghobad-Nejhad et al. 2012) and ancient forest would be a good habitat for their diversity. Moreover, corticioid diversity was positively influenced by the fragmentation, for higher orders of q, suggesting that corticoid fungi would be more diverse in the more fragmented ancient forests, contrary to the pattern observed for all fungi and major trophic guilds. A mapping of the dead wood abundance in ancient forest landscapes including small diameter one (Juutilainen 2016) would however be required to further document this pattern.

Finally, from this soil eDNA metabarcoding experiment, we detect 5,134 MOTUs, relatively more than in ancient forests of Cevennes National Park (Mennicken et al. 2020). This high number shows how apparently managed and fragmented forests contribute to maintain a diverse soil fungal diversity at a regional scale. Metabarcoding often overestimates the number of species compared to fungal fruiting bodies inventories, but interestingly several studies on ancient forests have used comparable methodologies. In ancient forest of the Alps, at higher elevation, 842 MOTUs were detected over 62 sites, and an average of 88 MOTUs were detected per site (Mollier 2023); i.e., circa 10 times less alpha diversity as observed in our study. The spatial design is different as 1 ha was sampled instead of a 15 m radius plot – leading to a larger plot size in our study. Sampling a larger area – 1 ha – could explain the higher diversity estimates, especially considering the local heterogeneity of ancient forests. Similarly, the high number of MOTUs at a regional scale could be related to a high heterogeneity of fungal communities associated with ancient forest soils. Such a heterogeneity could be an important feature of ancient forests, already suggested on other old-growth pine forests for example (Wulf and Kolk 2014) and shall be characterized to potentially understand its importance on fungal diversity.

III.5. Conclusions

Our study provides a comprehensive characterization of soil communities based on eDNA in ancient forests and highlights the negative effect of past fragmentation on all soil fungi and especially on symbiotroph diversity. Additionally, the habitat amount has a positive effect for most fungi, in relation with the quantity of present forest in the landscape. We also evidence that the diversity of fungal growth forms associated with a long-distance dispersal is not impacted by past or present fragmentation. By studying ancient forests over South-West France, we illustrate an important legacy effect, inherited from the past forest fragmentation. Finally, this study strengthens the need to consider landscape ecology and its impacts on diversity, including on soil fungi. In a context of global change, where habitat fragmentation and land-use changes are threatening biodiversity, our study

highlights the importance of reasoning at the landscape scale and considering forest history, for the conservation of soil fungi and their functional diversity, at least in ancient forests.

Acknowledgement

The authors would like to thank Jérôme Molina, Lionel Valladares, Laurent Larrieu and Christophe Thébaud for their participation and advice during the forest sampling campaign. We also acknowledge Coralie Breton and Christelle Couderc for their help with the laboratory experiments as well as Anne-Sophie Benoiston, the EDB B2M platform and GenoToul (Toulouse) for their support in the various sequencing and bioinformatics stages. Franck Cazes is also thanked for his help in preparing the soil samples. Frédéric Julien and Zoé Bulliard are also thanked for their help with the soils physico-chemical analysis at the PAPC (Plateforme d'Analyse Physico-Chimique, LEFE Toulouse). The authors would also like to thank Fabien Laroche for his advice on statistical analysis. The authors would like to thank François De Vleeschouwer, Julian Donald, Petra Guy and the anonymous reviewers for the constructive comments on this article.

Références

Aslani F, Geisen S, Ning D, Tedersoo L, Bahram M. 2022. Towards revealing the global diversity and community assembly of soil eukaryotes. *Ecology Letters* **25**(1): 65-76.

Alberdi A, Gilbert MTP. 2019. A guide to the application of Hill numbers to DNA-based diversity analyses. *Molecular ecology resources* **19**(4): 804-817.

Aran D, Maul A, Masfaraud J-F. 2008. A spectrophotometric measurement of soil cation exchange capacity based on cobaltihexamine chloride absorbance. *Comptes Rendus Geoscience* **340**(12): 865-871.

Assmann T. 1999. The ground beetle fauna of ancient and recent woodlands in the lowlands of north-west Germany (Coleoptera, Carabidae). *Biodiversity and Conservation* **8**(11): 1499-1517.

Bates D, Machler M, Bolker BM, Walker SC. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**(1): 1-48.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* **40**(D1): D48-D53.

Berges L, Dupouey JL. 2021. Historical ecology and ancient forests: Progress, conservation issues and scientific prospects, with some examples from the French case. *Journal of Vegetation Science* **32**(1): 17.

Boeraeve M, Honnay O, Jacquemyn H. 2019. Forest edge effects on the mycorrhizal communities of the dual-mycorrhizal tree species Alnus glutinosa (L.) Gaertn. *Science of the Total Environment* **666**: 703-712.

Boeraeve M, Honnay O, Mullens N, Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Thomaes A, Jacquemyn H. 2018. The impact of spatial isolation and local habitat conditions on colonization of recent forest stands by ectomycorrhizal fungi. *Forest Ecology and management* **429**: 84-92.

Borgmann-Winter BW, Stephens RB, Anthony MA, Frey SD, D'Amato AW, Rowe RJ. 2023. Wind and small mammals are complementary fungal dispersers. *Ecology*: 12.

Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources* **16**(1): 176-182.

Cateau E, Larrieu L, Vallauri D, Savoie J-M, Touroult J, Brustel H. 2015. Ancienneté et maturité: deux qualités complémentaires d'un écosystème forestier. *Comptes rendus biologies* **338**(1): 58-73.

Christensen M, Heilmann-Clausen J, Walleyn R, Adamcik S 2005. Wood-inhabiting fungi as indicators of nature value in European beech forests. In: Marchetti M ed. *Monitoring and indicators of forest biodiversity in Europe: from ideas to operationality*. Florence.

Curtis PG, Slay CM, Harris NL, Tyukavina A, Hansen MC. 2018. Classifying drivers of global forest loss. *Science* **361**(6407): 1108-1111.

De Keersmaeker L, Onkelinx T, Vandekerkhove K, Thomaes A, Hermy M, Verheyen K. 2014. A spatially explicit empirical model on actual and potential ancient forest plant diversity in a fragmented landscape. *Landscape and urban planning* **130**: 149-158.

Desender K, Ervynck A, Tack G. 1999. Beetle diversity and historical ecology of woodlands in Flanders. *Belgian Journal of Zoology* **129**(1): 139-155.

Didham RK, Kapos V, Ewers RM. 2012. Rethinking the conceptual foundations of habitat fragmentation research. *Oikos* **121**(2): 161-170.

Donald J, Murienne J, Chave J, Iribar A, Louisanna E, Manzi S, Roy M, Tao S, Orivel J, Schimann H. 2021. Multi-taxa environmental DNA inventories reveal distinct taxonomic and functional diversity in urban tropical forest fragments. *Global Ecology and Conservation* **29**: e01724.

Dupouey J-L, Sciama D, Dambrine É, Rameau J-C, Koerner W. 2002. La végétation des forêts anciennes. *Revue forestière française*: 521-532.

Dvorak D, Vasutova M, Hofmeister J, Beran M, Hosek J, Betak J, Burel J, Deckerova H. 2017. Macrofungal diversity patterns in central European forests affirm the key importance of old-growth forests. *Fungal Ecology* **27**: 145-154.

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP, Haile J, Esposito A, Riaz T, Erseus C, Gusarov VI, Edwards ME, Johnsen A, et al. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* **21**(8): 1821-1833.

ESRI 2020. Release 10.8 Environmental Systems Research Institute. Redlands, CA.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**: 487-515.

Fahrig L. 2013. Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of biogeography* **40**(9): 1649-1663.

Fahrig L 2017. Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. In: Futuyma DJ ed. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 48*. Palo Alto: Annual Reviews, 1-23.

Fahrig L, Arroyo-Rodriguez V, Bennett JR, Boucher-Lalonde V, Cazetta E, Currie DJ, Eigenbrod F, Ford AT, Harrison SP, Jaeger JAG, et al. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological conservation* **230**: 179-186.

Favre C, Grel A, Granier E, Cosserat-Mangeot R, Bachacou J, Dupouey J 2013. Digitalisation des cartes anciennes. Manuel pour la vectorisation de l'usage des sols et le géoréférencement des minutes 1: 40000 de la carte d'Etat-Major. v. 12.7. 3: INRA Nancy.

Fletcher RJ, Didham RK, Banks-Leite C, Barlow J, Ewers RM, Rosindell J, Holt RD, Gonzalez A, Pardini R, Damschen EI, et al. 2018. Is habitat fragmentation good for biodiversity? *Biological conservation* **226**: 9-15.

Fritz O, Gustafsson L, Larsson K. 2008. Does forest continuity matter in conservation? A study of epiphytic lichens and bryophytes in beech forests of southern Sweden. *Biological conservation* **141**(3): 655-668.

Ghobad-Nejhad M, Hallenberg N, Hyvonen J, Yurchenko E. 2012. The Caucasian corticioid fungi: level of endemism, similarity, and possible contribution to European fungal diversity. *Fungal diversity* **52**(1): 35-48.

Gouix N, Savoie JM, Bouteloup R, Corriol G, Cuypers T, Hannoire C, Infante Sanchez M, Maillé S, Marc D. 2019. Inventaire et caractérisation des noyaux de « vieilles forêts de plaine » Pour une continuité de la trame forestière entre Pyrénées et Massif-Central. Rapport final: Conservatoire d'espaces naturels Midi-Pyrénées / Ecole d'ingénieurs de Purpan.

Grilli G, Longo S, Huais PY, Pereyra M, Verga EG, Urcelay C, Galetto L. 2017. Fungal diversity at fragmented landscapes: synthesis and future perspectives. *Current Opinion in Microbiology* **37**: 161-165.

Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD, Lovejoy TE, Sexton JO, Austin MP, Collins CD. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances* **1**(2): e1500052.

Halme P, Holec J, Heilmann-Clausen J. 2017. The history and future of fungi as biodiversity surrogates in forests. *Fungal Ecology* **27**: 193-201.

Hannoire C, Corriol G. 2019. Volet mycologique de l'étude des vieilles forêts de plaine en Midi-Pyrénées Rapport final (étude 2017-2019). CBNPMP.

Harrell FE 2023. Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 5.0-1.

Harrington TC, Batzer JC, McNew DL. 2021. Corticioid basidiomycetes associated with bark beetles, including seven new Entomocorticium species from North America and Cylindrobasidium ipidophilum, comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **114**(5): 561-579.

Hartig F 2022. DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.6.

Hermy M, Honnay O, Firbank L, Grashof-Bokdam C, Lawesson JE. 1999. An ecological comparison between ancient and other forest plant species of Europe, and the implications for forest conservation. *Biological conservation* **91**(1): 9-22.

Hermy M, Verheyen K. 2007. Legacies of the past in the present-day forest biodiversity: a review of past land-use effects on forest plant species composition and diversity. *Ecological Research* **22**(3): 361-371.

Herrault P-A, Sheeren D, Fauvel M, Paegelow M. 2015. Vectorisation automatique des forêts dans les minutes de la carte d'état-major du 19e siècle. *Revue internationale de géomatique* **25**(1): 35-51.

Hill MO. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**(2): 427-432.

Hsieh T, Ma K, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (H ill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* **7**(12): 1451-1456.

Hsieh TC, Ma KH, Chao A 2022. iNEXT: iNterpolation and EXTrapolation for species diversity. R package version 3.0.0.

Jackson ST, Sax DF. 2010. Balancing biodiversity in a changing environment: extinction debt, immigration credit and species turnover. *Trends in Ecology & Evolution* **25**(3): 153-160.

Juutilainen K. 2016. Ecology, environmental requirements and conservation of corticioid fungi occupying small diameter dead wood. *Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Science*(313).

Karasiak N, Lomellini A, Dereclenne A-C, Herrault PA, Fauvel M, Ladet S, Sheeren D 2016. Historical Map: un plug-in expérimental QGIS pour la vectorisation de l'occupation des sols dans les minutes de la carte d'État-Major datant du 19ème siècle. *Journée technique INRA en géo-informatique*. Saint-Laurent de la Prée, France. 14 p.

Le S, Josse J, Husson F. 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* **25**(1): 1-18.

Li D. 2018. hillR: taxonomic, functional, and phylogenetic diversity and similarity through Hill Numbers. *Journal of Open Source Software* **3**(31): 1041.

Martin CA. 2018. An early synthesis of the habitat amount hypothesis. *Landscape Ecology* **33**(11): 1831-1835.

Mazerolle M. 2006. Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. *Amphibia-Reptilia* **27**(2): 169-180.

Mazerolle MJ 2020. AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package version 2.3-1.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of Past and Present-Day Landscape Structure on Forest Soil Microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 13.

Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E 2013. SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop. Abstract*: Citeseer. 27-29.

Mony C, Vandenkoornhuyse P, Bohannan BJM, Peay K, Leibold MA. 2020. A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Frontiers in Microbiology* **11**: 16.

Nagati M, Roy M, Manzi S, Richard F, Desrochers A, Gardes M, Bergeron Y. 2018. Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal fore st. *Plant and Soil* **432**(1-2): 345-357.

Nguyen NH, Song ZW, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241-248.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics* **4**: EBO. S653.

Palmero-Iniesta M, Espelta JM, Gordillo J, Pino J. 2020. Changes in forest landscape patterns resulting from recent afforestation in Europe (1990-2012): defragmentation of pre-existing forest versus new patch proliferation. *Annals of Forest Science* **77**(2): 15.

Parmasto E 2001. Fungi as indicators of primeval and old-growth forests deserving protection. In: Moore D, Nauta MM, Rotheroe M, Evans SE eds. *Fungal Conservation: Issues and Solutions*. Cambridge: Cambridge University Press, 81-88.

Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD. 2012. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* **21**(16): 4122-4136.

Polme S, Abarenkov K, Nilsson RH, Lindahl BD, Clemmensen KE, Kauserud H, Nguyen N, Kjoller R, Bates ST, Baldrian P, et al. 2020. FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal diversity* **105**(1): 1-16.

Ponge JF, Dubs F, Gillet S, Sousa JP, Lavelle P. 2006. Decreased biodiversity in soil springtail communities: the importance of dispersal and landuse history in heterogeneous landscapes. *Soil Biology & Biochemistry* **38**(5): 1158-1161.

R Core Team 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Ramezani H, Ramezani A. 2021. Forest fragmentation assessment using field-based sampling data from forest inventories. *Scandinavian Journal of Forest Research* **36**(4): 289-296.

Savoie J-M, Bartoli M, Brin A, Brustel H, Corriol G, Hannoire C, Harrel M, Larrieu L, Sarthou V, Valladares L. 2011. Forêts pyrénéennes anciennes de Midi-Pyrénées. Rapport d'Etude de la phase 1 du projet FEDER 2008-2011: Ecole d'Ingénieurs de PURPAN/DREAL Midi-Pyrénées.

Savoie J-M, Bartoli M, Brin A, Brustel H, Corriol G, Hannoire C, Harrel M, Larrieu L, Sarthou V, Valladares L. 2015. Vieilles forêts pyrénéennes de Midi-Pyrénées. Deuxième phase. Évaluation et cartographie des sites. Recommendations. Rapport final: Ecole d'Ingénieurs de PURPAN.

Su NE, Jarvie S, Yan YZ, Gong XQ, Li FS, Han P, Zhang Q. 2022. Landscape context determines soil fungal diversity in a fragmented habitat. *Catena* **213**: 11.

Taberlet P, Bonin Al, Zinger L, Coissac E 2018. Environmental DNA : for biodiversity research and monitoring. Oxford: Oxford University Press.

Taiyun W, Viliam S 2021. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92).

Tedersoo L, Bahram M, Polme S, Koljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**(6213): 1078-+.

Vallauri D, Grel A, Granier E, Dupouey J-L. 2012. Les forêts de Cassini. Analyse quantitative et comparaison avec les forêts actuelles. Marseille: WWF/ INRA.

Vannette RL, Leopold DR, Fukami T. 2016. Forest area and connectivity influence root-associated fungal communities in a fragmented landscape. *Ecology* **97**(9): 2374-2383.

Watling JI, Arroyo-Rodriguez V, Pfeifer M, Baeten L, Banks-Leite C, Cisneros LM, Fang R, Hamel-Leigue AC, Lachat T, Leal IR, et al. 2020. Support for the habitat amount hypothesis from a global synthesis of species density studies. *Ecology Letters* **23**(4): 674-681.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F. 2021. metabaR: an R package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(4): 586-592.

Appendices

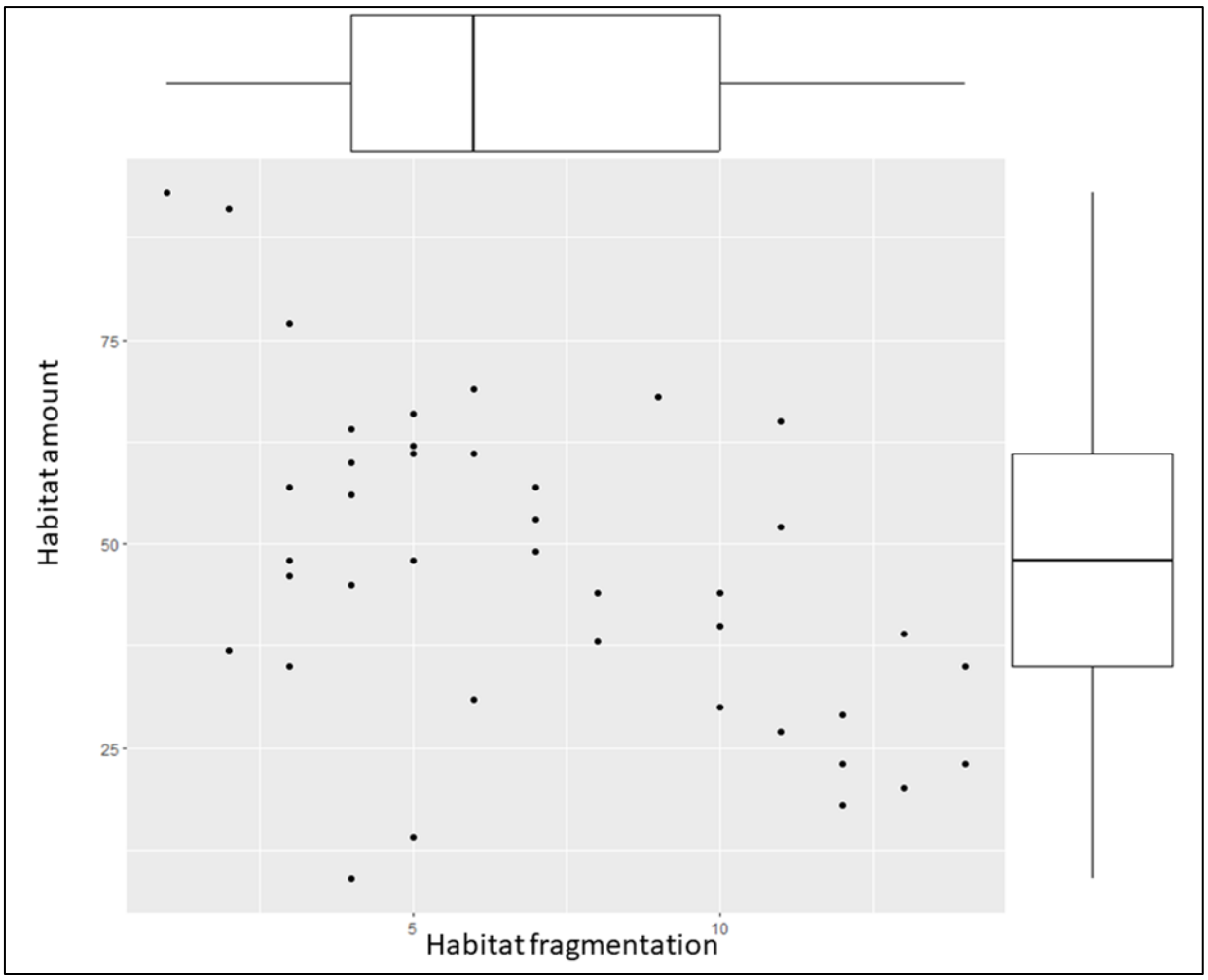


Figure S1- Distribution of sampled sites according to the number of patches and the proportion of present forest in the 1km buffer.

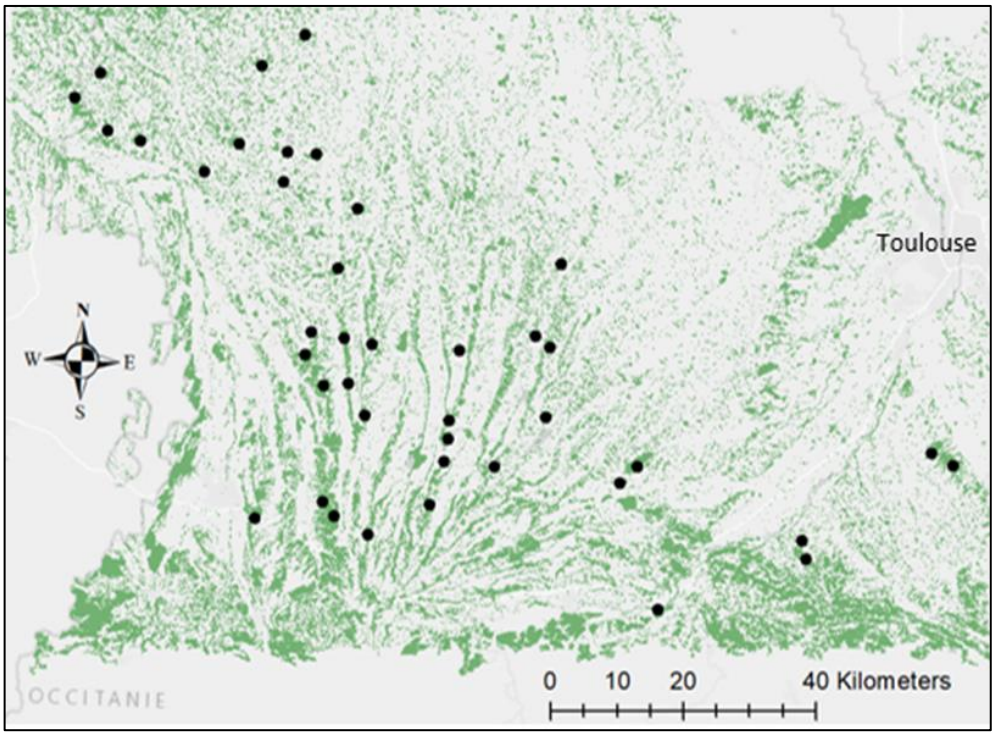


Figure S2- Location of the 41 sampled plots (black circle) in South-West France, over the map of present forest.

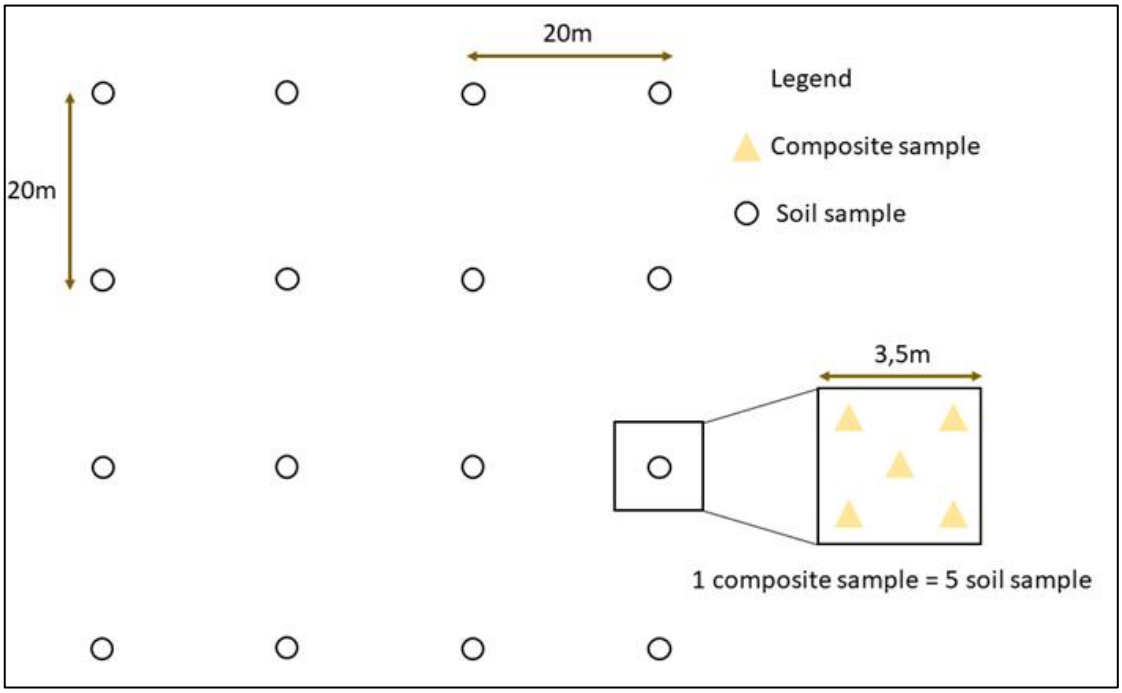


Figure S3- Sample design per plot – showing the location of the 16 composite samples (white circle). Each composite sample consists of 5 soil samples and resulted in 15g of soil.

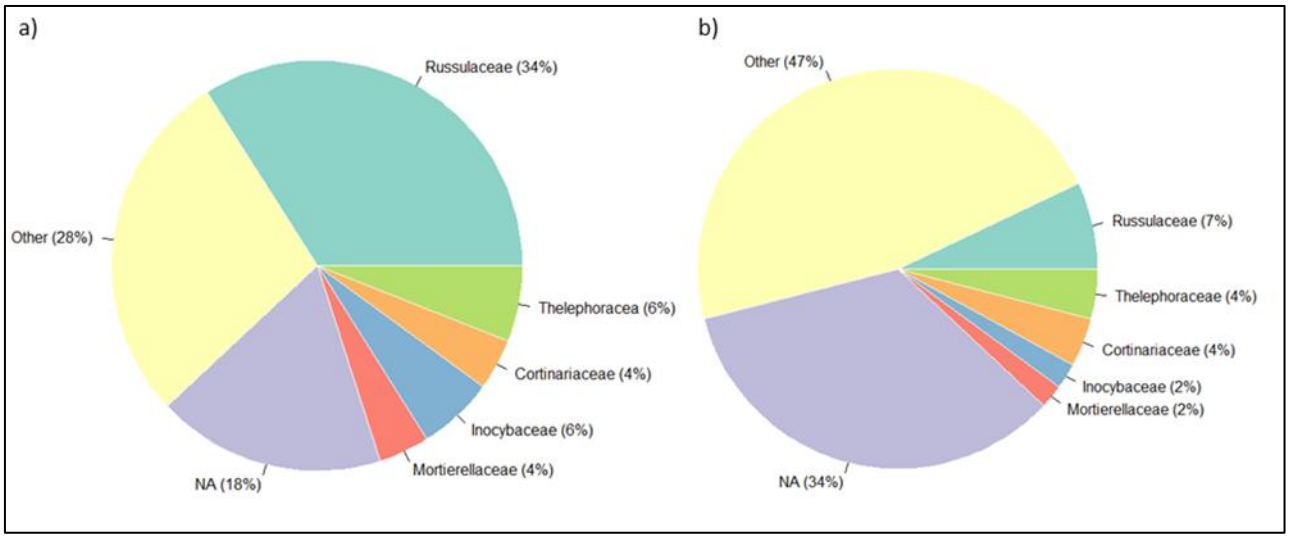


Figure S4- Pie charts showing a) the distribution of MOTUs according to read counts and b) to number of MOTUs among the major fungal families. The "NA" sequences refer to sequences considered as fungi but not assigned to the family level (rather order level). The "Other" class refer to other fungal families, i.e., 293 families in our dataset.

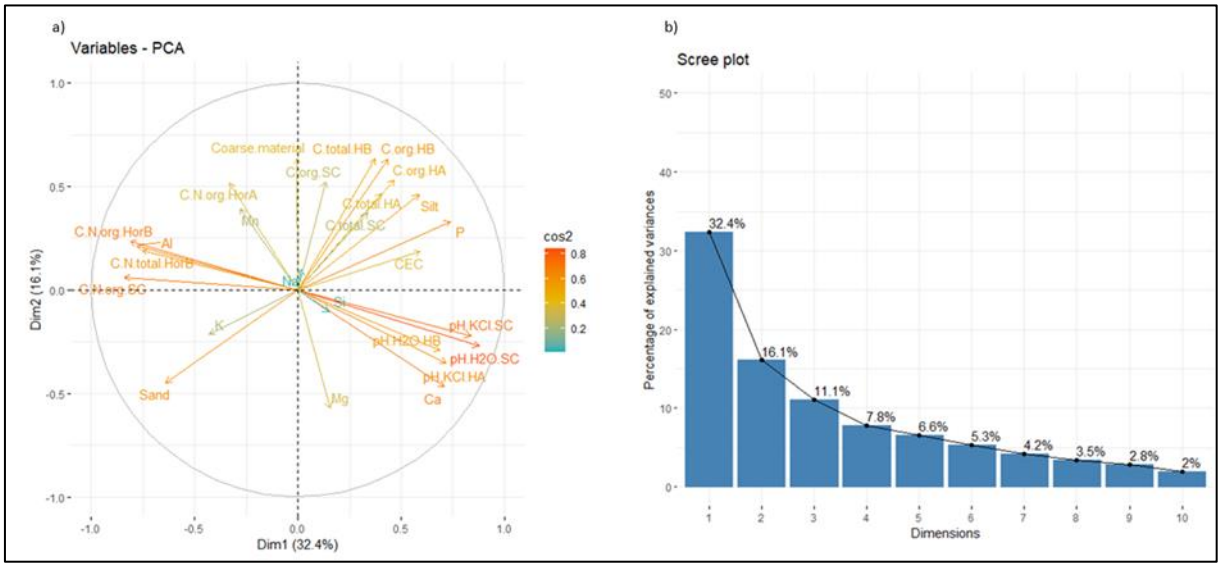


Figure S5-(a) Principal Component Analysis with representation of the squared cosines of the variables. The squared cosine represents the quality of the variables on the PCA. The closer the variable is to the correlation circle, the better it is represented on the PCA. (b) Percentage of variance explained by each principal axis.

Tableau S1-Contribution of soil physico-chemical variables to the three first axes of the PCA.

	Dim 1	**Dim 2**	**Dim 3**
%P - Olsen	6.48	2.63	0.76
C/N organic Horizon A	1.29	6.40	0.39
C/N organic Horizon B	7.84	1.30	0.38
C/N organic Soil Composite	8.37	0.09	0.67
C/N total Horizon B	6.75	0.87	0.69
pH H2O Horizon B	5.64	2.03	2.20
pH H2O Soil Composite	9.14	1.78	0.00
pH KCl Horizon A	6.15	2.97	0.24
pH KCl Soil Composite	8.34	1.17	0.00
CEC	4.15	0.82	9.19
%Al	7.21	1.09	0.00
%Ca	5.98	5.24	2.47
%K	2.19	1.09	18.23
%Mg	0.28	7.80	4.65
%Mn	0.94	3.68	5.40
%Na	0.00	0.24	9.96
%Si	0.27	0.27	22.23
% Silt	4.09	5.07	2.09
%Sand	4.87	4.83	1.97
% Coarse material	0.00	9.69	1.25
% C org Horizon A	2.59	6.72	3.27
% C org Horizon B	2.25	9.56	1.46
% C org Soil Composite	0.21	6.52	3.12
% C total Horizon A	1.94	5.21	5.14
% C total Horizon B	1.67	9.63	1.03
% C total Soil Composite	1.35	3.32	3.21

IV. Comment la diversité des communautés mycorhiziennes en forêt ancienne influence la croissance des plantules de hêtre (*Fagus sylvatica) ?*



Préambule

L'objectif de ce volet est de tester l'influence des réseaux ectomycorhiziens sur la croissance des semis en forêts à travers une approche expérimentale. Les données récoltées pourraient aider les gestionnaires forestiers à identifier les facteurs favorisant la mise en place de réseaux mycorhiziens. Ce projet a aussi été pensé avec le soutien du PNR Pyrénées Ariègeoises, de façon notamment à tester l'hypothèse que les lieux riches en champignons ectomycorhiziens comme les forêts anciennes étaient propice au fonctionnement de réseaux mycorhiziens communs.

Alors que l'expérience devait se terminer en 2022, et parce que la sécheresse a aussi gravement impacté la croissance des plantules, j'ai décidé de prolonger l'expérience d'un an, mais aussi de chercher d'autres indicateurs pour évaluer la relation entre croissance, régénération et réseaux mycorhiziens communs. Il est prévu d'ajouter de nouvelles analyses d'ici la soumission de ce travail. Actuellement, le séquençage des champignons présents sur les racines pré-expérience et post-expérience est en cours. Les résultats devraient arriver en février 2024. Il est prévu d'inclure ces données dans l'article. Au printemps 2024, des analyses de carbone et d'azote isotopiques foliaires seront faites pour observer la présence éventuelle de composés d'origine fongiques. Enfin, des analyses pour estimer le stockage de carbone dans le sol en fonction des traitements mise en place sont aussi planifiées au printemps 2024. Les dispositifs expérimentaux sont toujours en place exceptés dans deux parcelles en raison de vandalisme et le refus d'un propriétaire forestier à faire perdurer l'expérience sur sa parcelle.

Il est envisagé de soumettre ce travail à la revue *New Phytologist* d'ici milieu 2024. Ces résultats ont été présentés sous la forme d'une présentation orale lors de l'école d'automne « Global Forests 2023 – Tropical forests : conservation issues and management challenges » organisée le 9-12 octobre 2023 à Oxford.

High diversity of ectomycorrhizal fungal communities but not common mycorrhizal network favor *Fagus sylvatica* L. seedlings growth in ancient forests

Authors

Alexandre Raimbault[1,2], Antoine Brin[1,2], Franck Cazes[1], Coralie Roy-Camille[1,3], Laure Gandois[4], Jason Hoeksema[5], Mélissande Nagati[6] and Mélanie Roy[3,7,8]

[1]Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Université de Toulouse, Toulouse, France

[2]DYNAFOR, INRAE, Castanet-Tolosan, France

[3]EDB, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[4]LEFE, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[5] Department of Biology, University of Mississippi, Oxford, MS, USA

[6] UQAT-UQAM Industrial Chair in Sustainable Forest Management, Forest Research Institute, University of Québec in Abitibi-Témiscamingue, Rouyn-Noranda, QC, Canada

[7]IRL IFAECI Instituto Franco-Argentino para el Estudio del Clima y sus Impactos, CNRS, CONICET, UBA, IRD, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

[8]Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue (UQAT), Rouyn-Noranda, Canada

Corresponding author: raimbault.alexandre1@gmail.com

ORCID Numbers

Alexandre Raimbault 0009-0006-9584-0732

Antoine Brin 0000-0003-3479-3005

Franck Cazes

Coralie Roy-Camille 0009-0000-2014-611X

Laure Gandois 0000-0002-9326-6830

Jason Hoeksema

Mélissande Nagati

Mélanie Roy 0000-0002-4565-2331

Abstract

Ectomycorrhizal fungi play a major role in the survival and growth of most temperate trees. Such fungi are abundant in forest soils from Europe, especially in ancient beech forests, where tree cover has been maintained for at least 150 years. However, the functional impacts of such symbioses remains to be explored, notably to evaluate if common mycorrhizal network (CMN) could facilitate the growth of young trees such as Fagus sylvatica seedlings – and contribute to the resilience of ancient forests.

To evaluate if CMN could contribute to the survival and growth of beech seedlings, we set up an in-situ experiment in three pairs of ancient and recent forests of South-West France, and followed 180 seedlings over a 18 months period. We compared the growth, nutrition and mycorrhizal associations between conditions excluding or not the CMN. We also compared the soil and mycorrhizal conditions of ancient and recent forests prior to the experiment.

Soil physico-chemistry was not particularly contrasted between ancient and recent forests, but fungi and ectomycorrhizal ones were more diverse in ancient forests. After one year of experiment, the survival was generally low, due notably to severe drought events, and no CMN effect was detected. In ancient forests, seedlings showed a higher survival and growth before but not after the drought events.

Our results show that ancient forest soils host a unique and diverse ectomycorrhizal community, favor Fagus sylvatica growth, but not through the functioning of CMN. Our study highlights the role of ancient forest soils, and invite to search for other mechanism than CMN beyond the higher growth in ancient forests, as well as extending in-situ experiments in time and space to potentially detect functional CMN in temperate forests.

IV.1. Introduction

Forests soils in the temperate zone host diverse and abundant communities of ectomycorrhizal (ECM) fungi, that are symbiotic with plant roots, notably from trees belonging to dominant families such as Fagaceae (Tedersoo *et al.*, 2012; Tedersoo *et al.*, 2014). These ECM fungi provide nutrients and water to trees and receive organic matter from photosynthesis (Smith *et al.*, 2008). Moreover, they have proven to be essential for the regeneration, growth and drought resistance of temperate tree species (Alaux *et al.*, 2021; Anthony *et al.*, 2022). Through their impact on seedling growth, such ECM can also facilitate the growth of their host species compared to others (García de Jalón *et al.*, 2020; Policelli *et al.*, 2020), and represent a central symbiosis for the dynamic of ecosystems (Tedersoo *et al.*, 2020). Among the mechanisms explaining a potential facilitation, the role of shared ECM has possibly been overstated (Karst *et al.*, 2023), since the description of common mycorrhizal networks (CMN). These CMN were described based on the transfer of organic carbon between trees (Simard *et al.*, 1997; Teste *et al.*, 2009; Simard *et al.*, 2015) but other mechanisms could indeed explain such transfers. Interestingly, the recent debates have illustrated the lack of evidence on CMN functioning, especially in forests where CMN are expected to play a major role, such as in ancient and old-growth forests of the temperate region.

In France, ancient forests are characterized by the uninterrupted presence of woodland since the minimum forestry period in mid-19th century (Dupouey *et al.*, 2007; Vallauri *et al.*, 2017). Ancient forests are not necessarily mature, and contrary to old-growth forests may not host larger trees or high quantity of deadwood but represent and interesting model of forest soil stability. By definition, recent forests have appeared as a result of the abandonment of agricultural land after the middle of the 19th century (Cateau *et al.*, 2015). Interestingly, soils of recent and ancient forests show important differences of physico-chemistry (Koerner *et al.*, 1997; Compton & Boone, 2000). Soils of ancient forests generally have a higher organic matter content and a lower pH than the soils of recent ones (Berges & Dupouey, 2021).

The soil fungal diversity has only recently been studied in ancient forests, for example in ancient forests of Belgium, revealing a rich community but not necessarily different from fungal communities associated with continuous recent forests (Boeraeve *et al.*, 2018). Besides the clues suggesting that ancient forests host ECM-rich communities (Mennicken *et al.*, 2020), the questions remains whether such ECM fungi would benefit to seedling growth through the functioning of CMN.

Knowing whether CMN could contribute to seedling facilitation and growth in ancient forests or not is particularly interesting in a context of climate change. Ancient forests are in South-West France often associated with beech, Fagus sylvatica, a tree species associated with ECM fungi. While

climate change scenarii are often pessimistic for temperate tree species such as *Fagus sylvatica* (Piedallu et al., 2009), several studies have pointed out its unusual resilience, at least in some habitats such as old-growth forests (Principe *et al.*, 2017; Pflug *et al.*, 2018). Until now, only physiological adaptations or its high genetic variability have explained these observations. Studying the potential CMN, as well as the diversity of ECM fungi in ancient forests of South-West France where drought episodes are more and more frequent (Rita *et al.*, 2020; C3S, 2022), could represent an interesting case to better understand *Fagus sylvatica* resilience, from an underground point of view. In this context, including above-ground measures on leaf isotopes could reflect if seedlings were affected by drought stress (Farquhar & Sharkey, 1982). Indeed, under water stress, the carbon isotopic composition of leaves can change significantly, resulting in a decrease in $\delta^{13}C$ (Farquhar *et al.*, 1989).

At the ecosystem level, detecting functional CMN would also contribute to the debate on the carbon storage capacity of ancient forest soils. In particular, the question whether CMN contribute to increase the carbon stocks in forests is often mentioned without being properly tested, at least in temperate forests. However, the role of ECM fungi on carbon storage was initially assumed in boreal forests (Clemmensen *et al.*, 2013). On the other hand, several articles and reports have pointed out the higher carbon storage of ancient forest soils (Leuschner *et al.*, 2014; Dhote *et al.*, 2015) including in beech forests. Experiments excluding CMN in-situ may not detect changes of carbon storage on a short period of time, but however represent an opportunity to investigate this potential impact of CMN on the functioning of ancient forests soils.

In this context, the objective of our study is to (1) compare the fungi and ECM communities from ancient and recent forests prior to our experiment, (2) test in-situ if CMN could favor beech seedling growth and survival, and (3) evaluate if during our experiment, differences of carbon storage could be observed and related to CMN exclusion. We assume that soil fungal communities, and more specifically ECM communities, will be more diverse in ancient forests than in recent ones. We expect to detect CMN effects more specifically in ancient forests soils, through a positive impact on seedling growth and survival. We also expect that experimental root exclusion will also contribute to a positive effect on seedling growth, both in ancient and recent forest soils. Finally, we expect that carbon storage will be higher in ancient forests soils, and in experiments where fungi potentially forming CMN would be present.

IV.2. Material and Methods

IV.2.1. Study site

The experiment took place in six forest plots located within the regional natural park of Pyrenees Ariegeoises from March 2022 to May 2023. The forest plots were located in 3 different locations: Barjac, Rivèrenert and Rimont. In each location, a plot of ancient and recent forest were selected in order to test the effect of temporal continuity. The selection of ancient forests was possible thanks to the comparison with forests maps from the 19th century ("Etat major", Géoportail, 2023). The average distance between each village is 17km linear. Specifically, there were 970m, 62m and 550m between the Barjac, Rimont and Riverenert plots respectively. The forests were mainly covered by beech (*Fagus sylvatica*), oak (*Quercus* sp.), hawthorn (*Crataegus monogyna*) and hazel (*Corylus avelana*), that are all ECM host species.

IV.2.2. Soil fungal diversity in ancient and recent forest soils

To allow a first evaluation of soil fungi communities prior to the experiment, in ancient and recent forests, soil samples were sampled following a protocol already applied to ancient forests in South-West France. To do so, 16 soil samples were collected every 20m within each 1ha forest plot (Mennicken *et al.*, 2020; Raimbault *et al.,* 2024). At each sampling point, five 10 cm deep soil samples were taken (including the A and B horizons) within a radius of 3.5 m and combined into a composite sample. Stones, large debris, litter and large roots were removed. Between each forest plot, traces of DNA on the shovel were removed with 2% bleach. Within each forest plot and between composite samples, bleach was not used but the shovel was planted close to the next composite sample without sampling, to reduce the contamination due to the previous composite sample as in Donald *et al.* (2021). The composite soil samples (approximately 100g of soil each) were kept cool with ice packs for a maximum of 12 hours. In the evening, after the bags had been homogenized, 15g of each composite soil sample was taken with a clean wooden spoon and then poured into a tea bag placed in a clean Ziploc bag with approximately 45g of silica gel. To ensure optimum drying, the silica gel was exchanged with new silica gel 24 hours after bagging. This process was repeated until the samples were dry. The remains of the composite samples were pooled at plot level in order to obtain a single sample for physico-chemical soil analysis. In addition, 100g of soil from the A and B horizons were collected from the center of each plot for soil physico-chemistry analyses.

IV.2.3. Environmental characteristics of ancient and recent forest soils

The following parameters were characterized at the Arras soil analysis laboratory on the fine soil fraction of the composite soil samples after sieving at 2mm: pH, phosphorus, CEC, nitrogen, carbon (total and organic), C/N and the quantity of organic matter (Tableau S2).

To report drought events along our experiment especially during summer time, microclimatic data were recorded using iButton chips placed in each plot since the start of the experiment (January 2022). The chips were located at a height of around 1.50 m and were protected from rain and sun. Temperature (°C) and air humidity (%) were recorded every hour for one year (May 2022-May 2023), and data were collected every two months from each iButton. The data collected was used to calculate bioclimatic variables similar to the WorldClim database (Fick & Hijmans, 2017) (Tableau S2).

To evaluate if plots would occur in similar light conditions, the openness of the canopy was measured by taking hemispherical photographs during July 2022. Three photographs were taken per site at the extremities and in the center of the plot. They were taken with a SAMSUNG tablet equipped with a Fisheye lens at a height of around 1.80m. The photographs were used to estimate the canopy cover and the closing percentage of the canopy using GLAMA ("Gap Light Analysis Mobile Application") software (Tichý, 2014; Tichý, 2016) (Table S4).

IV.2.4. Common mycorrhizal network exclusion and experimental design

Our experiment focused on the growth and survival of beech seedlings, as beech were commonly found in all ancient and recent forests (Figure 28a - b). The seedlings, which were one year old at the time of the experiment, were purchased from a nursery in northern France (more local seeds were not available the year we started our experiment). As a control, 30 seedlings were subsampled and their root system was collected to represent a control prior to the experiment. The seedlings were placed in a greenhouse for one month before being planted in the field.

The treatments applied are based on the work of Hoeksema (2015) and Liang *et al.* (2020). These treatments allow us to observe the possible contribution of CMNs to seedling growth, but also the influence of root competition with neighboring plants. The three treatments for observing these two effects are: + roots/+ CMN (Treatment A), - roots/+ CMN (Treatment B) and - roots/-CMN (Treatment C). Treatment A is considered to be the control treatment. With this treatment, the seedlings are in direct contact with the CMN already present in the soil and the roots of neighboring trees. There is only one nylon net with a mesh size of 2mm to limit any damage caused by micro-organisms. Treatment B allows the CMN already present in the soil to be in contact with the seedling's roots. In addition to the 2mm mesh, a net with a capacity of 30L and a 35µm mesh bag is used. Treatment C isolates the seedlings from the CMN already present in the soil and from

neighboring roots. The system is similar to treatment B, but in this case the mesh bag is 0.5µm instead of 35µm. Only minerals and water can pass through this mesh. Each treatment was repeated 10 times per plot, resulting in 30 seedlings planted every two meters over a 6*20 m surface (Figure 28c).

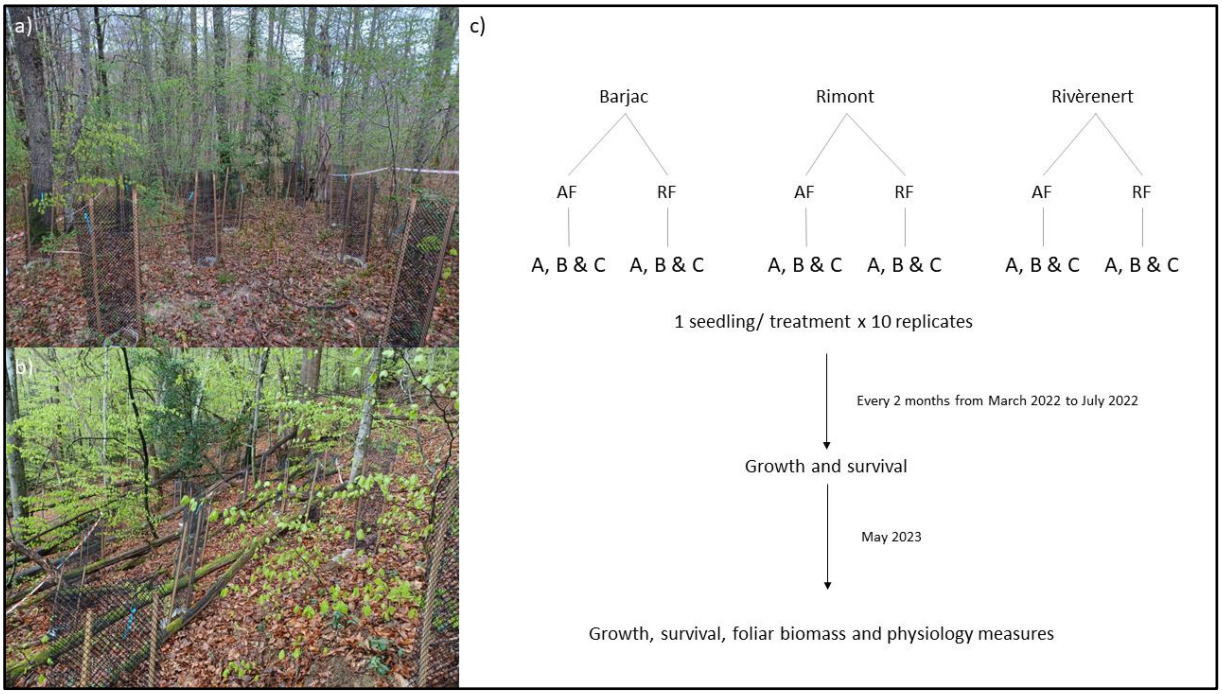


Figure 28- Implementation of the device in a) recent forest and b) in ancient forest, and c) experimental scheme showing the distribution of treatments A (+ roots/+ CMN), B (- roots/+ CMN) and C (- roots/- CMN) in the ancient (AF) and recent (RF) forests of each village (Barjac, Rimont and Rivèrenert).

IV.2.5. Response of saplings to CMN exclusion

Growth and above-ground measures were recorded several times (T0: March 2022, T1: May 2022, T3: July 2022 and T4: May 2023) during the experiment. During each measurement campaign, the height and diameter of the seedling were measured using a caliper, starting 5 cm above the ground. The leaf area of each seedling was estimated using photographs taken with a pouch as a yellow background and a ruler as a scale. Then, GIMP 2.10.32 (Solomon, 2009) was used to recover the green colour (channel A) while eliminating the other colours. The image obtained was then converted into a binary image (black and white) using ImageJ 1.53s software (Abràmoff *et al.*, 2004) to estimate the leaf area of the seedling in cm^2.

The chlorophyll content of each seedling was measured using a SPAD ("Soil And Plant Analyze Developments"). The main advantage of this instrument is that it is non-destructive and portable. Measurements were taken on the last three mature leaves and then averaged for each seedling. Chlorophyll content is correlated with the plant's nitrogen supply (Soing *et al.*, 2002). The leaves used to measure chlorophyll were used to calculate the dry matter content (LDMC). The LDMC is the ratio

of the dry mass (g) to the fresh mass (g) of the leaf. The leaves were placed in airtight plastic bags containing 2cm of water to keep them turgid. The dry biomass was obtained by placing the leaves in an oven at 65°C for 72 hours.

In order to observe a potential limitation of hydric stress in the seedling with the help of CMNs, we compared the foliar $\delta^{13}C$ of seedlings in contact with a CMN potential and seedlings isolated from any interaction as advised by Booth and Hoeksema (2010). At the same time, we also compared $\delta^{15}N$, which corresponds to "an isotope ratio relative to the atmospheric air standard, and R_{sample} and $R_{standard}$ are the molar ratios of the heavier to the lighter isotope" (Evans, 2001). In natural conditions, it is accepted that the nitrogen source in the soil is preserved during the plant's internal processes (Evans, 2001). The $\delta^{15}N$ of leaf tissue therefore refers to that of the soil nitrogen source. When inorganic nitrogen is abundant in the soil, plants do not need mycorrhizae to acquire it. However, when nitrogen is limiting, plants need mycorrhizae to acquire it, resulting in a lower $\delta^{15}N$ for the plant (Evans, 2001).

Finally, to evaluate if the CMN exclusion resulted in a change of fungal community, and notably of ECM diversity and abundance, root samples were collected – targeting root tips. Considering that many seedlings were obviously dead at the end of the experiment, the sampling targeted rather plot than individual level. Root system from different seedlings of the same experiment were pooled at the plot level, and separated between seedlings showing a photosynthetic activity, and seedlings obviously recently dead, after the severe drought events.

IV.2.6. Response of soils and carbon storage to CMN exclusion

To estimate the carbon stock in the soils from the experiment, we measures (1) the total C content of the soil and (2) the bulk density of the soil in the target horizon (Basile-Doelsch *et al.*, 2023). The sampling campaign took place prior to the experiment in 2022. Carbon stocks were evaluated at the plot level, from 5 sampling points located at the center and the four corners of the plot. At the end of the experiment, carbon stock was measured from the experimental cylinder. In each case, soil samples were taken using a cylinder of known volume (251.2 cm^3, height= 5cm; radius= 4cm). In the end, 150 soil samples were taken. They were then stored for one month in a cold room at 5°C before being placed in a proofer oven for 48 hours at 105°C. Fresh and dry weights were measured for each sample.

IV.2.7. Molecular biology and sequencing for soil and root associated fungi

For soil composite samples collected prior to the experiment, environmental DNA was extracted using the Macherey-Nagel NucleoSpin R Soil kit according to the recommendations of previous articles on ancient forest soils (Mennicken *et al.*, 2020). For fine root samples collected prior

and at the end of the experiment, fungal DNA was extracted with a Wizard Genomic DNA Purification Kit following the manufacturer's instructions. Negative DNA extraction controls were performed for each extraction run. A 100µL quantity of DNA was extracted and stored at -20°C. The ITS1 was amplified (Fwd: ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG from Epp *et al.* (2012) and a modified version of Rev:5.8S_Fungi CAAGATCCGTTGTTGAAAGTK, Taberlet *et al.* (2018)). In order to recognize different samples during bioinformatics processing, at each PCR, a unique combined primer set of eight nucleotide markers were used as recommended by Taberlet *et al.* (2018). Each PCR was duplicated with a different primer pair and positive and negative controls were included. For each PCR plate, wells were left empty with the aim of preserving any unused tag clusters and observing likely tag skips, allowing for a negative sequencing control. The PCR protocol is identical to that of Nagati *et al.* (2018). PCR products were finally pooled and sent for MiSeq sequencing (V3 technology, 2*250 bp) at GeT-PLaGe (Toulouse).

IV.2.8. Bioinformatics on fungal sequences from soil and experiment

The raw sequences (.fastq) were analysed with OBItools (Boyer *et al.*, 2016) using the GenoToul cluster (Toulouse, France) following the guidelines of Mennicken *et al.* (2020). Sequences that were not aligned between the R1 and R2 files were discarded, as well as sequences with a qphred score of less than 50, shorter than 60 nucleotides and occurring only once (singletons). A threshold value of 97% (Nilsson *et al.*, 2008) was used to define the MOTUs during the clustering stage with the "sumaclust" function (Mercier *et al.*, 2013). The ecotag function (Boyer *et al.*, 2016) was used to assign MOTUs taxonomically by comparing our sequences with GenBank reference sequences, and reporting the most probable species, genus, family and order assignation. Potential contaminants were removed using the metabaR package (Zinger *et al.*, 2021) and all sequences detected as non-fungal and over-represented in the negative controls were removed. The FUNGUILD database (Nguyen *et al.*, 2016) was used to assign trophic guilds to the MOTUs defined at the species and genus level, and therefore to identify ECM MOTUs.

IV.2.9. Statistical analysis

All statistical analysis were performed with RStudio 4.1.0 software (R Core Team, 2021). First, to compare the fungal communities between recent and ancient forests, and evaluate if our sampling was comprehensive at the plot level, the sample coverage was calculated for each plot following Chao and Jost (2012). Sample covers were calculated using iNEXT software (Hsieh *et al.*, 2016).

For each pair of ancient and recent forests, the species richness at the plot level was measured, and Venn diagram were computed to evaluate how far ancient and recent forests shared their fungal and ECM community, using the package VennDiagram (Hanbo, 2022). At the sample level,

the fungal and ECM diversity was also compared through an ANOVA, allowing to test the temporal continuity effect.

Generalized linear mixed models were used to test whether seedling survival and ecophysiological characteristics were affected by ancient or recent forests, and experimental treatments. The interaction of plot and treatment was designated as a random effect, whereas variables such as temporal continuity and the interaction of temporal continuity and treatment were considered fixed effects. The distributions used for the linkage regressions were the gaussian (Growth rate, Leaf Surface, Chlorophyll), binomial (Survival) and beta distributions (LDMC). Then, as there was no effect of temporal continuity at the end of the experiment, an ANOVA was carried out for each response variable in order to take into account only the effect of the treatments. Post-hoc tests were verified using the Waller-Duncan test. The packages used were lme4 (Bates *et al.*, 2015), glmmTMB (Brooks *et al.*, 2017), DHARMa (Hartig, 2022) and agricolae (de Mendiburu, 2023).

IV.3. Results

IV.3.1. Environmental characteristics of ancient and recent forest soils

There were no significant differences in the environmental characteristics of ancient and recent forest soils (Tableau 2).

Tableau 2- Difference in environmental characteristics between ancient and recent forests. The differences were tested with an ANOVA.

	df	SS	F	p-value
a) Forest stand structure (n=6)				
Canopy Closure (%)	1	4,4	0,235	0,653
Modified Canopy Index	1	30,24	1,694	0,263
b) Soil physico-chemical parameters (n=6)				
pH	1	0,1873	1,452	0,295
Phosphorus	1	0,0024	0,649	0,466
CEC	1	8,38	0,45	0,539
Nitrogen	1	0,006	0,006	0,941
Carbon	1	661,7	1,679	0,265
Total Organic Carbon	1	661,7	1,679	0,265
C/N ratio	1	29,04	1,393	0,303
Organic Matter	1	1984	1,684	0,264
c) Bioclimatic variables (n=6)				
Annual Mean Temperature	1	0,454	0,279	0,625
Mean Diurnal Range	1	0,123	0,067	0,809
Isothermality	1	0,13	0,014	0,911
Temperature Seasonality	1	0,00667	0,271	0,63
Max Temperature of Warmest Month	1	0,882	0,31	0,607
Min Temperature of Coldest Month	1	3,067	2,08	0,223
Temperature Annual Range	1	0,68	0,228	0,658

The environmental parameters were summarized in the form of a principal component analysis (Figure 29). The majority of the pairs of sites had similar environmental conditions, except for the Rivèrenert plots. The first two dimensions explained 49.9% and 34.5% respectively of the total variation. The first axis is mainly explained by organic matter content, total carbon, temperature annual range, mean diurnal range and isothermality. The forest plots at Barjac and the recent plot at Rivèrenert stand out because they have a higher temperature than the others located at a higher altitude. The difference between these sites is also due to the carbon content, which is higher in the higher altitude plots. The second axis is mainly explained by phosphorus content and temperature. Unlike the other plots, the recent forest plot at Rivèrenert has a higher phosphorus content and a lower annual temperature.

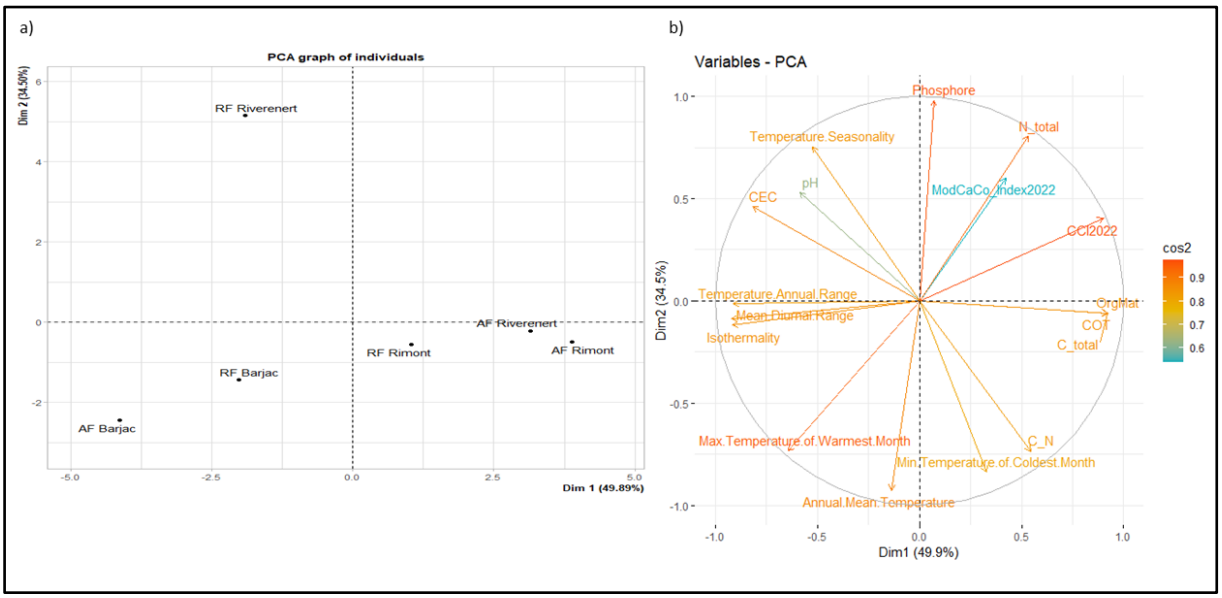


Figure 29- Results of principal component analysis with a) representation of forest plots and b) representation of the squared cosines of the variables.

IV.3.2. Fungal diversity in ancient and recent forest soils

After the various bioinformatics filters, 1,728,657 sequences were conserved and clustered in 3,114 fungal MOTUs (at 97% threshold). The average species richness per plot in ancient forest was 200 MOTUs (minimum 73 and maximum 341). In recent forest, the average species richness per plot in ancient forest was 238 MOTUs (minimum 70 and maximum 473) The sampling coverage in ancient forest was high – reaching 87% in average at the site level (minimum 87% and maximum 88%). In recent forest, the sampling coverage was 87% (minimum 84% and maximum 88%) Thanks to the taxonomic assignation, a trophic mode was attributed to 51% of the MOTUs representing 79% of the sequences, allowing to identify 736 ECM MOTUs (1,198,089 sequences, i.e. 69% of the sequences, from our dataset). At the site level, the distribution of MOTUs between ancient and recent forest revealed both shared and non-shared MOTUs for each pair of site (Figure 30a). For ECM fungi, all the

ancient forests had a higher number of non-shared MOTUs than the recent forests (Figure 30b). However, there was no significant effect of temporal continuity on fungal and ECM diversity.

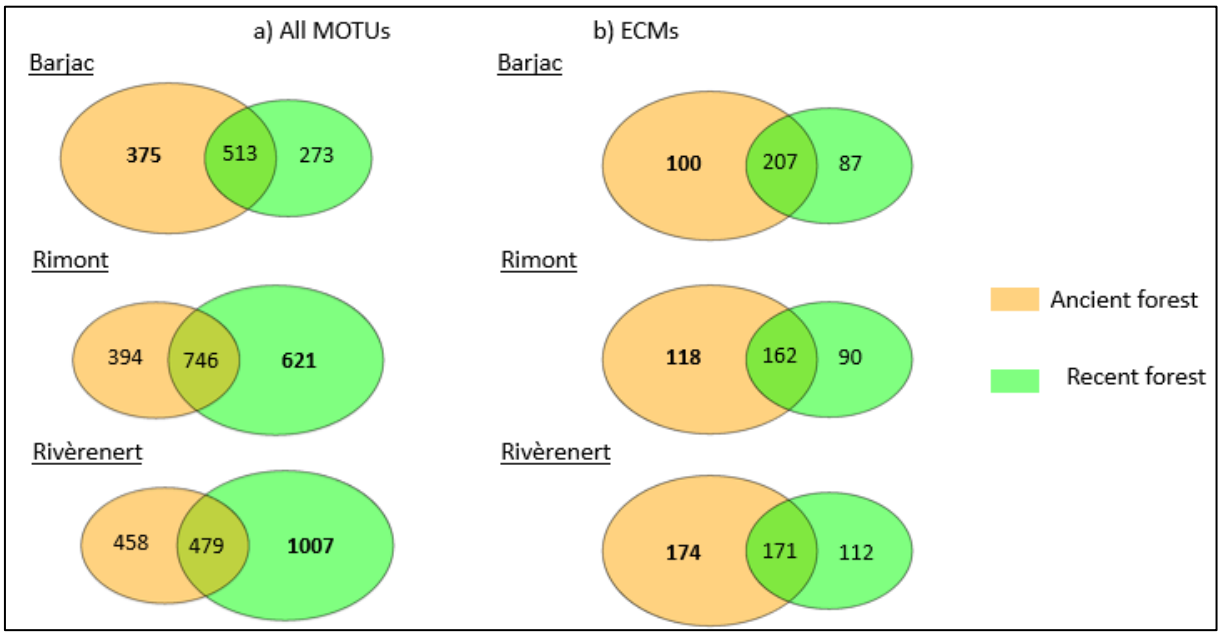


Figure 30- Venn diagrams for a) all fungal MOTUS and b) ectomycorrhizal MOTUs according to their distributions in ancient and recent forest.

IV.3.3. Response of seedlings to CMN exclusion

a) Seedling survival

Of the 180 seedlings planted in March 2022, 94 seedlings had survived after the summer 2022, i.e. 52% of the planted seedlings (Figure 31a). A significant positive effect of temporal continuity on survival was observed (p-value= 0.0026) in summer 2022 (Tableau 3). At the end of the experiment in May 2023, and after both summer and winter drought periods, 39 seedlings were still alive, equivalent to 22% of the seedlings planted (Figure 31b) and there was no longer any significant effect of temporal continuity on seedling survival (Tableau 3). For the two periods, there was no significant effect of the forest * treatment interaction (Tableau 3). In summer 2022 as in spring 2023, there was no significant effect of treatments alone on seedling survival (p-value= 0.9781 and p-value = 0.5048 respectively).

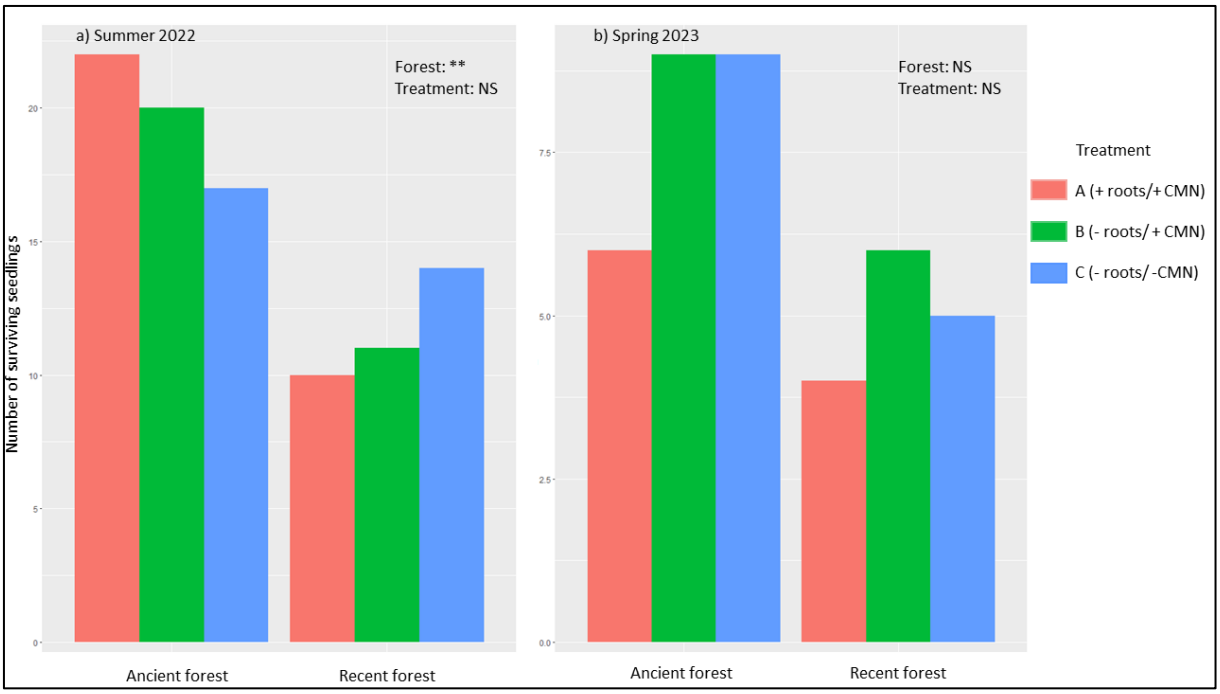


*Figure 31- Number of seedlings surviving in a) summer 2022 and b) spring 2023 according to the type of forest and the treatments A (red), B (green) and C (blue). The significance of the factor is expressed (NS=p>0.05; * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)*

b) Growth rate

The growth rate was lower in recent forest than in ancient forest for the 2 periods (summer 2022 and spring 2023) but the effect of temporal continuity remained non-significant (Tableau 3, Figure S6). The temporal continuity * treatment interaction did not significantly influence growth either (Tableau 3, Figure S6). Seedling growth was negatively influenced only in ancient forest with treatment C (- roots/-CMN) during the experiment (March 2022-May2023) (Tableau 3, Figure S6). Treatments alone also did not significantly influence growth in summer 2022 (p-value = 0.8701) nor spring 2023 (p-value = 0.7844) (Figure 32).

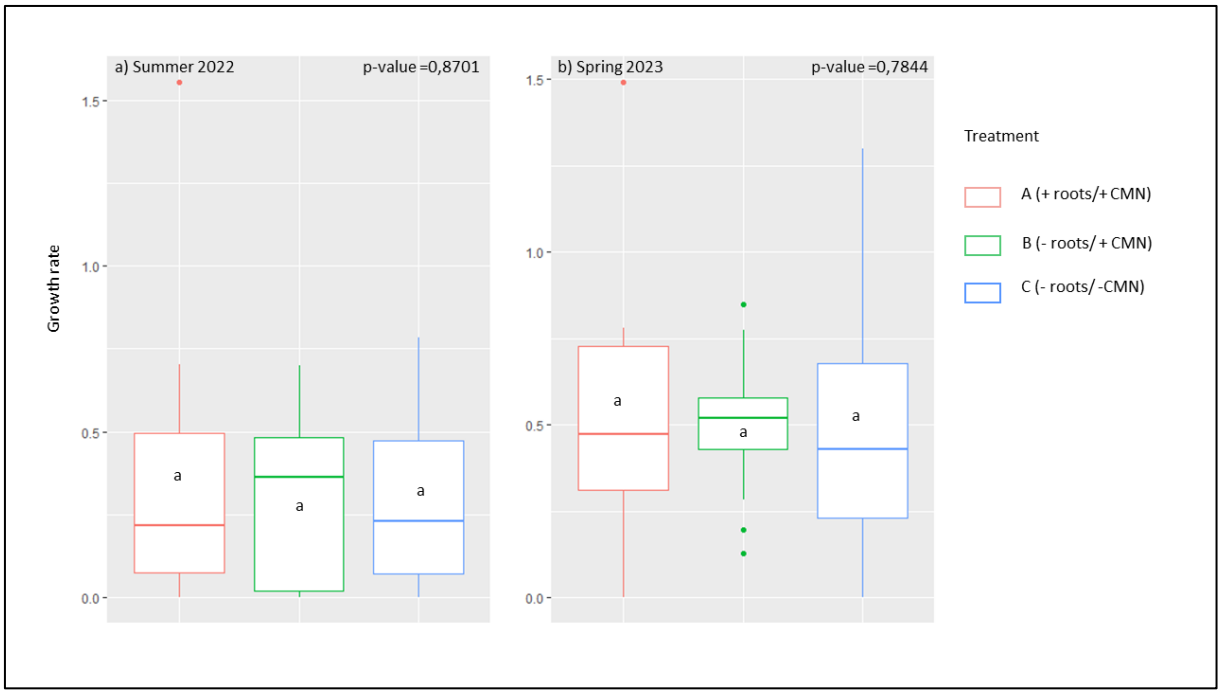


Figure 32- Growth rates in a) summer 2022 and b) spring 2023 according to treatments A (red), B (green) and C (blue). The displayed p-value is the result of the ANOVA (parametric or non-parametric).

c) Ecophysiological

Leaf area was positively influenced by treatments B (- roots/+ CMN) and C (- roots/- CMN) (Tableau 3, Figure S6) but not by the temporal continuity. Leaf area was higher for treatment B (- roots/+ CMN) in ancient forests, but this was not significant (Tableau 3, Figure S6), and temporal continuity did not influence significantly this parameter. In general, without taking into account the temporal continuity, leaf area was significantly greater with treatments B (- roots/+ CMN) and C (- roots/- CMN) (p-value= 0.0487) than for treatment A (+ roots/+ CMN) (Figure 33).

The temporal continuity had no significant influence on the LDMC (Tableau 3, Figure S7). However, there was a positive trend for treatments B (- roots/+ CMN) and C (- roots/- CMN) on the LDMC in ancient forest only (Tableau 3, Figure S6). Treatments alone had no significant effect on the LDMC (p-value= 0.499) (Figure 33).

The chlorophyll content was not significantly different between ancient and recent forests (Tableau 3, Figure S6). In general, the chlorophyll content of seedlings in treatment A (+ roots/+ CMN) was lower than other seedlings. In general, without taking into account the temporal continuity, chlorophyll content was not significantly different between treatments (p-value = 0.1685) (Figure 33).

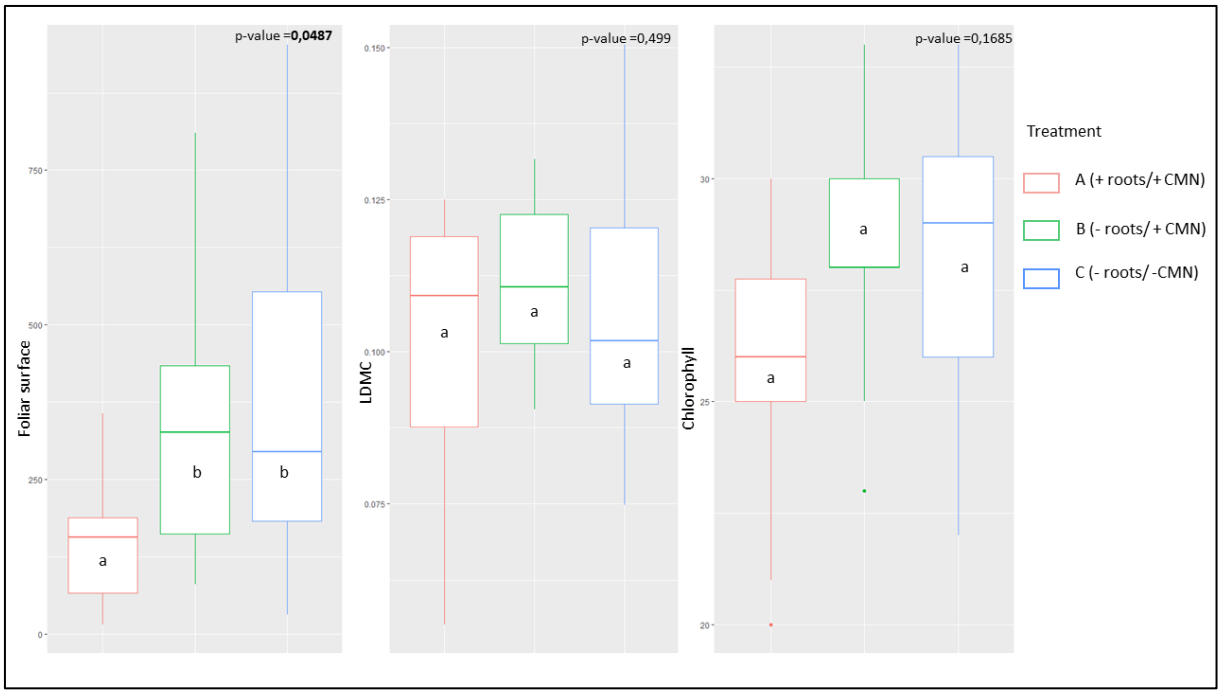


Figure 33- Responses of ecophysiological variables (Foliar surface, LDMC and Chlorophyll content) according to treatments. The displayed p-value is the result of the ANOVA (parametric or non-parametric).

*Tableau 3- Results of the regressions (linear or general linear models; see the text for further details) of survival and growth characteristics measured on the seedling with the age of the forest and the treatments. The data represented are the t and z values. Values in bold are significant. (.=p<0.1 * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001).*

	Intercept	ForestRF	ForestAF:TreatmentB	ForestRF:TreatmentB	ForestAF:TreatmentC	ForestRF:TreatmentC	Damaged
				a) Survival			
Summer 2022	**2.45(*)**	**-3.011 (**)**	-0.563	0.271	-1.343	1.05	
Spring 2023	**-3.037 (**)**	-0.689	0.89	0.689	0.89	0.361	
				b) Growth rate			
Summer 2022	**4.247 (***)**	-1.799	0.072	0.192	-0.784	0.773	
Spring 2023	-1.816 (.)	-1.359	0.771	0.501	-1.307	0.83	
				c) LDMC			
Spring 2023	**-21.964 (***)**	0.384	1.818 (.)	0.656	1.782 (.)	-0.993	-0.64
				e) Leaf Surface			
Spring 2023	1.977 (.)	-0.301	1.363	1.828 (.)	1.421	1.402	-1.229
				d) Chlorophyll			
Spring 2023	**20.2 (***)**	-0.855	-1.171	1.486	1.669	1.552	0.768

IV.3.4. Response of soils to CMN exclusion

This section is waiting for the results – to be finished after the PhD defense.

IV.4. Discussion

Our study, focused on the experimental test of CMN functioning in ancient and recent forests of SW France, started with the comparison of fungal and ECM communities and their abiotic environment. While several articles have pointed out the major difference in soil characteristics (Berges & Dupouey, 2021), we did not confirm this trend at a very short distance. We observed a high diversity of MOTUs based on only 6 sites, and only a higher diversity of ECM in ancient forest soils. We agree more sites shall be compared to really investigate the effect of the temporal continuity – but our punctual results illustrate the importance of exploring the huge heterogeneity of ancient forest soils in Europe.

Contrary to our hypothesis, the study of survival and growth of young beech (*Fagus sylvatica*) seedlings in ancient and recent forests did not reveal a positive effect of functional CMNs, at least based on our experimental design. Recently, Karst *et al.* (2023) argued that studies on CMNs have never fully demonstrated (1) an exchange of resources from one root system to another thanks to CMNs, (2) that the formation of an CMN influences the growth and survival of the seedling and (3) mature trees supply essential nutrients to their offspring via CMNs. The results of our study are consistent with these conclusions. In our case, seedling survival was significantly higher in ancient forest than in recent forest only at the start of the experiment (summer 2022). Nevertheless, by the end of the experiment, seedling survival had fallen sharply, in both ancient and recent forests. The heatwave during the summer of 2022 in SW France that affected all our sites could possibly explain this high mortality, whatever the treatment, and clearly questions the drought resistance of beech, at least at the seedling stage.

While our results did not point out a positive effect of CMN, seedlings growing in root exclusion treatment showed a higher leaf area compared to other seedlings. Root competition is harmful to plants and can alter their physiology (Wang *et al.*, 2008) and beech seedlings are known to be sensitive to root competition, particularly with grasses (Harmer, 1996; Coll *et al.*, 2003; Coll *et al.*, 2004). Similar experiments testing for CMN effect have also concluded that root exclusion result in a positive effect, even higher than CMN effect (Booth & Hoeksema, 2010). Our study therefore confirms the importance of including this modality in CMN experiments. Moreover, our major limitation was statistical, due to the low survival, and invite to design differently CMN experiments, notably by considering a higher number of seedlings to be planted and monitored.

In conclusion, our results do not show an effect of CMNs on the survival and growth of beech seedlings in ancient nor in recent forests. These results add to the recent conclusions of Karst *et al.* (2023), but invite to follow seedlings growth in ancient forests, notably to evaluate if ECM associations could contribute to increase their growth and drought resistance, outside of experiments.

Références

Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**(7): 36-42.

Alaux PL, Zhang Y, Gilbert L, Johnson D. 2021. Can common mycorrhizal fungal networks be managed to enhance ecosystem functionality? *Plants, People, Planet*.

Anthony MA, Crowther TW, van der Linde S, Suz LM, Bidartondo MI, Cox F, Schaub M, Rautio P, Ferretti M, Vesterdal L, et al. 2022. Forest tree growth is linked to mycorrhizal fungal composition and function across Europe. *Isme Journal* **16**(5): 1327-1336.

Basile-Doelsch I, Chevallier T, Dignac M-F, Erktan A 2023. Carbon storage in soils. In: Goss MJ, Oliver M eds. *Encyclopedia of Soils in the Environment (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 228-242.

Bates D, Machler M, Bolker BM, Walker SC. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**(1): 1-48.

Berges L, Dupouey JL. 2021. Historical ecology and ancient forests: Progress, conservation issues and scientific prospects, with some examples from the French case. *Journal of Vegetation Science* **32**(1): 17.

Boeraeve M, Honnay O, Mullens N, Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Thomaes A, Jacquemyn H. 2018. The impact of spatial isolation and local habitat conditions on colonization of recent forest stands by ectomycorrhizal fungi. *Forest Ecology and management* **429**: 84-92.

Booth MG, Hoeksema JD. 2010. Mycorrhizal networks counteract competitive effects of canopy trees on seedling survival. *Ecology* **91**(8): 2294-2302.

Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources* **16**(1): 176-182.

Brooks ME, Kristensen K, van Benthem KJ, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, Skaug HJ, Machler M, Bolker BM. 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R Journal* **9**(2): 378-400.

C3S 2022. OBSERVER: a wrap-up of Europe's summer 2022 heatwave: Copernicus Climate Service.

Cateau E, Larrieu L, Vallauri D, Savoie J-M, Touroult J, Brustel H. 2015. Ancienneté et maturité: deux qualités complémentaires d'un écosystème forestier. *Comptes rendus biologies* **338**(1): 58-73.

Chao A, Jost L. 2012. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* **93**(12): 2533-2547.

Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O, Dahlberg A, Ekblad A, Wallander H, Stenlid J, Finlay RD, Wardle DA, Lindahl BD. 2013. Roots and Associated Fungi Drive Long-Term Carbon Sequestration in Boreal Forest. *Science* **339**(6127): 1615-1618.

Coll L, Balandier P, Picon-Cochard C. 2004. Morphological and physiological responses of beech (Fagus sylvatica) seedlings to grass-induced belowground competition. *Tree Physiology* **24**(1): 45-54.

Coll L, Balandier P, Picon-Cochard C, Prevosto B, Curt T. 2003. Competition for water between beech seedlings and surrounding vegetation in different light and vegetation composition conditions. *Annals of Forest Science* **60**(7): 593-600.

Compton JE, Boone RD. 2000. Long-term impacts of agriculture on soil carbon and nitrogen in New England forests. *Ecology* **81**(8): 2314-2330.

de Mendiburu F 2023. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-6.

Dhote J-F, Vallet P, de Coligny FR, Leban J-M, Meredieu C, Deleuze C, Jarret P, Bouillet J-P, Laclau J-P 2015. Forêts anciennes et stockage de carbone. *CGAAER, Groupe Forêt-Bois, Audition*. Paris, France. 50 slides. hal-01580730

Donald J, Murienne J, Chave J, Iribar A, Louisanna E, Manzi S, Roy M, Tao SL, Orivel J, Schimann H, et al. 2021. Multi-taxa environmental DNA inventories reveal distinct taxonomic and

functional diversity in urban tropical forest fragments. *Global Ecology and Conservation* **29**: 13.

Dupouey J-L, Bachacou J, Cosserat R, Aberdam S, Vallauri D, Chappart G, Corvisier de Villèle M-A. 2007. Vers la réalisation d'une carte géoréférencée des forêts anciennes de France. *Le Monde des cartes* **191**: 85-98.

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP, Haile J, Esposito A, Riaz T, Erseus C, Gusarov VI, Edwards ME, Johnsen A, et al. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* **21**(8): 1821-1833.

Evans RD. 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science* **6**(3): 121-126.

Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant biology* **40**(1): 503-537.

Farquhar GD, Sharkey TD. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **33**: 317-345.

Fick SE, Hijmans RJ. 2017. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*.

García de Jalón L, Limousin J-M, Richard F, Gessler A, Peter M, Hättenschwiler S, Milcu A. 2020. Microhabitat and ectomycorrhizal effects on the establishment, growth and survival of Quercus ilex L. seedlings under drought. *Plos One* **15**(6): e0229807.

Géoportail 2023. Carte.

Hanbo C 2022. VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots. R package version 1.7.3.

Harmer R. 1996. Growth of seedling tree root-systems in competition with grasses. *Aspects of Applied Biology* **44**: 47-54.

Hartig F. 2022. DHARMa: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. *R package version 0.4.5*.

Hoeksema JD 2015. Experimentally testing effects of mycorrhizal networks on plant-plant interactions and distinguishing among mechanisms. In: Horton TR ed. *Mycorrhizal networks*. Dordrecht: Springer, 255-277.

Hsieh TC, Ma KH, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* **7**(12): 1451-1456.

Karst J, Jones MD, Hoeksema JD. 2023. Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution* **7**(4): 501-+.

Koerner W, Dupouey JL, Dambrine E, Benoit M. 1997. Influence of past land use on the vegetation and soils of present day forest in the Vosges mountains, France. *Journal of ecology* **85**(3): 351-358.

Leuschner C, Wulf M, Bauchler P, Hertel D. 2014. Forest Continuity as a Key Determinant of Soil Carbon and Nutrient Storage in Beech Forests on Sandy Soils in Northern Germany. *Ecosystems* **17**(3): 497-511.

Liang MX, Johnson D, Burslem D, Yu SX, Fang M, Taylor JD, Taylor AFS, Helgason T, Liu XB. 2020. Soil fungal networks maintain local dominance of ectomycorrhizal trees. *Nature communications* **11**(1): 7.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of past and present-day landscape structure on forest soil microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 118.

Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E 2013. SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop. Abstract*: Citeseer. 27-29.

Nagati M, Roy M, Manzi S, Richard F, Desrochers A, Gardes M, Bergeron Y. 2018. Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal forest. *Plant and Soil* **432**(1-2): 345-357.

Nguyen NH, Song ZW, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241-248.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary bioinformatics* **4**: 193-201.

Pflug EE, Buchmann N, Siegwolf RTW, Schaub M, Rigling A, Arend M. 2018. Resilient Leaf Physiological Response of European Beech (Fagus sylvatica L.) to Summer Drought and Drought Release. *Frontiers in Plant Science* **9**: 11.

Piedallu C, Perez V, Gégout J-C, Lebourgeois FF, Bertrand R. 2009. Impact potentiel du changement climatique sur la distribution de l'Epicéa, du Sapin, du Hêtre et du Chêne sessile en France. *Revue forestière française* **61**(6): 567-593.

Policelli N, Horton TR, Hudon AT, Patterson TR, Bhatnagar JM. 2020. Back to Roots: The Role of Ectomycorrhizal Fungi in Boreal and Temperate Forest Restoration. *Frontiers in Forests and Global Change* **3**: 15.

Principe A, van der Maaten E, van der Maaten-Theunissen M, Struwe T, Wilmking M, Kreyling J. 2017. Low resistance but high resilience in growth of a major deciduous forest tree (Fagus sylvatica L.) in response to late spring frost in southern Germany. *Trees-Structure and Function* **31**(2): 743-751.

R Core Team R 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Raimbault A, Brin A, Manzi S, Savoie JM, Gandois L, Oliva P, Fogliani O, Roy-Camille C, Gratacap L, Roy M. 2024. Influence of habitat fragmentation and habitat amount on soil fungi communities in ancient forests. *Landscape Ecology* **39**(2): 1-16.

Rita A, Camarero JJ, Nole A, Borghetti M, Brunetti M, Pergola N, Serio C, Vicente-Serrano SM, Tramutoli V, Ripullone F. 2020. The impact of drought spells on forests depends on site conditions: The case of 2017 summer heat wave in southern Europe. *Global Change Biology* **26**(2): 851-863.

Simard S, Asay A, Beiler K, Bingham M, Deslippe J, He X, Philip L, Song Y, Teste F 2015. Resource transfer between plants through ectomycorrhizal fungal networks. In: Horton TR ed. *Mycorrhizal networks*. Dordrecht: Springer, 133-176.

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**(6642): 579-582.

Smith S, Read D, Read D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Soing P, Plénet D, Ramanamidona J-y. 2002. Fertilisation azotée du pêcher: utiliser un indice de teneur en chlorophylle (SPAD)? *Infos CTIFL*(181): 32-36.

Solomon RW. 2009. Free and open source software for the manipulation of digital images. *American Journal of Roentgenology* **192**(6): W330-W334.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*: Oxford University Press.

Tedersoo L, Bahram M, Ryberg M, Otsing E, Koljalg U, Abarenkov K. 2014. Global biogeography of the ectomycorrhizal/sebacina lineage (Fungi, Sebacinales) as revealed from comparative phylogenetic analyses. *Molecular Ecology* **23**(16): 4168-4183.

Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diedhiou AG, Henkel TW, Kjoller R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, et al. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **21**(17): 4160-4170.

Tedersoo L, Bahram M, Zobel M. 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science* **367**(6480): eaba1223.

Teste FP, Simard SW, Durall DM, Guy RD, Jones MD, Schoonmaker AL. 2009. Access to mycorrhizal networks and roots of trees: importance for seedling survival and resource transfer. *Ecology* **90**(10): 2808-2822.

Tichý L 2014. GLAMA-gap light analysis mobile application. Masaryk University, Department of Botany and Zoology.

Tichý L. 2016. Field test of canopy cover estimation by hemispherical photographs taken with a smartphone. *Journal of Vegetation Science* **27**(2): 427-435.

Vallauri D, Ducousso A, Persuy A, Teillac-Deschamps P. 2017. Ancienneté: perspectives pour la conservation des forêts. *Revue forestière française* **69**: 560-570.

Wang JW, Yu D, Wang Q. 2008. Growth, biomass allocation, and auto fragmentation responses to root and shoot competition in Myriophyllum spicatum as a function of sediment nutrient supply. *Aquatic Botany* **89**(4): 357-364.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F. 2021. metabaR: An r package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(4): 586-592.

Appendices

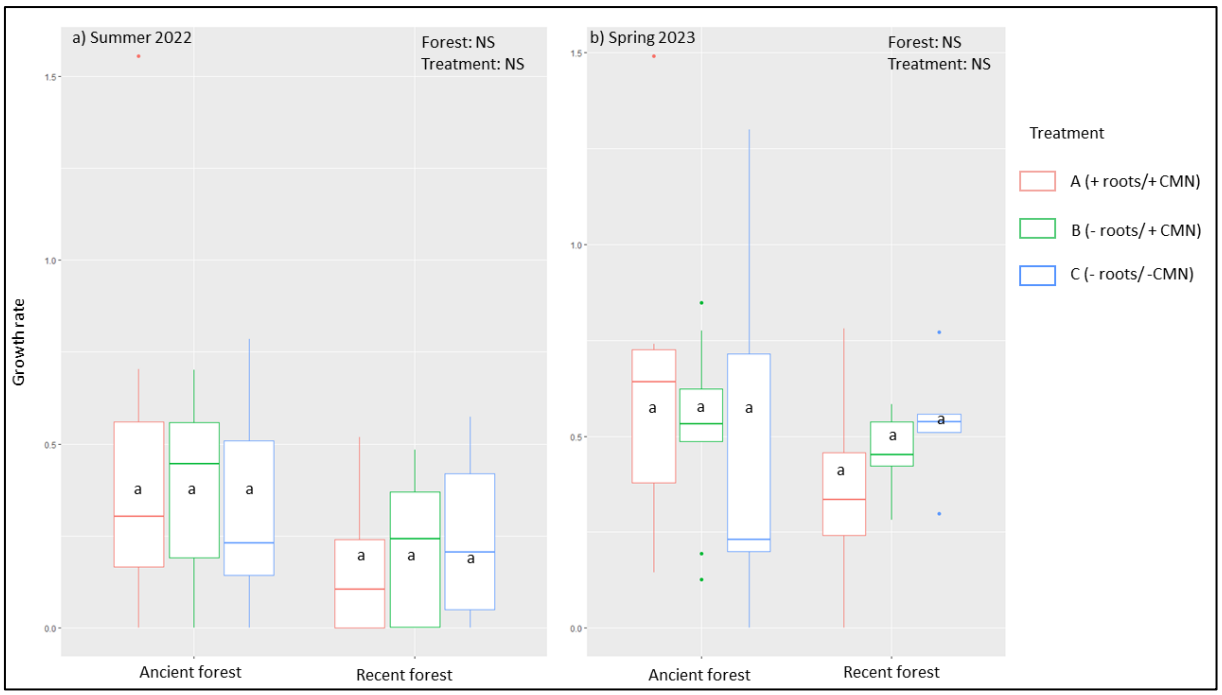


Figure S6- Growth rates in a) summer 2022 and b) spring 2023 according to the type of forest and the treatments A (red), B (green) and C (blue).

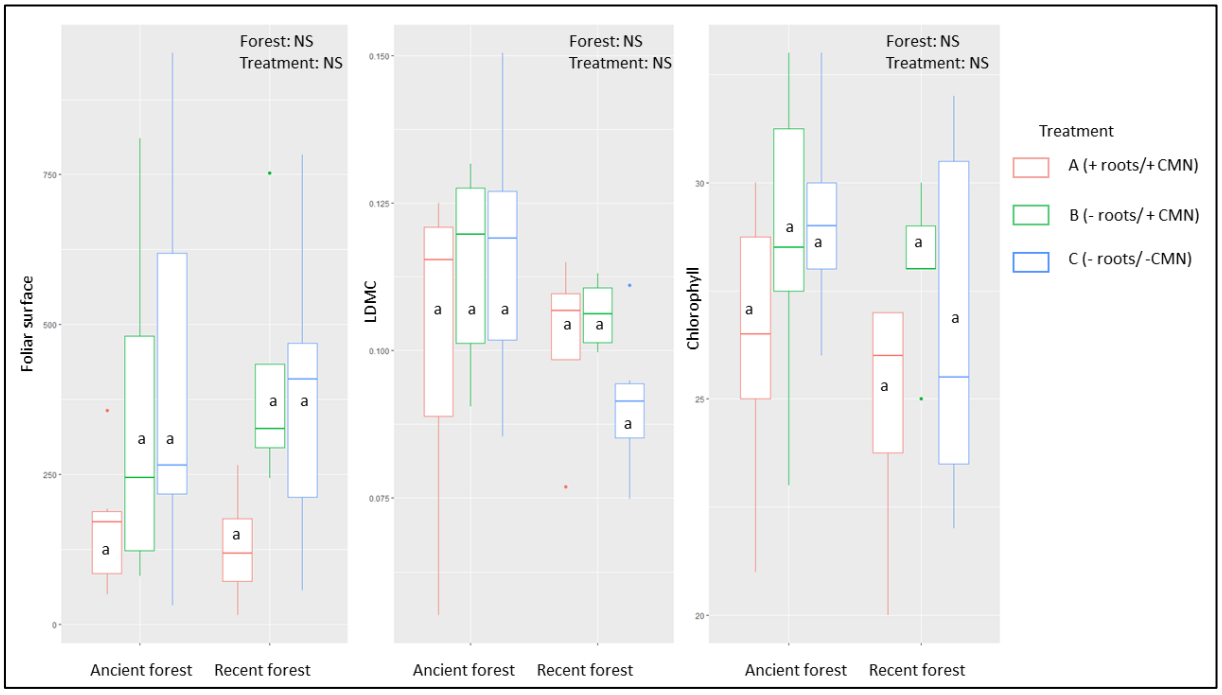


Figure S7- Responses of ecophysiological variables (Foliar surface, LDMC and Chlorphyll content) in a) summer 2022 and b) spring 2023 according to the type of forest and the treatments A (red), B (green) and C (blue).

Tableau S2- Environmental characteristics by plot (AF: ancient forest and RF: recent forest)

Environmental characteristics	Barjac (AF)	Barjac (RF)	Rimont (AF)	Rimont (RF)	Rivèrenert (AF)	Rivèrenert (RF)
Nb ECM	307	294	280	252	345	283
Nb Fungi	888	786	1140	1367	937	1486
CCl2022 (mean)	66,43	68,54	76,06	72,04	76,33	73,1
ModCaCo_Index2022 (mean)	40,4	52,05	50,59	49,19	49,71	52,93
pH	5,09	4,96	4,96	4,98	4,34	5,51
Phosphorus (g/kg)	0,02	0,02	0,07	0,07	0,06	0,18
CEC (cmol+/kg)	12,07	11,42	5,6	5,13	6,91	15,12
N total (g/kg)	2,18	2,3	3,83	2,88	3,71	4,35
C total (g/kg)	39,31	50,86	92,64	51,4	80,72	47,4
Total organic carbon (g/kg)	39,31	50,86	92,64	51,4	80,72	47,4
C/N	18	22,1	24,2	17,8	21,8	10,9
Organic matter (g/kg)	68	88	160	88,9	140	82
BIO1 (Annual Mean Temperature °C)	12,85	12,4	12,15	12,16	10,89	9,68
BIO2 (Mean Diurnal Range °C)	10,13	9,76	7,4	7,36	7,82	9,09
BIO3 (Isothermality %)	36,6	35,16	30,25	30,1	31,36	33,83
BIO4 (Temperature Seasonality %)	6,17	6	6,04	6,04	6	6,37
BIO5 (Max Temperature of Warmest Month °C)	29,14	27,54	25,82	25,82	25,62	24,92
BIO6 (Min Temperature of Coldest Month °C)	1,46	-0,22	1,37	1,37	0,66	-1,95
BIO7 (Temperature Annual Range °C)	27,68	27,77	24,45	24,45	24,95	26,88

V. Comment la qualité de l'habitat en forêt ancienne influence la biodiversité du sol ?



Préambule

Le troisième chapitre étudiera l'influence de la qualité de l'habitat en forêt ancienne sur la biodiversité du sol, en testant notamment les corrélations avec la caractérisation de l'indicateur de biodiversité potentielle, l'IBP.

Il est prévu de soumettre ces résultats préliminaires à la Revue forestière française pour interroger l'intérêt et les limites de l'IBP pour la biodiversité du sol. Par la suite, il est prévu d'approfondir les résultats en rajoutant des sites forestiers plus matures. Les nouveaux sites incluraient des parcelles forestières de montagne et des parcelles de forêts françaises et roumaines classées patrimoine mondial de l'UNESCO.

Influence de la qualité écologique des forêts anciennes sur la diversité taxonomique locale du sol

Auteurs/Autrices

Alexandre Raimbault[1,2], Mélanie Roy[3,4,5], Coralie Roy-Camille[3], et Antoine Brin[1,2]

[1]Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Université de Toulouse, Toulouse, France

[2]DYNAFOR, INRAE, Castanet-Tolosan, France

[3]EDB, Université Paul-Sabatier Toulouse III, CNRS, Toulouse, France

[4]IRL IFAECI Instituto Franco-Argentino para el Estudio del Clima y sus Impactos, CNRS, CONICET, UBA, IRD, Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina

[5]Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue (UQAT), Rouyn-Noranda, Canada

Corresponding author: raimbault.alexandre1@gmail.com

ORCID Numbers

Alexandre Raimbault 0009-0006-9584-0732

Antoine Brin 0000-0003-3479-3005

Coralie Roy-Camille 0009-0000-2014-611X

Mélanie Roy 0000-0002-4565-2331

Résumé

La biodiversité du sol est essentielle dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers en intervenant par exemple à différentes étapes dans le cycle trophique. Alors que la biodiversité du sol est sensible à la gestion forestière et la structure du peuplement, elle est difficilement prise en compte dans les inventaires de biodiversité forestière.

L'objectif de cette étude est de tester la pertinence pour la biodiversité du sol d'un indicateur de biodiversité basé sur des attributs structuraux de l'écosystème forestier.

A l'aide de l'ADN environnemental issu d'échantillons de sol, nous avons estimé la diversité locale des communautés d'eucaryotes de 43 parcelles de forêt ancienne du sud-ouest de la France. Les parcelles ont été décrites à l'aide de l'Indice de Biodiversité Potentiel et des analyses de sol ont permis de compléter le jeu de variables prédictives.

L'influence de la qualité de l'habitat varie selon les phylums étudiés. Les champignons et les métazoaires répondaient positivement et négativement aux variables descriptives du peuplement forestier. A l'inverse, les protistes ne répondaient qu'aux variables édaphiques. Parmi les variables liées à la structuration du peuplement, le bois mort debout, le nombre de genres d'arbres indigènes, le nombre de milieux ouverts influençaient significativement la richesse taxonomique du sol.

Nos résultats démontrent la forte variabilité des différents phylums à la qualité de l'habitat, et mettent en évidence l'intérêt et les limites de l'IBP pour appréhender la diversité taxonomique des sols forestiers.

Mots-clés : eucaryote, forêts, peuplement, indicateur, IBP

V.1.Introduction

Les forêts assurent de nombreux services écosystémiques cruciaux comme la séquestration du carbone, la régulation du climat, une protection face aux perturbations météorologiques (tempêtes et inondations), l'approvisionnement et la purification de l'eau (Bauhus *et al.*, 2010 ; Thompson *et al.*, 2011 ; Decocq *et al.*, 2016 ; Brockerhoff *et al.*, 2017 ; Mori *et al.*, 2017). Elles abritent aussi de nombreux groupes taxonomiques terrestres et aquatiques (Thompson *et al.*, 2009 ; Gibson *et al.*, 2011). Parmi ces groupes taxonomiques, la biodiversité du sol est essentielle au fonctionnement des forêts (Kautz & Topp, 1998 ; Carcamo *et al.*, 2001 ; Gonzalez & Seastedt, 2001 ; Smith, S *et al.*, 2008 ; Sterkenburg *et al.*, 2015). De plus, ces organismes ont un rôle non-négligeable dans la structuration des réseaux trophiques (Clarholm, 1985 ; Wasilewska, 1997 ; Bonkowski, 2004 ; Vasutova *et al.*, 2019) et plus généralement sur les interactions inter-espèces.

Durant ces dernières décennies, l'utilisation du metabarcoding de l'ADN environnemental s'est fortement développée (Ogram *et al.*, 1987 ; Giovannoni *et al.*, 1990 ; Handelsman *et al.*, 1998 ; Faure & Joly, 2016 ; Taberlet *et al.*, 2018). Le metabarcoding de l'ADNe couplé au séquençage à haut débit offre des possibilités immenses en écologie (Zinger *et al.*, 2019) et peut-être considéré comme une technique révolutionnaire (Zinger *et al.*, 2021) pour la recherche fondamentale et la surveillance des espèces (Thomsen & Willerslev, 2015; Creer *et al.*, 2016; Bohan *et al.*, 2017; Taberlet *et al.*, 2018), et notamment la conduite d'études multi-taxa (Donald *et al.*, 2021) . Il est désormais possible d'étudier les changements dans les communautés d'organismes du sol à large échelle et dans un temps raisonnable (Mennicken *et al.*, 2020 ; Seppey *et al.*, 2020 ; Seppey *et al.*, 2023) suite à des modifications des conditions biotiques et abiotiques de l'écosystème.

Depuis 1993, la diversité forestière doit être préservée dans les forêts gérées et la gestion forestière doit s'inscrire dans la durabilité (FAO, 1999; FAO, 2015). Cependant, il est difficile de surveiller et de faire des inventaires exhaustifs de la biodiversité en forêts (Zeller *et al.*, 2023). Le développement d'indicateurs est nécessaire pour faciliter l'évaluation et la prise en compte de la biodiversité forestière dans les plans de gestion forestière (Morelli, 2015). Les indicateurs peuvent être fondés sur des ensembles d'espèces spécifiques ou des paramètres indirects comme la structure des peuplements forestiers (Zeller *et al.*, 2023). Néanmoins pour les non-spécialistes, il peut être difficile d'utiliser des indicateurs basés sur l'identification d'espèces forestières telles les champignons, plantes vasculaires, bryophytes, lichens et invertébrés (Ćosović *et al.*, 2020). A l'inverse, les paramètres structurels du peuplement comme la présence de grands arbres, le recouvrement de la canopée et la présence de bois mort sont facilement identifiables pour les non-professionnels et peuvent être disponibles dans les inventaires forestiers (Ferris *et al.*, 2000 ;

Angelstam & Dönz-Breuss, 2004 ; Smith, GF *et al.*, 2008 ; Torras & Saura, 2008 ; Coote *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2014).

Larrieu and Gonin (2008) ont proposé un indice qui permet d'appréhender la biodiversité potentielle d'une forêt (IBP) en se basant sur les paramètres structurels du peuplement et du contexte. Cet indice est composé de 10 facteurs divisés en deux catégories. Les sept premiers facteurs liés aux peuplements et à la gestion forestière sont le nombre d'essences autochtones, la structure verticale de la végétation, la quantité de gros bois mort (debout ou au sol), la quantité de très gros bois vivants, les milieux ouverts et la présence de dendromicrohabitats. Les trois derniers facteurs liés au contexte correspondent à la continuité temporelle de l'état boisé, à la présence de milieux aquatiques ou rocheux (Larrieu & Gonin, 2008). La pertinence de cet indice a pu être éprouvée vis-à-vis de nombreux taxons comme les chauves-souris, oiseaux, les champignons du bois mort, les punaises, les lichens, les plantes vasculaires, les coléoptères saproxyliques et les papillons de nuit (Larrieu *et al.*, 2019 ; Zeller *et al.*, 2022). L'IBP ne prend pas explicitement en compte des attributs liés au sol et il n'a pas encore été confronté à des données taxonomiques sur la biodiversité du sol. Pourtant, plusieurs études ont démontré que des modifications de structure du peuplement et de la gestion forestière influençaient cette biodiversité (Yeates, 2007 ; Geraskina & Shevchenko, 2019 ; Tomao *et al.*, 2020 ; Čerevková *et al.*, 2021 ; Rappa *et al.*, 2022 ; Damptey *et al.*, 2023). Par ses rôles dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers, la biodiversité du sol devrait donc être aussi surveillée (Burrascano *et al.*, 2021 ; Zeiss *et al.*, 2022). Grâce aux propriétés du sol, il est possible d'avoir des informations sur l'état des organismes du sol (Bispo *et al.*, 2009). Zeiss *et al.* (2022) suggèrent différentes mesures du sol qui seraient faciles à inclure dans les suivis de biodiversité comme le pH, la teneur en azote totale, en carbone organique et phosphore. Néanmoins, il parait d'abord judicieux de tester la pertinence de l'IBP sur la biodiversité du sol, avant de complexifier l'indice en intégrant des éléments de description des sols.

L'objectif est d'étudier l'influence de la qualité de l'habitat des forêts anciennes sur la diversité taxonomique locale du sol décrite par l'ADNe et de tester les corrélations possibles avec un indicateur de terrain, l'IBP, dans les forêts anciennes en Occitanie. L'utilisation du metabarcoding de l'ADNe permet d'avoir une approche multi-taxonomique et ainsi mieux comprendre la réponse de la biodiversité épigée du sol aux changements environnementaux. Nous supposons donc que les guildes trophiques et les phylums présentent des réponses variables vis-à-vis de chaque facteur de l'IBP.

V.2.Matériels et méthodes

V.2.1. Sélection des parcelles

La zone d'étude s'étend sur environ 7 000km^2 et se situe dans le sud-ouest de la France. La sélection des parcelles forestières à étudier s'est fait à partir des inventaires régionaux des forêts anciennes de plaine en Occitanie (Gouix *et al.*, 2019) qui regroupaient 257 parcelles réparties dans 187 sites forestiers. Afin d'affiner la sélection des parcelles, nous avons contrôlé le type de station forestière échantillonnée et équilibré le stade de maturité des peuplements (Figure 34a). Au final, 43 parcelles « *hêtraie-chênaie sessiflore* » furent échantillonnées de novembre à mi-décembre 2020.

V.2.2. Mise en œuvre l'indice de biodiversité

Les données d'IBP mesurées à l'échelle d'un hectare ont été collectées entre 2017 et 2019, dans le cadre d'un inventaire cartographique des vieilles forêts d'Occitanie (Gouix *et al.*, 2019). Nous avons remobilisé ces données pour les parcelles forestières sélectionnées pour notre étude.

V.2.3. Echantillonnage du sol

Les échantillonnages de sol ont eu lieu en automne 2020. A l'intérieur de chaque parcelle forestière, 16 points d'échantillonnage ont été effectués tous les 20m (Figure 34b). Ce dispositif a déjà été testé dans d'autres études et a permis un échantillonnage robuste des communautés du sol (Mennicken *et al.*, 2020 ; Raimbault *et al.*, 2024). A chaque point d'échantillonnage, un échantillon composite a été assemblé. L'échantillon composite est constitué de 5 échantillonnages de sol à 10cm de profondeur dans un rayon de 3,5 mètres. Les débris organiques ont été retirés lors des échantillonnages. En accord avec Donald *et al.* (2021), entre chaque échantillon composite, la pelle était plantée intégralement dans le sol pour ne pas contaminer l'échantillonnage composite suivant. Entre chaque parcelle forestière échantillonnée, pour enlever tous les résidus d'ADN résiduels, la pelle était désinfectée à l'eau de Javel à 2%. En attendant d'être correctement préparés le soir, les échantillons composites étaient stockés dans des glacières avec des blocs de glace en journée. Après chaque journée de terrain, les échantillons composites ont été homogénéisés par malaxage et un sous-échantillon de 15g a été prélevé à l'aide d'une cuillère en plastique propre. Le sous-échantillon pesait 15g et était placé dans un sachet de thé entouré de 45g de gel de silice dans un sac Ziploc propre. Le gel de silice était changé tous les jours afin de réduire le temps de séchage à température ambiante. Les échantillons ont été gardés un mois avant l'extraction de l'ADN. Pour chaque échantillon composite, le reste de sol a été regroupé à l'échelle de la parcelle pour en faire un échantillon unique destiné aux analyses physico-chimiques. Après séchage à température ambiante, des analyses de pH et de C/N ont été faites.

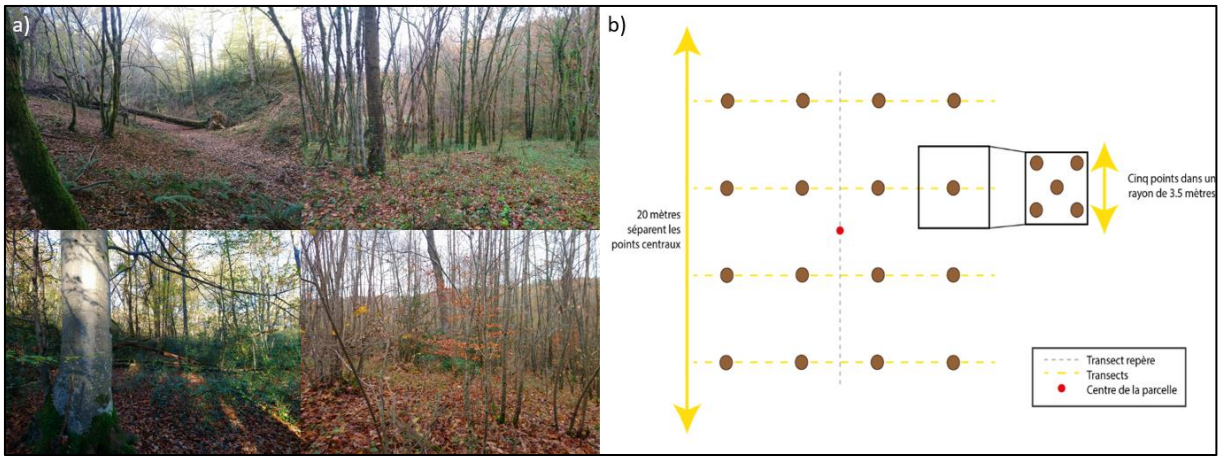


Figure 34- Dispositif expérimental montrant a) différentes parcelles forestières avec différentes structures de peuplement et b) le schéma d'échantillonnage pour une parcelle avec 16 échantillons composites (cercle blanc). Chaque échantillon composite se compose de 5 échantillons de sol et donne 15 g de sol.

V.2.4. Biologie moléculaire et séquençage

L'extraction de l'ADN environnemental du sol a été faite avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin R Soil selon les recommandations de Mennicken *et al.* (2020). A chaque série d'extraction, des contrôles négatifs de l'extraction de l'ADN ont été faites. A chaque fin de série, les extractions étaient conservées à -20°C. Deux types d'amplifications ont été faites afin d'avoir des données sur les eucaryotes en général mais aussi plus spécifiquement sur les champignons. Des amplifications ont ciblé l'ITS1 fongique (Fwd : ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG de Epp *et al.* (2012) et une version modifiée de Rev:5.8S_Fungi CAAGATCCGTTGTTGAAAGTK, Taberlet *et al.* (2018)) alors que les autres amplifications ciblaient le gène 18S rDNA (Fwd : TTTGTCTGSTTAATTSCG et Rev : CACAGACCTGTTATTGC de Guardiola *et al.* (2015)) des eucaryotes. Afin de faciliter les nombreux échantillons lors de l'étape bio-informatique, un ensemble unique d'amorces composé de huit marqueurs nucléoniques a été ajouté pour chaque PCR (Taberlet *et al.*, 2018). Chaque PCR a été faite deux fois avec une paire différente d'amorces marquées. Des contrôles positifs et négatifs ont été inclus. Pour les champignons, le protocole PCR est identique à celui de Nagati *et al.* (2018).

V.2.5. Analyse bio-informatique

Pour chaque type d'amplifications, grâce à l'emploi des marqueurs à huit nucléotides et la combinaison d'amorces, toutes les réactions de PCR ont été rassemblées afin de produire une bibliothèque unique. Le séquençage a été fait à la plateforme Fasteris (Suisse), en 2*250 bp avec la technologie Miseq V3. Une fois leurs qualités vérifiées, les séquences brutes (.fastq) ont été analysées avec les OBItools (Boyer *et al.*, 2016) sur le cluster de la GenoToul (Toulouse, France). Des filtres de qualité ont été utilisés pour retirer (1) les séquences non alignées entre les fichiers R1 et R2 et (2) les séquences de moins de 60 nucléotides et ayant un score qphred inférieur à 50. Pour les champignons et les eucaryotes, les analyses bio-informatiques étaient essentiellement similaires à celles de

Mennicken *et al.* (2020) (excepté à l'étape de l'assignation taxonomique fongique qui a nécessité une base de données mise à jour) et Donald *et al.* (2021) respectivement. La fonction de clustering « sumaclust » (Mercier *et al.*, 2013) a permis de définir les MOTUs avec une valeur de similarité définie à 97% (Nilsson *et al.*, 2008). La fonction « ecotag » (Boyer *et al.*, 2016) a permis d'assigner taxonomiquement l'ensemble de nos MOTUs fongiques grâce aux séquences de références sur GenBank (Benson *et al.*, 2012). L'assignation taxonomique pour les eucaryotes a été possible grâce à la base de données SILVA version 1.3 (Quast *et al.*, 2013). Les hypothétiques contaminants ont été détectés par le package metabaR (Zinger *et al.*, 2021) pour être ensuite éliminés des jeux de données. Pour les champignons, les guildes trophiques et les formes de croissance ont été renseignées avec la base de données FUNGUILD (Nguyen *et al.*, 2016).

V.2.6. Analyse des sols

Le pH (H_2O) (NF ISO 10390) et le rapport C/N (NF ISO 10694 ; NF ISO 13878 ; NF EN 13137) ont été mesurés au laboratoire LEFE sur des portions de terre fine après un tamisage à 2mm.

V.2.7. Analyse statistique de la diversité des eucaryotes

L'ensemble des analyses statistiques ont été faites avec le logiciel RStudio 4.1.0 (R Core Team, 2021). Le package *iNEXT* (Hsieh *et al.*, 2016) a été utilisé pour estimer la couverture d'échantillonnage des eucaryotes en général et des champignons selon les recommandations de Chao and Jost (2012).

Le package *hillR* (Li, 2018) a servi à calculer les nombres de Hill (Hill, 1973) afin d'estimer la diversité au sein de chaque parcelle. Le principal avantage des nombres de Hill est de pouvoir modifier l'importance donnée aux MOTUs rares ou abondantes avec un coefficient q appelé « ordre » de diversité (Alberdi & Gilbert, 2019). Au fur et à mesure que la valeur du coefficient q augmente, le poids des MOTUs rares est de plus en plus faible dans le calcul de diversité à l'inverse des MOTUs abondantes (Alberdi & Gilbert, 2019). Trois valeurs ont été utilisées pour le coefficient q : q=0 (richesse spécifique), q=1 (indice de Shannon) et q=2 (inverse de l'indice de Simpson).

Des modèles linéaires ont été faits après standardisation des variables explicatives avec les packages vegan (Oksanen *et al.*, 2022), lme4 (Bates *et al.*, 2015) et DHARMa (Hartig, 2022) pour évaluer les effets de la qualité de l'habitat sur la diversité alpha (q=0,1 et 2) de tous les eucaryotes, les phylums les plus représentés et les guildes trophiques fongiques (ectomycorhize, pathotrophe et saprotrophe). Les variables édaphiques ont été ajoutées en covariables. Pour l'ensemble de ces groupes et les trois valeurs de q, quatre modèles furent réalisés. Le premier modèle comportait uniquement comme variable le score global de l'IBP. En plus du score global de l'IBP, le pH et le C/N étaient rajoutés dans le modèle 2. Le modèle 3 comportait différentes variables de l'IBP, le nombre d'arbres porteurs de polypores et aussi le pH et le C/N. Le modèle 4 était composé uniquement des

différentes variables de l'IBP citées précédemment. Au final le modèle 3 fut sélectionné après avoir supprimé les variables colinéaires ayant un seuil VIF >3 (Zuur *et al.*, 2010) avec le package *rms* (Harrell, 2023). Une ACP a été faite pour observer les caractéristiques de chaque parcelle (Figure 35). Enfin, l'autocorrélation spatiale des résidus de chaque modèle linéaire a été vérifiée et corrigée avec le package DHARMa (Hartig, 2022).

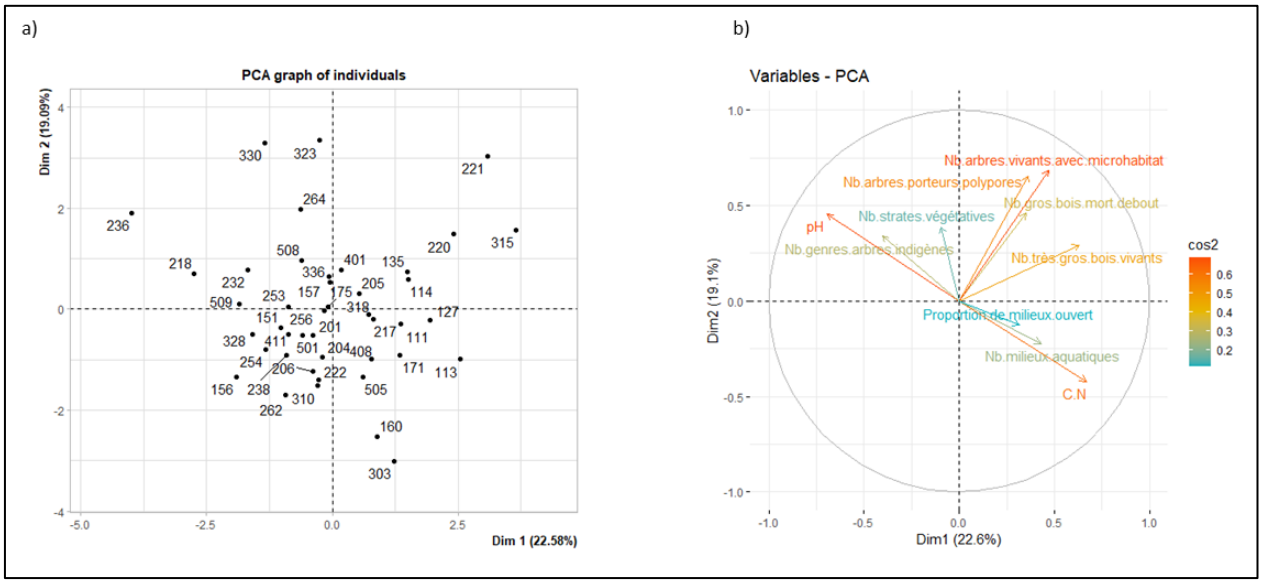


Figure 35- Résultats de l'analyse en composantes principales avec a) représentation des parcelles forestières et b) représentation des cosinus carrés des variables.

V.3.Résultats

V.3.1. Caractérisation taxonomique et fonctionnelle de la diversité fongique et en eucaryotes du sol

Au final, 5 070 MOTUs fongiques et 3 390 MOTUs d'eucaryotes ont été associées à 97% d'identité ce qui représente respectivement 25 020 386 et 8 237 750 séquences. Pour les champignons, la richesse spécifique moyenne par parcelle était de 1 239 MOTUs (maximum 1 702 et minimum 845). Pour les eucaryotes, la richesse spécifique moyenne par parcelle était de 1 648 MOTUs (maximum 1 957 et minimum 1 255). Le nombre de séquences moyen par parcelle était de 191 576 (maximum 328 746 et minimum 98 392). Il a été possible d'assigner des phylums à 56,9% MOTUs ce qui représente 88% des séquences (Figure 36).

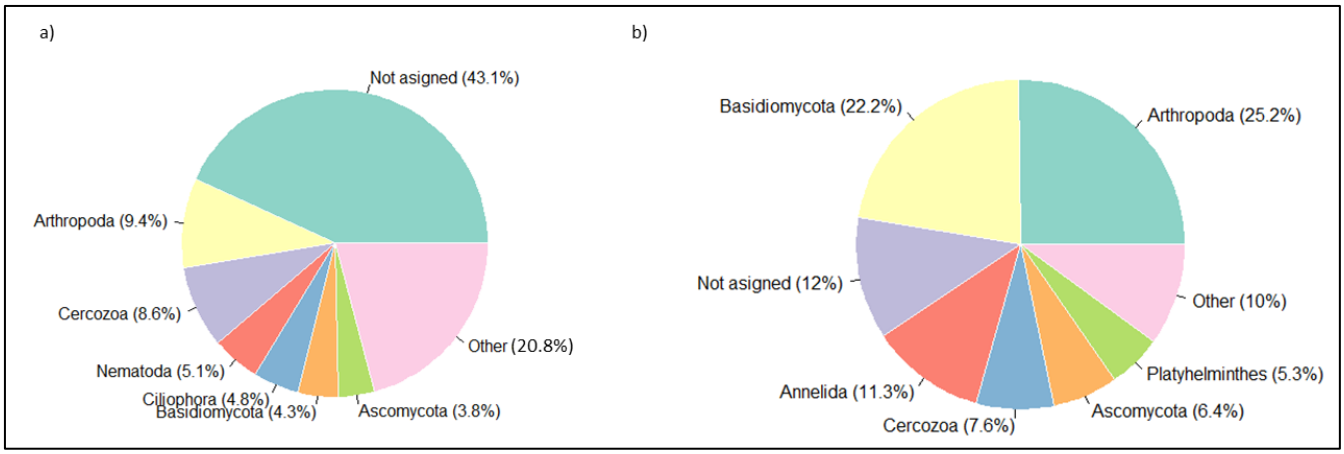


Figure 36- Diagrammes circulaires montrant a) le pourcentage de MOTUs et b) la distribution des MOTUs en fonction du nombre de séquences.

V.3.2. Réponse des phylums d'eucaryotes à la qualité de l'habitat

Pour les eucaryotes, en général (Figure 37), les influences de la qualité de l'habitat divergent selon la sensibilité aux MOTUs rares. Le nombre de zones ouvertes est corrélé positivement à la diversité en MOTUs abondantes (q=1 et 2) tout comme le nombre d'arbres porteurs de champignons (q=2). Cependant, le nombre de gros bois morts debout influence négativement la diversité en MOTUs abondantes (q=2).

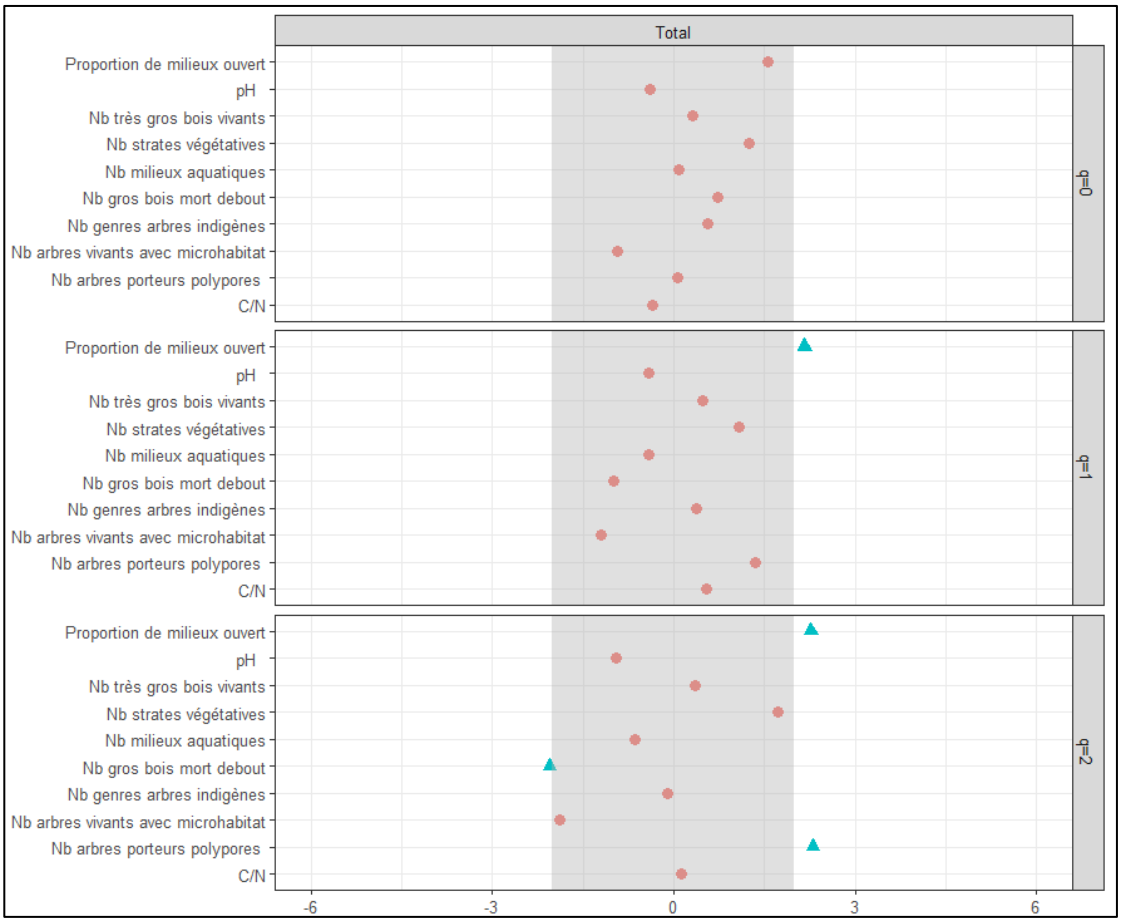


Figure 37- Réponse de la diversité alpha des eucaryotes pour chaque nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

La réponse à la qualité de l'habitat des eucaryotes appartenant aux métazoaires varie fortement selon les phylums (Figure 38). Les diversités en annélides (q=0) et en arthropodes (q=1) augmentent significativement quand le nombre de gros bois morts debout augmente. Les diversités en nématodes (q=1 et 2) sont les seules à être positivement corrélées au nombre de zones ouvertes. La hausse du nombre de genres d'arbres autochtones diminue significativement la diversité en arthropodes (q=1 et 2) et en nématodes (q=1 et 2). La covariable C/N agit négativement chez les nématodes (q=1 et 2). Les plathelminthes sont les seuls à n'avoir eu aucun résultat significatif des variables explicatives.

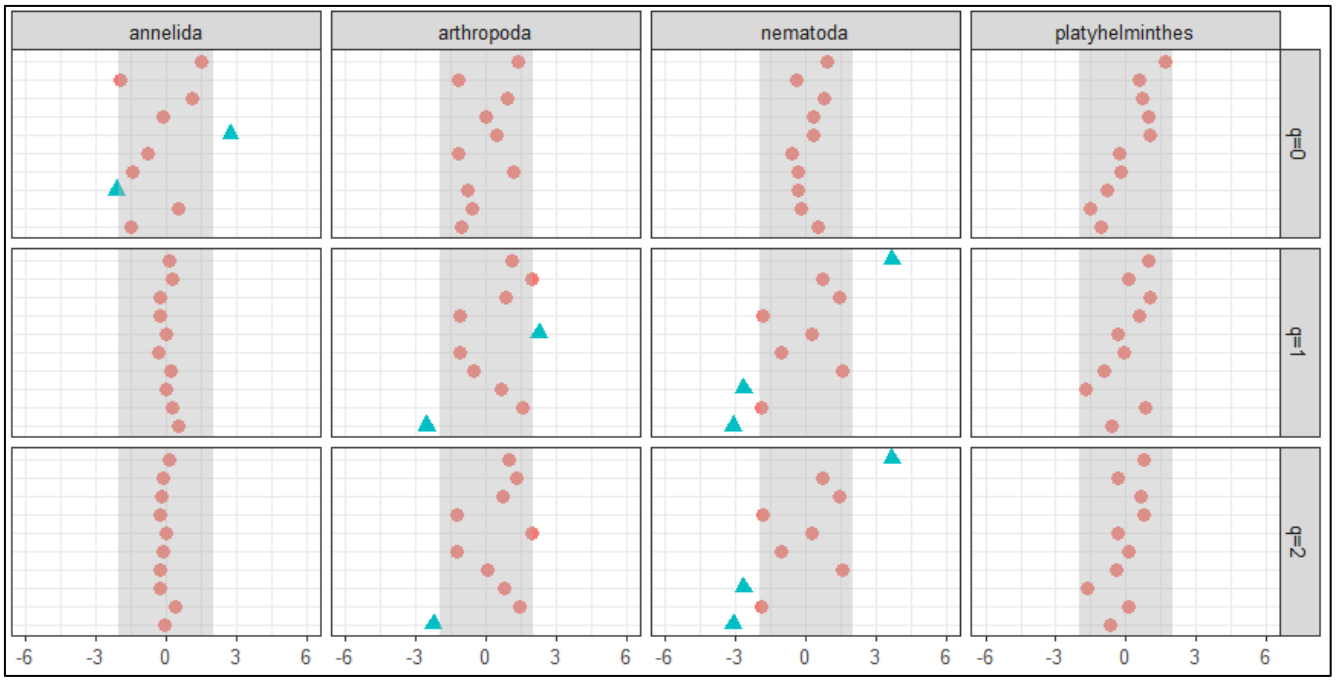


Figure 38- Réponse de la diversité alpha des métazoaires pour chaque phylum et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

Pour les champignons, la qualité de l'habitat a des effets significatifs uniquement chez les basidiomycètes (Figure S8). Le nombre de gros bois morts debout est corrélé négativement à la diversité en MOTUs abondantes (q=1 et 2). A l'inverse, le nombre d'arbres porteurs de champignons favorise la diversité en MOTUs abondantes (q=1 et 2) tout comme le nombre d'arbres vivants ayant au moins un microhabitat (q=2).

La qualité de l'habitat n'influence pas significativement la diversité des phylums appartenant aux protistes sauf pour les discosea et les cercozoa (Figure S9-S10). La diversité en discosea (q=0) augmente significativement quand il y a une hausse du nombre de zones ouvertes. La diversité en cercozoa (q=2) est positivement corrélée aux nombres d'arbres porteurs de champignons. Le pH influence négativement la diversité en tubulinea (q=0) mais influence positivement la diversité en cercozoa (q=1).

V.3.2. Réponse des guildes trophiques de champignons à la qualité de l'habitat

La diversité taxonomique en MOTUs totales (q=1 et 2) et ectomycorhiziennes (q=1) réagit significativement et positivement à la hausse du pH du sol (Figure 39). La diversité en MOTUS saprotrophes (q=1 et 2) est positivement corrélée au rapport C/N. Le nombre de très gros bois et le nombre de strates végétatives ont une influence significative positive pour la diversité en MOTUs rares (q=0) pour les pathotrophes et les saprotrophes. Néanmoins, la diversité en MOTUs saprotrophes rares (q=0) est négativement corrélée au nombre de gros bois mort debout.

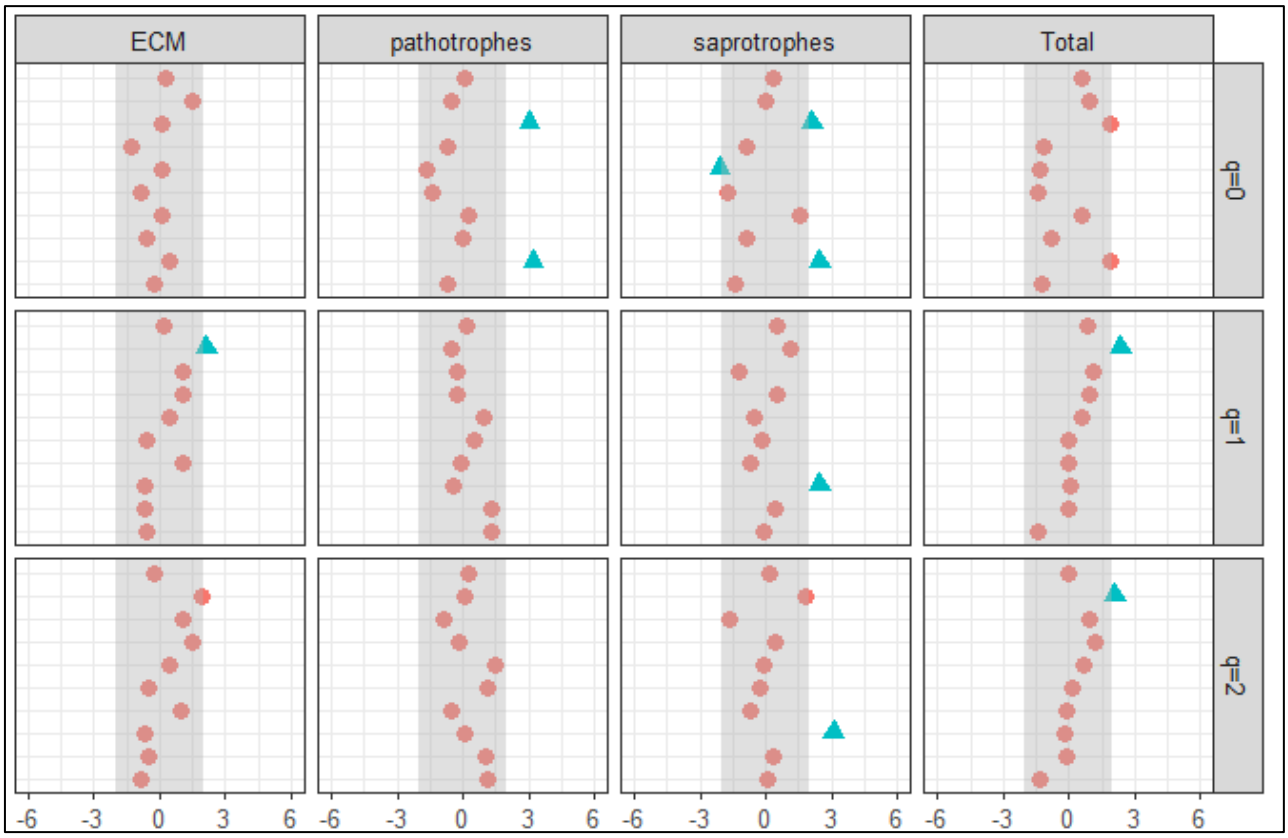


Figure 39- Réponse de la diversité alpha chez les champignons pour chaque groupe trophique et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

V.4.Discussion

Notre étude sur la biodiversité du sol des forêts anciennes du Sud-Ouest de la France confirme l'impact de la qualité d'habitat du peuplement (Geraskina, 2016 ; Tomao *et al.*, 2020 ; Damptey *et al.*, 2023), et permet de différencier les réponses selon les lignées d'organismes du sol. Contrairement à des études qui remettent en cause l'utilisation de variables liées à la structure des peuplements forestiers (Noss, 1990 ; Angelstam & Dönz-Breuss, 2004), l'IBP inclut des paramètres structurants les communautés du sol.

Comme recommandé dans les études de metabarcoding (Calderon-Sanou *et al.*, 2020), nous avons utilisé plusieurs nombres de Hill pour vérifier la cohérence des résultats car les abondances fournies par le metabarcoding sont relatives. En utilisant l'ADNe des différentes communautés, nous observons des réponses différentes entre les guildes trophiques fongiques et les principaux phylums d'eucaryote. De manière globale, les eucaryotes communs du sol réagissent positivement à la présence de milieux mais négativement à la présence de bois morts debout. Pourtant, en regardant les différentes lignées taxonomiques, nous observons des réponses différentes. Chez les métazoaires, la diversité taxonomique en annélides (q=0) et arthropodes (q=1) est corrélée positivement à la présence de bois mort debout alors que les champignons et les basidiomycètes (q=1 et 2) réagissent négativement. Les arthropodes, les nématodes et les basidiomycètes sont les phylums qui sont le plus influencés par la structure du peuplement comparé aux autres phylums notamment ceux appartenant aux protistes.

Dans notre étude, les variables liées à l'IBP n'ont pas toutes une influence sur les phylums étudiés. Les variables influentes sont le bois mort debout, le nombre de genres d'arbres indigènes et le nombre de milieux ouverts. A l'inverse, des variables comme le nombre de très gros bois vivant et la présence de milieux aquatiques ne sont jamais significatifs. Pourtant la présence d'arbres de gros diamètre favorise l'hétérogénéité des habitats notamment pour des espèces spécialistes comme les coléoptères saproxyliques (Kolstrom & Lumatjarvi, 2000). En ciblant la biodiversité du sol, il n'est pas surprenant de ne pas avoir un effet significatif des milieux aquatiques. Les milieux aquatiques influencent essentiellement la présence en oiseaux migrateurs, en mammifères, en amphibiens et en végétation hygrophile des ripisylves (Larrieu & Gonin, 2008). Cependant, nous avons observé que les variables liées à l'IBP n'expliquent pas entièrement la diversité taxonomique du sol et qu'il est donc nécessaire de prendre aussi en compte les caractéristiques physico-chimiques du sol.

On observe que les variables physico-chimiques influencent la biodiversité locale du sol, ce qui est cohérent avec la majorité des études sur la biodiversité du sol (Bunemann *et al.*, 2006 ; Chikoski *et al.*, 2006 ; Corrales *et al.*, 2017 ; Perez-Juarez *et al.*, 2018 ; Lilleskov *et al.*, 2019). La

diversité en saprotrophes fongiques était plus élevée dans les sols peu fertiles à l'inverse des nématodes et des annélides. Nos parcelles échantillonnées se situent dans un paysage agroforestier fragmenté (Raimbault *et al.*, 2024) et la distance à la lisière forestière n'a pas été contrôlée. Dans notre étude, la distance moyenne est de 280m (max : 537m et min : 5m). Remy *et al.* (2016) ont montré que la teneur en N totale était plus importante en lisière forestière qu'au centre de la parcelle ce qui expliquerait la variabilité de nos valeurs de C/N calculées (moyenne : 14,48 ; min :10,2 ; max :20,4). Néanmoins, il est possible aussi que ces variations soient expliquées par des différences de types de sol entre les sites. L'influence positive de la fertilité du sol sur les saprotrophes fongiques a déjà été observée dans différents contextes environnementaux (Kyaschenko *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2020 ; Mayer *et al.*, 2021 ; Ning *et al.*, 2021). Nos résultats montrent que la diversité en nématodes réagit négativement à la fertilité du sol. Shokoohi (2023) ont montré que selon le genre et la gestion agricole, les nématodes réagissaient différemment aux modifications physico-chimiques du sol. Dans notre cas, nous avons appliqué nos modèles uniquement aux phylums et non aux genres masquant ainsi la diversité des réponses. Nos résultats montrent que le pH est un élément important pour la diversité de certains organismes du sol. Les champignons et plus précisément les ectomycorhiziens sont corrélés positivement à la hausse de pH. Le lien positif entre le pH et la structure des communautés fongiques a déjà été démontré (Ge *et al.*, 2017 ; Liu *et al.*, 2018) même si l'influence du pH dépendrait de ses valeurs (Ye *et al.*, 2021). Dans notre cas, les valeurs de pH étaient essentiellement similaires (moyenne : 4,9 ; min : 4,19 ; max : 7,06). Le pH est aussi un élément important pour les protistes (Shen *et al.*, 2014 ; Perez-Juarez *et al.*, 2018 ; Xue *et al.*, 2023). Selon la gamme du pH, les communautés de protistes diffèrent (Dupont *et al.*, 2016). Ce constat est observable dans nos résultats. Parmi les six phylums assimilables aux protistes, uniquement les diversités en cercozoa et tubulinea sont influencées significativement par le pH.

Enfin, on observe que les phylums et les guildes trophiques sont influencés par la qualité de l'habitat. La diversité des champignons pathotrophes et saprotrophes est positivement corrélée au nombre de strates végétatives. En milieu forestier, les champignons sont fortement dépendants de la composition et de la dynamique de la végétation (Packham *et al.*, 2002 ; Lauber *et al.*, 2008 ; Landi *et al.*, 2015). Pourtant, nous constatons dans notre cas que la diversité en genres d'arbres autochtones (min : 3 ; max : 10) n'influence pas la diversité, ce qui semble être en accord avec le débat actuel entre la diversité des arbres et la diversité des champignons du sol forestier (Tomao *et al.*, 2020). Des études ont montré que la richesse en espèces arborescentes était corrélée positivement à la diversité alpha des champignons du sol de façon directe (Chen *et al.*, 2017) et indirecte en modifiant les caractéristiques du sol (Thoms *et al.*, 2010). A l'inverse, aucune différence de diversité alpha fongique n'a été observée entre des peuplements mixtes et des peuplements purs (Massicotte *et al.*, 1999 ;

Durall *et al.*, 2006 ; Tedersoo *et al.*, 2016). Les caractéristiques physico-chimiques du sol, la disponibilité du substrat et l'influence des autres biotes pourraient inhiber l'effet de l'arbre hôte sur la diversité fongique (Cairney, 2012). La présence de gros bois mort debout tend à décroitre la diversité en champignons saprotrophes et en basidiomycètes. Pouska *et al.* (2010) et Shorohova and Kapitsa (2014) expliquent que les arbres morts debout offrent peu d'habitats et des conditions microclimatiques plus variables que les souches ce qui pourrait expliquer ce constat. Pour les métazoaires, excepté les plathelminthes, la présence de gros bois morts debout, le nombre de zones ouvertes et la diversité de genres d'arbres autochtone influencent leurs diversités. Nos résultats concernant la relation positive entre le bois mort et les arthropodes du sol sont en accord avec les observations de Jabin *et al.* (2004). Leur étude montre que pour une majorité des taxa testés, la diversité est plus importante à proximité des débris ligneux. Les débris ligneux servent d'habitation aux espèces saproxyliques mais aussi aux macro-arthropodes zoophages du sol. Un constat similaire est observable chez les annélides, le bois mort fournit un refuge face aux prédateurs mais aussi une ressource alimentaire (Hendrix, 1996; Geraskina, 2016). Les vers de terre sont généralement classés en trois catégories selon leur style de vie (épigé, endogé et anécique) (Lee, 1959; Bouché, 1977) mais certaines espèces sont décrites comme « corticoles » ou « arboricoles ». Elles vivent dans la matière organique dans le couvert des arbres, dans les bois en décomposition (Bouché, 1972; Lee, 1985; Mogi, 2004; Römbke *et al.*, 2017). Ces observations peuvent expliquer pourquoi la diversité en MOTUs rares est positivement influencée par la présence de gros bois morts debout. La présence de zones ouvertes dans les parcelles échantillonnées a favorisé la diversité taxonomique pour les nématodes et les eucaryotes en général. Des études ont montré que les diversités structurelles et fonctionnelles de la macrofaune du sol différaient selon la taille de la trouée (Kooch & Hosseini, 2010; Kooch & Haghverdi, 2014). Shen *et al.* (2019) ont montré que la composition, l'abondance ou la diversité spécifique en nématodes n'étaient pas influencé par la superficie de la trouée ce qui est contraire à nos observations. Néanmoins, la superficie de la trouée influence significativement la diversité fonctionnelle. L'effet négatif de la diversité en genres d'arbres autochtones observé sur la diversité en arthropodes et en nématodes est inattendue. Damptey *et al.* (2023) ont montré que la diversité en essences forestières avait un effet bénéfique sur la richesse taxonomique et la diversité des communautés. La diversité en essences forestières offre théoriquement davantage de ressources alimentaires et d'habitats aux arthropodes (Damptey *et al.*, 2023).

V.5.Conclusion

Notre étude a permis de montrer des effets positifs et négatifs de la qualité de l'habitat sur la biodiversité du sol. L'utilisation de l'ADNe pour étudier ces facteurs est prometteuse. Enfin, cette étude invite à prendre en considération les conséquences de la gestion forestière sur la biodiversité du sol et à prendre en compte les facteurs favorisant leur diversité.

Références

Alberdi A, Gilbert MTP. 2019. A guide to the application of Hill numbers to DNA-based diversity analyses. *Molecular ecology resources* **19**(4): 804-817.

Angelstam P, Dönz-Breuss M. 2004. Measuring forest biodiversity at the stand scale: An evaluation of indicators in European forest history gradients. *Ecological Bulletins*: 305-332.

Bates D, Machler M, Bolker BM, Walker SC. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**(1): 1-48.

Bauhus Jr, Meer Pvd, Kanninen M, Bauhus J, Meer Pvd, Kanninen M. 2010. *Ecosystem goods and services from plantation forests*. London ;: Earthscan.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* **40**(D1): D48-D53.

Bispo A, Cluzeau D, Creamer R, Dombos M, Graefe U, Krogh P, Sousa J, Peres G, Rutgers M, Winding A. 2009. Indicators for monitoring soil biodiversity. *Integrated environmental assessment and management* **5**(4): 717-719.

Bohan DA, Vacher C, Tamaddoni-Nezhad A, Raybould A, Dumbrell AJ, Woodward G. 2017. Next-Generation Global Biomonitoring: Large-scale, Automated Reconstruction of Ecological Networks. *Trends in Ecology & Evolution* **32**(7): 477-487.

Bonkowski M. 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* **162**(3): 617-631.

Bouché M 1977. Strategies lombriciennes. In: Lohm U, Person T eds. *Organisms as components of ecosystems*. Stockholm: Ecological Bulletin, 122-132.

Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources* **16**(1): 176-182.

Brockerhoff EG, Barbaro L, Castagneyrol B, Forrester DI, Gardiner B, Gonzalez-Olabarria JR, Lyver PO, Meurisse N, Oxbrough A, Taki H, et al. 2017. Forest biodiversity, ecosystem functioning and the provision of ecosystem services. *Biodiversity and Conservation* **26**(13): 3005-3035.

Bunemann EK, Schwenke GD, Van Zwieten L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review. *Australian Journal of Soil Research* **44**(4): 379-406.

Burrascano S, Trentanovi G, Paillet Y, Heilmann-Clausen J, Giordani P, Bagella S, Bravo-Oviedo A, Campagnaro T, Campanaro A, Chianucci F, et al. 2021. Handbook of field sampling for multi-taxon biodiversity studies in European forests. *Ecological Indicators* **132**: 13.

Cairney JWG. 2012. Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* **47**: 198-208.

Calderon-Sanou I, Munkemuller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W. 2020. From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices? *Journal of biogeography* **47**(1): 193-206.

Carcamo HA, Prescott CE, Chanway CP, Abe TA. 2001. Do soil fauna increase rates of litter breakdown and nitrogen release in forests of British Columbia, Canada? *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **31**(7): 1195-1204.

Čerevková A, Renčo M, Miklisová D, Gömöryová E. 2021. Soil Nematode Communities in Managed and Natural Temperate Forest. *Diversity* **13**(7): 327.

Chao A, Jost L. 2012. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* **93**(12): 2533-2547.

Chen WQ, Wang JY, Meng ZX, Xu R, Chen J, Zhang YJ, Hu TM. 2020. Fertility-related interplay between fungal guilds underlies plant richness-productivity relationships in natural grasslands. *New Phytologist* **226**(4): 1129-1143.

Chen YL, Xu TL, Veresoglou SD, Hu HW, Hao ZP, Hu YJ, Liu L, Deng Y, Rillig MC, Chen BD. 2017. Plant diversity represents the prevalent determinant of soil fungal community structure across temperate grasslands in northern China. *Soil Biology & Biochemistry* **110**: 12-21.

Chikoski JM, Ferguson SH, Meyer L. 2006. Effects of water addition on soil arthropods and soil characteristics in a precipitation-limited environment. *Acta Oecologica* **30**(2): 203-211.

Clarholm M. 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology & Biochemistry* **17**(2): 181-187.

Coote L, Dietzsch AC, Wilson MW, Graham CT, Fuller L, Walsh AT, Irwin S, Kelly DL, Mitchell FJG, Kelly TC, et al. 2013. Testing indicators of biodiversity for plantation forests. *Ecological Indicators* **32**: 107-115.

Corrales A, Turner BL, Tedersoo L, Anslan S, Dalling JW. 2017. Nitrogen addition alters ectomycorrhizal fungal communities and soil enzyme activities in a tropical montane forest. *Fungal Ecology* **27**: 14-23.

Ćosović M, Bugalho MN, Thom D, Borges JG. 2020. Stand Structural Characteristics Are the Most Practical Biodiversity Indicators for Forest Management Planning in Europe. *Forests* **11**(3): 343.

Creer S, Deiner K, Frey S, Porazinska D, Taberlet P, Thomas WK, Potter C, Bik HM. 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution* **7**(9): 1008-1018.

Damptey FG, Opuni-Frimpong E, Nsor CA, Addai J, Debrah DK, Schnerch B, Bentsi-Enchill F, Korjus H. 2023. Taxonomic and community composition of epigeal arthropods in monoculture and mixed tree species plantations in a deciduous forest of Ghana. *Journal of Forestry Research* **34**(3): 641-653.

Decocq G, Andrieu E, Brunet J, Chabrerie O, De Frenne P, De Smedt P, Deconchat M, Diekmann M, Ehrmann S, Giffard B, et al. 2016. Ecosystem Services from Small Forest Patches in Agricultural Landscapes. *Current Forestry Reports* **2**(1): 30-44.

Donald J, Murienne J, Chave J, Iribar A, Louisanna E, Manzi S, Roy M, Tao SL, Orivel J, Schimann H, et al. 2021. Multi-taxa environmental DNA inventories reveal distinct taxonomic and functional diversity in urban tropical forest fragments. *Global Ecology and Conservation* **29**: 13.

Dupont AOC, Griffiths RI, Bell T, Bass D. 2016. Differences in soil micro-eukaryotic communities over soil pH gradients are strongly driven by parasites and saprotrophs. *Environmental Microbiology* **18**(6): 2010-2024.

Durall DM, Gamiet S, Simard SW, Kudrna L, Sakakibara SM. 2006. Effects of clearcut logging and tree species composition on the diversity and community composition of epigeous fruit bodies formed by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **84**(6): 966-980.

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP, Haile J, Esposito A, Riaz T, Erseus C, Gusarov VI, Edwards ME, Johnsen A, et al. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* **21**(8): 1821-1833.

FAO 1999. State of the World's Forests 1999. Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations.

FAO 2015. Sustainable forest management.

Faure D, Joly D. 2016. *La génomique environnementale: La révolution du séquençage à haut débit*: ISTE Group.

Ferris R, Peace AJ, Newton AC. 2000. Macrofungal communities of lowland Scots pine (Pinus sylvestris L.) and Norway spruce (Picea abies (L.) Karsten.) plantations in England: relationships with site factors and stand structure. *Forest Ecology and management* **131**(1-3): 255-267.

Gao T, Hedblom M, Emilsson T, Nielsen AB. 2014. The role of forest stand structure as biodiversity indicator. *Forest Ecology and management* **330**: 82-93.

Ge Z-W, Brenneman T, Bonito G, Smith ME. 2017. Soil pH and mineral nutrients strongly influence truffles and other ectomycorrhizal fungi associated with commercial pecans (Carya illinoinensis). *Plant and Soil* **418**(1): 493-505.

Geraskina A. 2016. The population of earthworms (Lumbricidae) in the main types of dark coniferous forests in Pechora-Ilych Nature Reserve. *Biology Bulletin* **43**: 819-830.

Geraskina A, Shevchenko N. 2019. Spatial distribution of the epigeic species of earthworms Dendrobaena octaedra and D. attemsi (Oligochaeta: Lumbricidae) in the forest belt of the northwestern Caucasus. *Turkish Journal of Zoology* **43**(5): 480-489.

Gibson L, Lee TM, Koh LP, Brook BW, Gardner TA, Barlow J, Peres CA, Bradshaw CJA, Laurance WF, Lovejoy TE, et al. 2011. Primary forests are irreplaceable for sustaining tropical biodiversity. *Nature* **478**(7369): 378-+.

Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**(6270): 60-63.

Gonzalez G, Seastedt TR. 2001. Soil fauna and plant litter decomposition in tropical and subalpine forests. *Ecology* **82**(4): 955-964.

Gouix N, Savoie JM, Bouteloup R, Corriol G, Cuypers T, Hannoire C, Infante Sanchez M, Maillé S, Marc D. 2019. Inventaire et caractérisation des noyaux de « vieilles forêts de plaine » Pour une continuité de la trame forestière entre Pyrénées et Massif-Central. Rapport final: Conservatoire d'espaces naturels Midi-Pyrénées / Ecole d'ingénieurs de Purpan.

Guardiola M, Uriz MJ, Taberlet P, Coissac E, Wangensteen OS, Turon X. 2015. Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons. *Plos One* **10**(10): 26.

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* **5**(10): R245-R249.

Harrell FEJ 2023. rms: Regression Modeling Strategies. R package version 6.6-0.

Hartig F. 2022. DHARMa: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. *R package version 0.4.5*.

Hendrix PF 1996. Earthworms, biodiversity, and coarse woody debris in forest ecosystems of the southeastern USA. In: McWinn J, Crossley DJ eds. *Biodiversity and coarse woody debris in southern forests, proceedings of theworkshop on coarse woody debris in southern forests: effects on biodiversity.* USDA Forest Service, SouthernResearch Station: General technical report SE-94, 43-48.

Hill MO. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**(2): 427-432.

Hsieh TC, Ma KH, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* **7**(12): 1451-1456.

Jabin M, Mohr D, Kappes H, Topp W. 2004. Influence of deadwood on density of soil macro-arthropods in a managed oak-beech forest. *Forest Ecology and management* **194**(1-3): 61-69.

Kautz G, Topp W. 1998. Nachhaltige waldbauliche Maßnahmen zur Verbesserung der Bodenqualität. *Forstwissenschaftliches Centralblatt vereinigt mit Tharandter forstliches Jahrbuch* **1**(117): 23-43.

Kolstrom M, Lumatjarvi J. 2000. Saproxylic beetles on aspen in commercial forests: a simulation approach to species richness. *Forest Ecology and management* **126**(2): 113-120.

Kooch Y, Haghverdi K. 2014. Earthworms-good indicators for forest disturbance. *Journal of BioScience & Biotechnology* **3**(2).

Kooch Y, Hosseini SM. 2010. Response of earthworms biomass and diversity to windthrow events and soil properties in Hyrcanian forests of Iran. *Folia oecologica* **37**(2): 181.

Kyaschenko J, Clemmensen KE, Karltun E, Lindahl BD. 2017. Below-ground organic matter accumulation along a boreal forest fertility gradient relates to guild interaction within fungal communities. *Ecology Letters* **20**(12): 1546-1555.

Landi M, Salerni E, Ambrosio E, D'Aguanno M, Nucci A, Saveri C, Perini C, Angiolini C. 2015. Concordance between vascular plant and macrofungal community composition in broadleaf deciduous forests in central Italy. *Iforest-Biogeosciences and Forestry* **8**: 279-286.

Larrieu L, Gonin P. 2008. L'indice de Biodiversité Potentielle (IBP): une méthode simple et rapide pour évaluer la biodiversité potentielle des peuplements forestiers. *Revue forestière française* **6**: 727-748.

Larrieu L, Gosselin F, Archaux F, Chevalier R, Corriol G, Dauffy-Richard E, Deconchat M, Gosselin M, Ladet S, Savoie JM, et al. 2019. Assessing the potential of routine stand variables from multi-taxon data as habitat surrogates in European temperate forests. *Ecological Indicators* **104**: 116-126.

Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry* **40**(9): 2407-2415.

Lee KE. 1959. The earthworm fauna of New Zealand. *NZ Dep. sci. industr. Res. Bull.* **130**: 1-486.

Lee KE. 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*: Academic Press Inc.

Li D. 2018. hillR: taxonomic, functional, and phylogenetic diversity and similarity through Hill Numbers. *J. Open Source Softw.* **3**(31): 1041.

Lilleskov EA, Kuyper TW, Bidartondo MI, Hobbie EA. 2019. Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: A review. *Environmental Pollution* **246**: 148-162.

Liu D, Liu GH, Chen L, Wang JT, Zhang LM. 2018. Soil pH determines fungal diversity along an elevation gradient in Southwestern China. *Science China-Life Sciences* **61**(6): 718-726.

Massicotte HB, Molina R, Tackaberry LE, Smith JE, Amaranthus MP. 1999. Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from three adjacent forest sites by five host species. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **77**(8): 1053-1076.

Mayer M, Rewald B, Matthews B, Sanden H, Rosinger C, Katzensteiner K, Gorfer M, Berger H, Tallian C, Berger TW, et al. 2021. Soil fertility relates to fungal-mediated decomposition and organic matter turnover in a temperate mountain forest. *New Phytologist* **231**(2): 777-790.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of past and present-day landscape structure on forest soil microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 118.

Mercier C, Boyer F, Bonin A, Coissac E 2013. SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop. Abstract*: Citeseer. 27-29.

Mogi M. 2004. Phytotelmata: hidden freshwater habitats supporting unique faunas. *Freshwater invertebrates of the Malaysian Region*: 13-22.

Morelli F. 2015. Indicator species for avian biodiversity hotspots: Combination of specialists and generalists is necessary in less natural environments. *Journal for Nature Conservation* **27**: 54-62.

Mori AS, Lertzman KP, Gustafsson L. 2017. Biodiversity and ecosystem services in forest ecosystems: a research agenda for applied forest ecology. *Journal of Applied Ecology* **54**(1): 12-27.

Nagati M, Roy M, Manzi S, Richard F, Desrochers A, Gardes M, Bergeron Y. 2018. Impact of local forest composition on soil fungal communities in a mixed boreal forest. *Plant and Soil* **432**(1-2): 345-357.

Nguyen NH, Song ZW, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling JS, Kennedy PG. 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* **20**: 241-248.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary bioinformatics* **4**: 193-201.

Ning Q, Chen L, Zhang CZ, Ma DH, Li DM, Han XR, Cai ZJ, Huang SM, Zhang JB. 2021. Saprotrophic fungal communities in arable soils are strongly associated with soil fertility and stoichiometry. *Applied Soil Ecology* **159**: 6.

Noss RF. 1990. Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology* **4**(4): 355-364.

Ogram A, Sayler GS, Barkay T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* **7**(2-3): 57-66.

Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, et al. 2022. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4.

Packham JM, May TW, Brown MJ, Wardlaw TJ, Mills AK. 2002. Macrofungal diversity and community ecology in mature and regrowth wet eucalypt forest in Tasmania: A multivariate study. *Austral Ecology* **27**(2): 149-161.

Perez-Juarez H, Serrano-Vazquez A, Lara E, Ximenez C, Godinez-Alvarez H, Rodriguez-Zaragoza S, Eguiarte LE, Moreno MMH, Fernandez LD, Rojas-Velazquez L, et al. 2018. Population Dynamics of Amoeboid Protists in a Tropical Desert: Seasonal Changes and Effects of Vegetation and Soil Conditions. *Acta Protozoologica* **57**(4): 231-242.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**(D1): D590-D596.

R Core Team R 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Raimbault A, Brin A, Manzi S, Savoie JM, Gandois L, Oliva P, Fogliani O, Roy-Camille C, Gratacap L, Roy M. 2024. Influence of habitat fragmentation and habitat amount on soil fungi communities in ancient forests. *Landscape Ecology* **39**(2): 1-16.

Rappa NJ, Staab M, Frey J, Winiger N, Klein AM. 2022. Multiple forest structural elements are needed to promote beetle biomass, diversity and abundance. *Forest Ecosystems* **9**: 11.

Remy E, Wuyts K, Boeckx P, Ginzburg S, Gundersen P, Demey A, Van Den Bulcke J, Van Acker J, Verheyen K. 2016. Strong gradients in nitrogen and carbon stocks at temperate forest edges. *Forest Ecology and management* **376**: 45-58.

Römbke J, Blick T, Dorow WH. 2017. Allolobophoridella eiseni (Lumbricidae), a truly arboreal earthworm in the temperate region of Central Europe. *Soil Organisms* **89**(2): 75–84-75–84.

Seppey CVW, Broennimann O, Buri A, Yashiro E, Pinto-Figueroa E, Singer D, Blandenier Q, Mitchell EAD, Niculita-Hirzel H, Guisan A, et al. 2020. Soil protist diversity in the Swiss western Alps is better predicted by topo-climatic than by edaphic variables. *Journal of biogeography* **47**(4): 866-878.

Seppey CVW, Lara E, Broennimann O, Guisan A, Malard L, Singer D, Yashiro E, Fournier B. 2023. Landscape structure is a key driver of soil protist diversity in meadows in the Swiss Alps. *Landscape Ecology* **38**(4): 949-965.

Shen CC, Liang WJ, Shi Y, Lin XG, Zhang HY, Wu X, Xie G, Chain P, Grogan P, Chu HY. 2014. Contrasting elevational diversity patterns between eukaryotic soil microbes and plants. *Ecology* **95**(11): 3190-3202.

Shen Y, Yang WQ, Zhang J, Xu ZF, Zhang L, Liu Y, Li H, You CM, Tan B. 2019. Forest Gap Size Alters the Functional Diversity of Soil Nematode Communities in Alpine Forest Ecosystems. *Forests* **10**(9): 13.

Shokoohi E. 2023. Impact of Agricultural Land Use on Nematode Diversity and Soil Quality in Dalmada, South Africa. *Horticulturae* **9**(7): 749.

Shorohova E, Kapitsa E. 2014. Influence of the substrate and ecosystem attributes on the decomposition rates of coarse woody debris in European boreal forests. *Forest Ecology and management* **315**: 173-184.

Smith GF, Gittings T, Wilson M, French L, Oxbrough A, O'Donoghue S, O'Halloran J, Kelly DL, Mitchell FJG, Kelly T, et al. 2008. Identifying practical indicators of biodiversity for stand-level management of plantation forests. *Biodiversity and Conservation* **17**(5): 991-1015.

Smith S, Read D, Read D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Sterkenburg E, Bahr A, Durling MB, Clemmensen KE, Lindahl BD. 2015. Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *New Phytologist* **207**(4): 1145-1158.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*: Oxford University Press.

Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Polme S, Hiiesalu I, Anslan S, Harend H, Buegger F, Pritsch K, Koricheva J, et al. 2016. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *Isme Journal* **10**(2): 346-362.

Thompson I, Mackey B, McNulty S, Mosseler A. 2009. Forest Resilience, Biodiversity, and Climate Change. A synthesis of the biodiversity/resilience/stability relationship in forest ecosystems.. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity.

Thompson ID, Okabe K, Tylianakis JM, Kumar P, Brockerhoff EG, Schellhorn NA, Parrotta JA, Nasi R. 2011. Forest Biodiversity and the Delivery of Ecosystem Goods and Services: Translating Science into Policy. *BioScience* **61**(12): 972-981.

Thoms C, Gattinger A, Jacob M, Thomas FM, Gleixner G. 2010. Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology & Biochemistry* **42**(9): 1558-1565.

Thomsen PF, Willerslev E. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation* **183**: 4-18.

Tomao A, Bonet JA, Castano C, de-Miguel S. 2020. How does forest management affect fungal diversity and community composition? Current knowledge and future perspectives for the conservation of forest fungi. *Forest Ecology and management* **457**: 15.

Torras O, Saura S. 2008. Effects of silvicultural treatments on forest biodiversity indicators in the Mediterranean. *Forest Ecology and management* **255**(8-9): 3322-3330.

Vasutova M, Mleczko P, Lopez-Garcia A, Macek I, Boros G, Sevcik J, Fujii S, Hackenberger D, Tuf IH, Hornung E, et al. 2019. Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **29**(5): 413-434.

Wasilewska L. 1997. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes. *Russian Journal of Nematology* **5**(2): 113-126.

Xue PP, Minasny B, McBratney A, Jiang YJ, Luo Y. 2023. Land use effects on soil protists and their top-down regulation on bacteria and fungi in soil profiles. *Applied Soil Ecology* **185**: 10.

Ye JH, Chen XT, Liu GY, Jia XL, Zhang Q, Zhu CL, Wang YH, Jia M, Wang HB. 2021. Effect of tea soil acidification on the diversity and function of fungi community. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **94**: 199-+.

Yeates GW. 2007. Abundance, diversity, and resilience of nematode assemblages in forest soils. *Canadian Journal of Forest Research* **37**(2): 216-225.

Zeiss R, Eisenhauer N, Orgiazzi A, Rillig M, Buscot F, Jones A, Lehmann A, Reitz T, Smith L, Guerra CA. 2022. Challenges of and opportunities for protecting European soil biodiversity. *Conservation Biology* **36**(5): 12.

Zeller L, Baumann C, Gonin P, Heidrich L, Keye C, Konrad F, Larrieu L, Meyer P, Sennhenn-Reulen H, Muller J, et al. 2022. Index of biodiversity potential (IBP) versus direct species monitoring in temperate forests. *Ecological Indicators* **136**: 15.

Zeller L, Förster A, Keye C, Meyer P, Roschak C, Ammer C. 2023. What does literature tell us about the relationship between forest structural attributes and species richness in temperate forests?–A review. *Ecological Indicators* **153**: 110383.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Balint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, et al. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* **28**(8): 1857-1862.

Zinger L, Lionnet C, Benoiston AS, Donald J, Mercier C, Boyer F. 2021. metabaR: An r package for the evaluation and improvement of DNA metabarcoding data quality. *Methods in Ecology and Evolution* **12**(4): 586-592.

Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution* **1**(1): 3-14.

Annexes

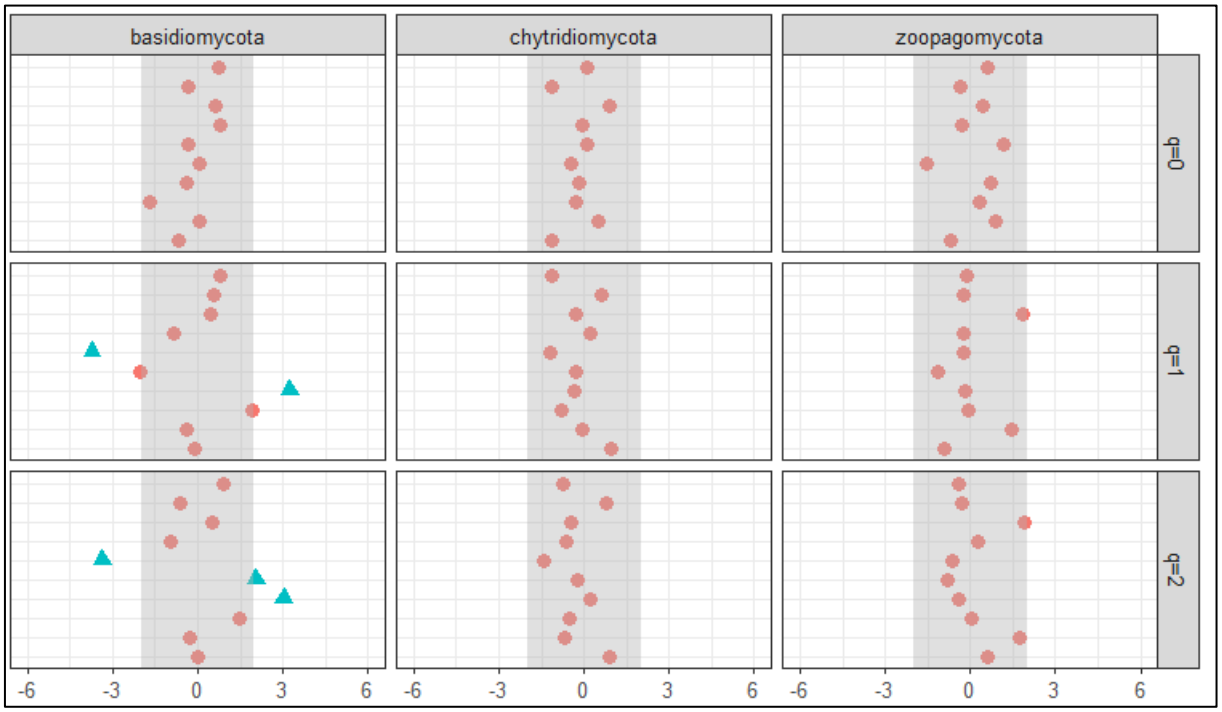


Figure S8- Réponse de la diversité alpha pour chaque phylum fongique et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

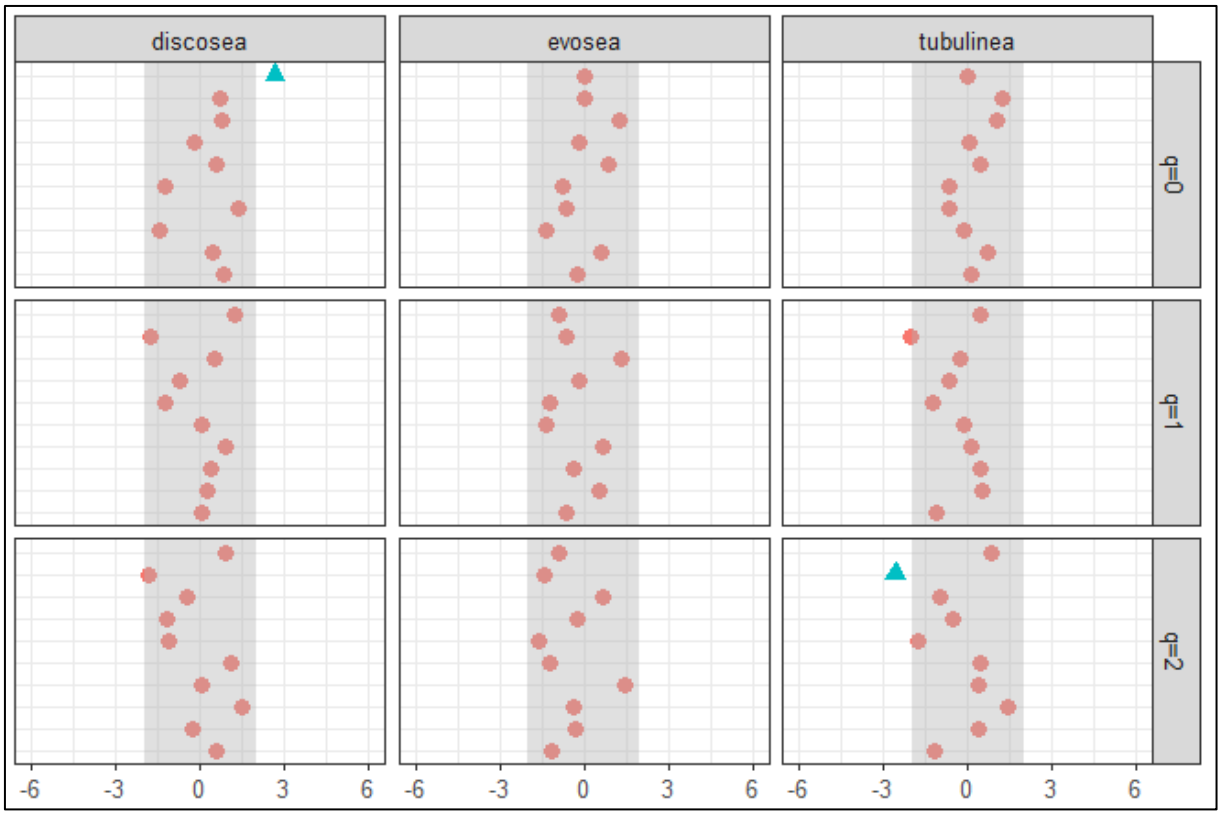


Figure S9- Réponse de la diversité alpha pour chaque phylum d'amibe et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

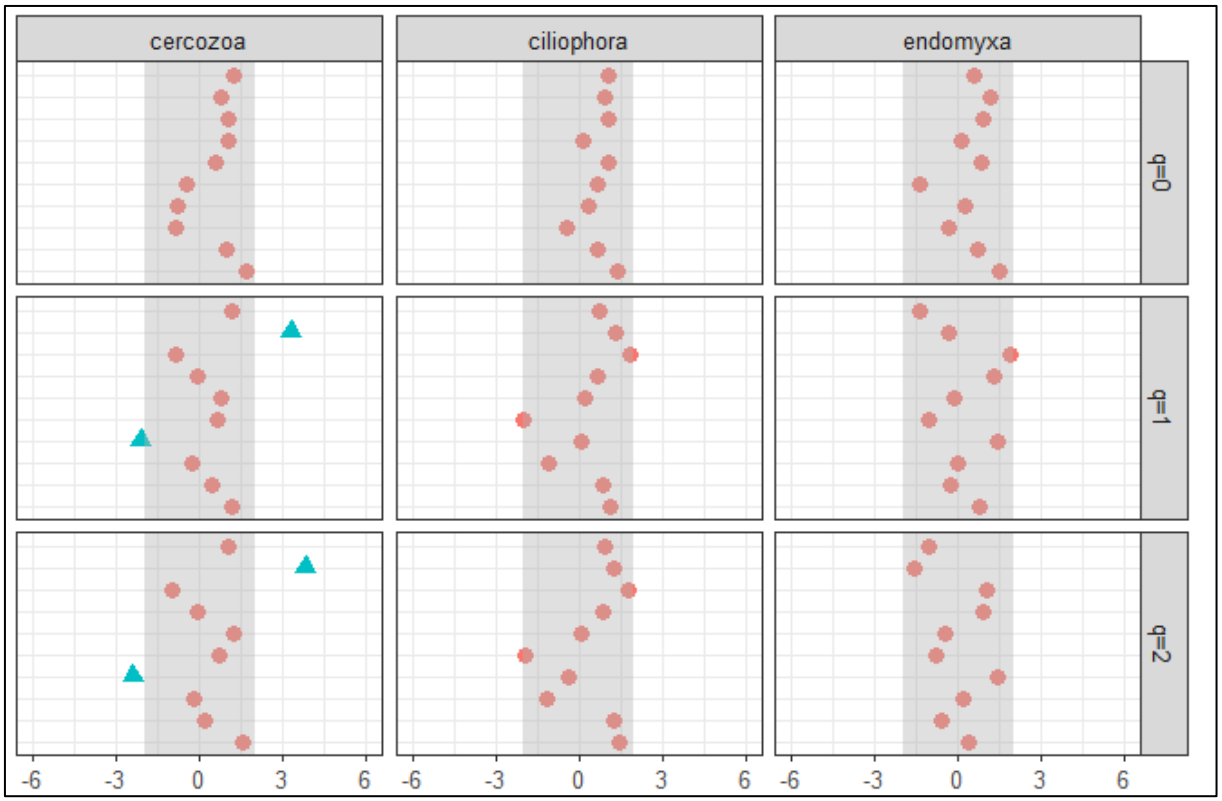


Figure S10- Réponse de la diversité alpha pour chaque phylum unicellulaire et nombre de Hill (richesse en espèces, q=0 ; indice de Shannon q=1 ; inverse de l'indice de Simpson, q=2) aux variables explicatives représentant la structure du peuplement forestier et du sol. Les triangles bleus indiquent les effets significatifs (p<0,05) et les cercles rouges les effets non significatifs. Les zones grises correspondent à l'intervalle dans lequel les effets sont non significatifs (valeurs t ou z ± 2). Les variables significatives avec une valeur t positive ont un effet positif sur la richesse en espèces et vice versa pour une valeur t négative.

VI. Discussion générale







VI.1. Synthèse générale

Ce travail de thèse a permis de mieux observer, grâce au metabarcoding de l'ADNe, les réponses de la biodiversité du sol face à la fragmentation et à la qualité de l'habitat, tout du moins dans les forêts anciennes du Sud-Ouest de la France. Dans un premier temps, nous avons vu que les communautés de champignons avaient des réponses complexes face à la fragmentation forestière passée et récente – et pu différencier les réponses selon les guildes trophiques et les formes de croissance. Ces observations confirment que la fragmentation passée à des effets sur le long terme et notamment encore visible de nos jours. A l'échelle de la parcelle forestière, la biodiversité du sol – évaluée par l'ADNe des eucaryotes - réagit différemment à la structure du peuplement forestier. Plus précisément, une caractéristique comme la présence de bois mort debout peut avoir à la fois un effet positif et antagoniste sur la diversité taxonomique chez les arthropodes et les basidiomycètes respectivement. Enfin, le dispositif expérimental mis en place durant la thèse a permis de montrer la difficulté d'observer la présence de réseaux mycorhiziens et leurs effets bénéfiques sur la régénération des jeunes hêtres, confirmant le besoin d'améliorer ces dispositifs expérimentaux pour observer les possibles réseaux mycorhiziens en forêts anciennes.

VI.1.1. Conséquence de la fragmentation et de la qualité de l'habitat en forêts anciennes

Bien que les forêts anciennes abritent des espèces rares ou menacées (Peterken & Game, 1984 ; Spencer & Kirby, 1992 ; Brunet, 1993 ; Flensted *et al.*, 2016), peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur les micro-organismes du sol en forêts anciennes (Grilli *et al.*, 2017 ; Mony *et al.*, 2020 ; Berges & Dupouey, 2021).

Le volet 3 avait pour objectif d'étudier les conséquences de la fragmentation forestière sur les champignons des sols des forêts anciennes, décrits par leur ADNe, et de comparer ces effets selon les guildes trophiques et les formes de croissances considérées comme proxy des moyens de dispersion. Les résultats du volet 3 ont permis de décrire qualitativement et quantitativement les communautés fongiques présentes dans les sols de forêts anciennes. Notre dispositif n'a pas confirmé l'hypothèse sur la quantité d'habitat dans le paysage (Fahrig, 2013), mais il a pu démontrer que la diversité des communautés de champignons répondait principalement négativement à la fragmentation passée de l'habitat. Il y a été démontré que les effets passés avaient encore des conséquences sur les communautés, notamment floristiques, en lien avec la longévité des plantes (Berges & Dupouey, 2021). Dans les Rocheuses, Smith *et al.* (1992) ont montré qu'un génet (colonie clonale) d'*Armillaria bulbosa* – un champignon parasite de racines d'arbres- était sans doute installé depuis 1 500 ans, apportant un premier aperçu de la longévité potentielle de certains champignons. Tout comme les plantes, la fragmentation passée modifie la composition actuelle des espèces à colonisation lente (Vellend *et al.*, 2006) aboutissant sur le long terme à un crédit de recolonisation qui ne pourrait

jamais être payée (Dupouey *et al.*, 2002). Nous n'avons pas évalué l'âge des génets ni des arbres dans le cas de cette étude, mais ces résultats soulignent l'important temps de réponse des champignons à la fragmentation.

Un des points novateurs de notre étude est d'avoir réussi à décorréler la quantité d'habitat et la fragmentation de l'habitat comme conseillé par Fahrig (2017). Pour une même quantité d'habitat, il peut y avoir une différence entre le nombre d'habitats dans le paysage. Mon premier article contribue ainsi à apporter des connaissances non négligeables sur les conséquences de la fragmentation de l'habitat sur les micro-organismes. En effet, peu d'études se sont intéressées à ce sujet (Grilli *et al.*, 2017 ; Mony *et al.*, 2020). Dans les Cévennes, Mennicken *et al.* (2020) avaient ciblé l'impact de la quantité d'habitat – et non de la fragmentation- sur la diversité des communautés du sol, dans un paysage constitué aujourd'hui à 80% de forêts (Mennicken *et al.*, 2020). Notre étude se démarque par la zone d'échantillonnage qui s'est déroulée essentiellement dans le Gers. Le Gers est le département le moins boisé de l'Occitanie avec 13% de surface forestière (CNPF Occitanie, 2023) ce qui signifie que la proportion de forêt ancienne en surface forestière totale est relativement faible.

Depuis des siècles, la gestion forestière tend à modifier la structure des peuplements et la biodiversité associée (Larsson, 2000). L'extinction locale d'individus peut être difficilement compensée par la colonisation à cause de l'isolement et la baisse de la taille de l'habitat. Néanmoins, une gestion forestière adéquate peut être envisagée comme une solution pour préserver la biodiversité forestière (Gosselin & Laroussinie, 2004). Actuellement, peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la gestion forestière en forêt ancienne (Berges & Dupouey, 2021), encore moins sur les communautés du sol. Les résultats du cinquième volet, ciblé sur les communautés du sol décrites par l'ADNe, ont montré (i) que les modifications structurelles du peuplement suite à la gestion forestière pouvaient influencer positivement et négativement la diversité taxonomique de la biodiversité du sol et (ii) ont ciblé les facteurs importants à prendre en compte dans la gestion forestière pour ne pas menacer la biodiversité du sol. L'utilisation combinée du metabarcoding de l'ADNe et de l'IBP a montré qu'il était possible d'obtenir des résultats significatifs sans avoir des connaissances expertes, ce qui constitue un avantage pour les gestionnaires forestiers.

VI.1.2. La biodiversité et les fonctions des champignons des sols en forêt ancienne

Ce travail de thèse a montré que les sols de forêts anciennes abritent un grand nombre de MOTUs appartenant aux champignons. Avec 41 parcelles forestières échantillonnées (volet 3), 5 134 MOTUs furent identifiées avec une moyenne de 1 239 MOTUs par parcelle. D'autres études ont aussi trouvé un grand nombre de MOTUs dans les sols de forêts anciennes. Dans les Cévennes, Mennicken *et al.* (2020) ont identifié 3 751 MOTUs et Boeraeve *et al.* (2018a) ont décrit 2 490 MOTUs dans les forêts anciennes belges. Avec 61 parcelles forestières échantillonnées dans les Alpes françaises, Mollier (2023) a observé au total 842 MOTUs avec une moyenne approximative de 88 MOTUs par parcelle, en utilisant pourtant des protocoles moléculaires et bioinformatiques similaires. Pour chacune de ces études, la majorité des MOTUs identifiées étaient mycorhiziennes et plus précisément ectomycorhiziennes – largement majoritaires en nombre d'espèces et en abondance de séquences dans les sols forestiers.

Les différences de nombre de MOTUs observées entre les différentes études invitent à intégrer d'autres facteurs explicatifs, pour raisonner à une échelle plus large. A l'inverse de Mollier (2023), les autres études dont la nôtre se situent dans un contexte paysage où la fragmentation de l'habitat est importante. Dans notre zone d'étude, la proportion des activités agricoles dans le paysage (buffer d'1km autour du point d'échantillonnage) représentait en moyenne 48% de l'occupation du sol (min : 7% ; max : 89%). Cela pourrait représenter une source de spores, ou un habitat pour certaines espèces fongiques augmentant ainsi la diversité régionale. Par ailleurs, l'hétérogénéité de la zone d'étude pourrait aussi contribuer à augmenter la diversité régionale.

VI.1.3. Influence de la maturité du peuplement sur les communautés fongiques du sol

En plus d'être influencées par l'ancienneté d'une forêt, les communautés fongiques du sol et leurs dynamiques diffèrent selon la maturité du peuplement (Bonet et al., 2004 ; Twieg et al., 2007 ; Mennicken et al., 2020 ; Tomao et al., 2020, Kranabetter et al., 2018). Lors de la sélection des parcelles pour les volets 3 et 5, nous avons tâché de répartir équitablement le gradient de maturité décrit dans Gouix *et al.* (2019). Dans le cadre de ma thèse, l'étude de l'influence de la maturité du peuplement sur la diversité fongique du sol a été observée par (i) des travaux de stagiaires et (ii) à la participation de projets scientifiques dans des forêts fortement matures classées au patrimoine mondiale de l'UNESCO en Roumanie (BENDYS - The last European old-growth ("subnatural") fir-**BE**ech forests: a lo**N**g-term and global stu**DY** for their better understanding, con**S**ervation and management) et en France (FORe - Caractérisation de la diversité **F**ongique et du s**O**l dans les **R**éserves Naturelles de France classées UNESCO à partir de l'ADN **e**nvironnemental).

En Roumanie, les résultats provisoires ont montré dans les vallées étudiées que les forêts fortement matures avaient plus de MOTUs spécifiques que les forêts matures mais plus anthropisées par le passé. Dans une des vallées, les forêts fortement matures ont une diversité alpha plus élevée que les forêts anthropisées (Dvorak et al., 2017 ; Hilmers et al., 2018). A l'inverse, dans la zone d'étude du volet 3, il n'y a pas eu de différence significative entre les deux extrêmes du gradient de maturité (forêt non mature- forêt mature) et la richesse spécifique fongique totale et ectomycorhizienne. Les inventaires des champignons du sol – détectés par le metabarcoding de l'ADNe - réalisés dans les forêts fortement matures en France ont cependant montré une richesse plus élevée par rapport à tous nos travaux précédents. A partir de 36 parcelles – et suivant le même protocole que l'article 1 - 19 630 MOTUs fongiques ont été détectées. A une échelle régionale, chaque massif forestier a révélé près de 11 000 MOTUs, soulignant une diversité importante pour ces forêts à la fois anciennes et matures.

Ces résultats suggèrent que la diversité en MOTUs fongiques est élevée dans les forêts anciennes fortement matures et qu'il n'y a pas de différence significative entre les forêts matures anthropisées ou non. Ces résultats diffèrent des précédentes études au moins acquises sur des forêts moins matures. Par exemple, Twieg *et al.* (2007) ont montré que la diversité fongique était plus faible dans les jeunes peuplements (cinq ans) de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) comparé aux peuplements les plus âgés (26, 65 et 100 ans) mais que ce constat n'avait pas été observé dans les peuplements de bouleau à papier (*Betula papyrifera*). Gomez-Hernandez *et al.* (2019) ont montré que la diversité en ECM était la plus forte dans les peuplements de *Pinus patula* âgés de 11 ans comparé aux autres peuplements (1 et 60 ans). Ces différences peuvent s'expliquer par la composition en essences dans les forêts échantillonnées qui peut modifier la diversité taxonomique des champignons (Buee *et al.*, 2011). Nous avons ciblé principalement des forêts dominées par des feuillus (chêne et hêtre) alors que les études citées mentionnent des forêts dominées par des conifères. Durant ce travail de thèse, nous n'avons pas étudié les variations de compositions des communautés fongiques le long du gradient de maturité. Twieg *et al.* (2007) ont observé que les peuplements âgés de 65 à 100 ans étaient les seuls à avoir une ressemblance entre les communautés. Gomez-Hernandez *et al.* (2019) ont montré que les peuplements de 11 ans et les peuplements de 60 avaient une composition en espèces ectomycorhiziennes similaires.

VI.1.5. Vers une écologie des paysages pour les communautés du sol ?

Les résultats du volet 3 ont permis de montrer que les champignons du sol répondaient à la fragmentation de l'habitat tout comme les macro-organismes. Cette étude se distingue des précédentes études qui ont étudié l'assemblage des micro-organismes au niveau de la parcelle (Mony *et al.*, 2020) et qu'il y a peu d'études qui prennent en compte la structure du paysage (Mennicken *et al.*, 2020 ; Mony *et al.*, 2020). L'utilisation du metabarcoding de l'ADNe en écologie du paysage a facilité la détermination des communautés fongiques qui était auparavant difficile sans des techniques de séquençage de masse (Kibblewhite *et al.*, 2008 ; Mony *et al.*, 2020). De plus, contrairement aux études récentes qui se concentrent sur les pathogènes et les évaluations des risques de maladie (Mony *et al.*, 2020 ; Cruz-Paredes *et al.*, 2021), notre étude apporte des réponses sur les autres guildes trophiques et les formes de croissance. Bien que cette étude et d'autres travaux récents apportent des nouvelles connaissances en écologie du paysage pour les micro-organismes du sol, ils demeurent encore des questions notamment sur la généralisation de nos résultats. Est-ce qu'on observerait une réponse identique pour d'autres organismes microbiens tels les bactéries et protistes ? Mennicken *et al.* (2020) ont trouvé que la réponse des bactéries et des champignons à la quantité de forêts anciennes dans le paysage était différente. Seppey *et al.* (2023) ont montré que la structure paysagère était tout aussi essentielle que les conditions environnementales pour la diversité en protistes. Dans notre étude, le paysage était essentiellement occupé par des forêts et les activités agricoles. Est-ce qu'il serait possible de trouver un constat similaire ou opposé dans d'autres types d'habitats ou régions ? Dans le nord de la Chine en milieu agro-pastoral, Su *et al.* (2022) ont montré que la richesse fongique du sol augmentait avec la fragmentation de l'habitat. En Belgique, la composition des communautés en champignons mycorhiziens arbusculaires est davantage expliquée par les conditions abiotiques locales que par la structure du paysage (Boeraeve *et al.*, 2019). Ces résultats invitent à considérer des approches multi-taxa, ce que nous souhaitons aborder prochainement en étudiant la réponse des communautés d'eucaryotes.

VI.1.6. Influence des interactions mycorhiziens sur la régénération des forêts anciennes

Les symbioses mycorhiziennes ont un rôle essentiel dans la survie et la croissance des arbres (Smith, S *et al.*, 2008). Le troisième volet s'est intéressé à l'influence des réseaux mycorhiziens communs (CMN) sur la croissance et survie de plantules de hêtre (*Fagus sylvatica*) en forêt ancienne et récente. En effet, les sols des forêts d'Occitanie sont largement dominés par des champignons ectomycorhiziens (Mennicken *et al.*, 2020), et les projets en cours sur la résilience des espèces d'arbres ectomycorhiziens tels que le hêtre et le chêne sessile invitent à tester la contribution de ces symbioses à la résilience des arbres et des forêts. Malgré des compositions de communautés différentes entre chaque paire de sites, il n'y a pas eu d'effet significatif des CMNs sur la croissance et

survie des plantules. Toutefois, l'absence de résultat est en accord avec la synthèse récente de Karst *et al.* (2023). La possible détection de CMNs est complexe et nécessite la vérification de nombreuses étapes (Karst *et al.*, 2023). Dans notre cas, la mise en place de ce type d'expérience *in situ* est peu commune. A notre connaissance, il s'agit de la première fois que le rôle des CMNs est comparé entre forêt ancienne et récente. Les études se concentrent davantage sur les compositions de communauté fongiques selon un gradient temporel (Johnson *et al.*, 2014 ; Spake *et al.*, 2016 ; Boeraeve *et al.*, 2018b). La détection de CMNs est complexe et nécessite de nombreuses étapes de vérification (Karst *et al.*, 2023) comme (i) veiller à un volume important du filet pour maximiser l'exploration racinaire, (ii) l'inclusion d'un traitement qui permet aux racines de pousser librement comme dans des conditions naturelles et (iii) examiner la composition des communautés fongiques présentes sur les racines afin de détecter la présence de champignons pathogènes qui pourraient favoriser la mort des plantules.

VI.2. Limites de l'étude

VI.2.1. Limites cartographiques

L'ensemble des sites échantillonnés dans le cadre de cette thèse se situent en forêt ancienne. Pour sélectionner les sites et estimer les variables paysagères liées à la forêt ancienne, nous nous sommes basés sur la carte de l'Etat-major. Cependant, pour un des sites, le Pinsois, il y eut un souci cartographique (Figure 45). Bien que ce bois soit documenté (Andrieu *et al.*, 2011), la parcelle échantillonnée n'apparaissait pas sur la carte de l'Etat-major. La parcelle était présente sur la carte de Cassini et sur le cadastre napoléonien. Sachant que la carte de l'Etat-major et le cadastre napoléonien ont été réalisés au XIXème siècle, il fallut se baser sur le cadastre napoléonien pour extraire les données nécessaires. Ce problème peut s'expliquer par le contexte historique.



Figure 40- Localisation de la forêt « Pinsois » sur les différentes sources cartographiques à travers le temps

VI.2.2. Limites historiques

Le Gers est un département où l'activité agricole est importante. Au cours des siècles, les forêts ont été coupées à blanc afin d'y développer des champs et des prairies. L'utilisation des cartes de l'Etat-major, nous a permis d'identifier les forêts anciennes des forêts historiques. Les forêts historiques peuvent être définies comme les forêts étant présentes sur les cartes de l' Etat-major malgré leur disparition actuelle. Dans notre zone d'étude, on observe une perte de superficie entre les forêts historiques et anciennes. Historiquement, la proportion moyenne de forêt dans le paysage de nos parcelles était de 35% (min : 2% ; max : 87%). Actuellement, la proportion moyenne de forêt ancienne dans le paysage de nos parcelles est de 28% (min : 2% ; max : 84%). Nos résultats montrent le rôle essentiel qu'ont les forêts anciennes pour le maintien des communautés fongiques du sol. Cependant, il aurait été intéressant d'étudier l' hypothétique influence des forêts historiques sur les communautés fongiques. En effet, les conséquences des coupes à blanc sur les communautés ectomycorhiziennes sont profondes et durables (Jones *et al.*, 2003; Wallander *et al.*, 2010; Varenius *et al.*, 2016; Kyaschenko *et al.*, 2017; Varenius *et al.*, 2017). Les ECMs ne survivraient uniquement qu'en présence d'arbres hôtes et à proximité des lisières forestières (Kranabetter & Kroeger, 2001; Luoma *et al.*, 2004; Varenius *et al.*, 2017). Certaines espèces ectomycorhiziennes telles que les Suillus, Rhizopogon, Piloderma et Cenococcum survivraient sans la présence d'hôtes mais sous la forme de banque de spores ou de sclérotes dans le sol (Glassman *et al.*, 2015; Sterkenburg *et al.*, 2019). La durée de vie des spores des champignons mycorhiziens n'est pas bien renseignée (Bruns *et al.*, 2009). Il est donc possible que le sol initialement occupé par de la forêt historique ait un rôle plus important que le sol de la forêt ancienne en abritant des spores fongiques pouvant encore se disperser dans le paysage. Dans notre jeu de données utilisé pour le chapitre 3, les espèces Suillus, Rhizopogon, Piloderma et Cenococcum représentent une très faible portion des MOTUs observées (<1% cumulé). Ce faible taux pourrait s'expliquer par la transformation du sol forestier en sol agricole. Les activités agricoles modifient la disponibilité en nutriments dans le sol notamment pour le phosphore et l'azote avec des répercussions sur le long terme pour la diversité spécifique et la composition des communautés ectomycorhiziennes (Diedhiou *et al.*, 2009).

VI.2.3. Limites méthodologiques

Au travers de cette thèse, il a été possible d'étudier les conséquences des actions anthropiques sur la biodiversité du sol. Pourtant, nous avons uniquement des renseignements sur leurs présences. Nous ne savons pas si les espèces sont toujours vivantes et actives. Idéalement, la solution serait d'échantillonner l'ARN au lieu de l'ADN. La durée de vie de l'ARN est estimée à quelques minutes ce qui est difficile à mettre en pratique sur le terrain. Pourtant cette technique fournirait une plus grande quantité d'informations sur les conséquences anthropiques dans les écosystèmes forestiers (Urich *et al.*, 2008).

Bien que le metabarcoding de l'ADNe couplé au séquençage à haut débit soit une technique dorénavant importante en écologie (Taberlet *et al.*, 2018 ; Zinger *et al.*, 2019) notamment pour étudier la biodiversité du sol, cette technique présente des inconvénients qui peuvent entraver des conclusions écologiquement fiables (Calderon-Sanou *et al.*, 2020). Dans notre étude pour identifier les champignons, nous avons ciblé la région ITS. Même si la région ITS est reconnue comme un « code barre » important pour les champignons (Schoch *et al.*, 2012), elle possède des défauts comme des biais d'amorces (Bellemain *et al.*, 2010) et un biais d'assignation taxonomique. En effet, le gène 5.8S situé entre les espaceurs ITS1 et ITS2 est conservé entre les espèces fongiques à l'inverse des espaceurs qui sont eux très variables (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013). L'identification de MOTU fongique dans les bases de données peut être faussée à cause de ces particularités. La correspondance dans une base de données peut se faire principalement grâce à la partie conservée au détriment des parties variables (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013). Dans ce cas, le résultat obtenu dépend plus de la longueur de la partie conservée que des parties variables (Hartmann *et al.*, 2010 ; Kang *et al.*, 2010). Si les bases de données avaient de multiples taxons avec des séquences de longueur comparable, il n'y aurait pas de soucis. Cependant, en 2011, les bases de données ne couvraient que 1 à 5% des 1 à 5 millions d'espèces de champignons estimées (Hibbett *et al.*, 2011). Le séquençage des échantillons par la technique Illumina Miseq peut être soumise à un biais méthodologique qui augmente artificiellement les MOTUs détectées (Brown *et al.*, 2015). Certains de ces soucis peuvent être corrigés en ajoutant comme contrôle positif une « communauté fictive ». La « communauté fictive » est constituée d'un ensemble connu d'organismes où l'ADN a été préalablement quantifié (Amend *et al.*, 2010 ; Huse *et al.*, 2010 ; Caporaso *et al.*, 2011 ; Ihrmark *et al.*, 2012 ; Bokulich *et al.*, 2013 ; Egge *et al.*, 2013). La communauté fictive permet d'évaluer la qualité du séquençage et les étapes de traitements (Nguyen *et al.*, 2015).

Le principal souci rencontré dans la préparation du jeu de données a été l'assignation trophique et les formes de croissance aux MOTUs fongiques. Selon le rang d'assignation taxonomique, il a été difficile d'avoir une information univoque sur l'affectation à une guilde

trophique. Dans notre jeu de données du volet 3, 18% des MOTUs ont une assignation trophique double ou triple et 38% de MOTUs n'ont pas d'assignation trophique. Ce taux passe à 52% de MOTUs non assignées à une forme de croissance. Ce manque d'informations réduit la puissance statistique et ainsi les conclusions écologiques. Il est difficilement possible de compenser ces manques d'informations en combinant plusieurs jeux de données. En effet, l'assignation des MOTUs dépend de la globalité des données et donc il est impossible de comparer des MOTUs définies dans plusieurs jeux de données (Callahan *et al.*, 2017).

VI.3. Perspectives de recherche

VI.3.1. Influence de l'intensité de la fragmentation de l'habitat sur les communautés fongiques du sol

Les résultats des volets 3 et 5 sur la diversité des microorganismes sous-entendent fortement que la diversité bêta entre les fragments forestiers dépend principalement d'un processus d'enrichissement (« nestedness »). Le site le plus pauvre en richesse spécifique ne serait qu'un sous-ensemble du site le plus riche en espèces (Baselga, 2012). Cependant, la fragmentation de l'habitat peut provoquer renouvellement des espèces (« species turnover ») dans l'espace favorisant les espèces étant le mieux adaptées aux conditions environnementales (Edge *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2021) . Des analyses préliminaires de diversité bêta et ses composantes ont été effectuées sur les guildes trophiques et les différentes formes de croissance. L'intensité de fragmentation de l'habitat a été hiérarchisée sous la forme de trois catégories « Peu », « Moyen » et « Fort ». Les résultats actuels montrent la diversité beta était significativement plus grande pour les catégories « Moyen » et « Fort » chez les Gastéroïdes, ce qui traduit donc une différenciation taxonomique selon l'intensité de fragmentation de la forêt ancienne dans le paysage.

VI.3.2. Influence de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur la composante fonctionnelle de la biodiversité du sol

Depuis plusieurs siècles, les activités anthropiques notamment le changement d'usage du sol sont des menaces importantes pour la biodiversité mondiale (Sala *et al.*, 2000 ; Rands *et al.*, 2010). La fragmentation des habitats est une conséquence importante du changement d'usage du sol et est considérée comme une menace significative pour la biodiversité (Wilcox & Murphy, 1985 ; Fahrig, 2003 ; Honnay *et al.*, 2005).

Si la sélection d'une espèce dans un milieu se fait grâce à ses traits fonctionnels, une homogénéisation ou une différenciation taxonomique devrait aboutir à une homogénéisation ou une différenciation fonctionnelle (Olden *et al.*, 2004). Des études ont montré que la relation entre la diversité bêta taxonomique et fonctionnelle pouvait changer considérablement (Smart *et al.*, 2006 ;

Naaf & Wulf, 2012 ; Sonnier *et al.*, 2014). Les facteurs influençant cette relation sont la redondance des traits parmi les espèces, la richesse spécifique régionale (Baiser & Lockwood, 2011), les conditions initiales de l'habitat et la composition des espèces (Fukami *et al.*, 2005 ; Smart *et al.*, 2006). Il a été démontré que la composante fonctionnelle de la biodiversité permet la résilience des écosystèmes (Olden *et al.*, 2004). Pour cette raison, elle devrait être étudiée tout comme la diversité taxonomique pour mieux comprendre la relation entre les perturbations et l'homogénéisation biotique (Brice *et al.*, 2017). Pourtant, c'est la composante taxonomique des communautés fongiques qui est généralement ciblée dans les études traitant de la fragmentation du paysage (Grilli *et al.*, 2017 ; Boeraeve, 2019 ; Mennicken *et al.*, 2020 ; Su *et al.*, 2022) et non la composante fonctionnelle de ces communautés.

VI.3.3. Mosaïque d'habitats versus habitat/non habitat

Durant ce travail de thèse, nous avons opté pour une vision habitat versus non-habitat pour décrire le paysage et non une vision en mosaïque d'habitats. Il a été envisagé en début de la thèse de décrire les différentes occupations du sol dans la zone tampon entourant la parcelle échantillonnée. Ces informations ont été extraites de la base de données Theia (2023). Il a été possible d'observer la surface au sol dans les zones tampons est occupée majoritairement par des feuillus et des activités agricoles (48% en moyenne pour les deux catégories). Le reste du paysage est occupé par les conifères (2%) et les caractéristiques urbaines (2%). Il n'a pas été possible d'inclure ces descriptifs dans nos études car ces différentes variables étaient corrélées aux descripteurs paysagers. Néanmoins, utiliser une vision en mosaïque d'habitats n'est pas à rejeter et prête à se questionner sur son utilité en écologie du paysage. En effet, la diversité fongique du sol est influencée par l'utilisation des terres comme la fertilisation (Hartmann *et al.*, 2015; Piazza *et al.*, 2019), l'intensité agricole (Banerjee *et al.*, 2019), la compaction (Hartmann *et al.*, 2014) et le travail du sol (Degrune *et al.*, 2017; Babin *et al.*, 2019). Au sud du Brésil, Lupatini *et al.* (2013) ont montré que le type de sol et les changements d'usages des terres en comparant des plantations diverses (eucalyptus, acacias, soja et pastèques), des prairies indigènes et des forêts indigènes avaient des effets structurant sur les communautés fongiques du sol. En milieu urbain, les écosystèmes sont très fragmentés et offrent une multitude de conditions (îlots de chaleur et exposition aux dépôts d'azote atmosphérique) pour servir d'habitats aux micro-organismes du sol (Christel *et al.*, 2023). Ainsi, au sein des paysages étudiés durant ma thèse, la diversité des milieux pourrait servir d'habitat à différentes espèces fongiques et influencer la dispersion des spores.

VI.3.4. Utilisation des réseaux de co-occurrence pour observer la résilience des communautés

Il a été soutenu que la biodiversité améliore la fonctionnalité et la stabilité des écosystèmes (Tilman *et al.*, 2006 ; Naeem & Naeem, 2009). La perte en espèces provoquerait un déclin de services écosystémiques essentiels comme la pollinisation et le cycle des nutriments (Duffy, 2009 ; Cardinale *et al.*, 2012 ; Hooper *et al.*, 2012). Néanmoins, il a été démontré que la plupart de ces études utilisaient la richesse spécifique comme mesure de la biodiversité (Balvanera *et al.*, 2006 ; Cardinale *et al.*, 2007) quel que soit le taxon cible (Mori *et al.*, 2013). La plupart de ces études se basent sur des dispositifs expérimentaux et des théories où l'identification et le nombre d'espèces ont été contrôlés (Cardinale *et al.*, 2007 ; Fargione *et al.*, 2007 ; Cardinale *et al.*, 2011) sans pour autant apporter de preuves convaincantes (Winfree & Kremen, 2009 ; Haas *et al.*, 2011 ; van Elsas *et al.*, 2012).

Avec l'application de la théorie des graphes aux réseaux écologiques, il est possible d'observer les conséquences des changements environnementaux sur la résilience et la robustesse (tolérance du réseau à la disparition d'espèces) des écosystèmes (Evans *et al.*, 2016 ; Forster *et al.*, 2021). La complexité des réseaux de co-occurrence microbienne aurait un rôle d'indicateur de la qualité environnementale (Karimi *et al.*, 2017) et, dans le cas de sol forestier, serait influencé par les perturbations anthropiques (Tian *et al.*, 2018). L'élément principal en analyse de co-occurrence est que si deux espèces sont associées alors leurs abondances auront une forte probabilité d'être corrélées (Connor *et al.*, 2017). Cependant, les réseaux ne peuvent pas expliquer ces relations mais permettent de visualiser les conséquences des changements naturels sur la robustesse de l'écosystème (Araujo *et al.*, 2011 ; Evans *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016 ; Karimi *et al.*, 2017 ; de Vries *et al.*, 2018 ; Mandakovic *et al.*, 2018). Différentes métriques sont applicables avec les réseaux de co-occurrence et permettent d'avoir des conclusions écologiquement fiables (Barroso-Bergada *et al.*, 2021). L'utilisation des réseaux de co-occurrence permettrait d'observer la résilience de la biodiversité du sol dans un gradient paysagé fragmenté et de voir si malgré un paysage forestier fortement fragmenté la qualité de l'habitat permettrait tout de même la résilience de l'écosystème.

VI.3.5. Améliorations du dispositif expérimental visant à observer la présence des CMN dans les forêts

Bien qu'il n'y ait pas eu d'effet visible des CMNs sur la croissance et la survie des plantules de hêtre, il est possible d'améliorer notre dispositif afin d'apporter une réponse plus claire. Après avoir fait un état de l'art sur les CMNs, Karst *et al.* (2023) apporte plusieurs pistes de réflexion qui devraient être prises en compte pour améliorer nos dispositifs expérimentaux. L'utilisation de colorants pour observer un flux d'eau entre les plantules via les racines et les réseaux mycorhiziens peut être une solution (Warren *et al.*, 2008). Des études contrôlées en laboratoire ont observé un déplacement d'eau deutérée avec un colorant fluorescent grâce à la redistribution hydraulique (i) depuis les racines

au champignon mycorhizien (Querejeta *et al.*, 2003) et (ii) entre plusieurs racines connectées par des hyphes ectomycorhiziens et mycorhiziens à arbuscules (Egerton-Warburton *et al.*, 2007) mais ces conclusions sont sujettes à débat (Karst *et al.*, 2023). Une approche très intéressante serait de pouvoir génotyper l'ADN fongique et des racines mycorhizées pour ensuite établir une cartographie de ces gènes (Lian *et al.*, 2006 ; Beiler *et al.*, 2010 ; Teste *et al.*, 2010 ; Beiler *et al.*, 2012 ; Van Dorp *et al.*, 2020). Sinon, une alternative pour améliorer nos traitements serait d'utiliser un sol stérilisé dans les filets de 35µm de diamètre. A la fin de l'expérience, si les hyphes fongiques externes ont réussi à pénétrer les filets, nous pourrons observer de possibles mycorhizes sur les racines des plantules (Finlay & Read, 1986). En parallèle, afin de séparer les apports de la mycorhization et les effets des CMNs aux plantules, il est aussi conseillé d'inoculer du sol stérile et non stérile dans des filets de 0,5µm de diamètre (Karst *et al.*, 2023).

VI.4. Conclusion

La biodiversité du sol en forêt ancienne est influencée par les caractéristiques physico-chimiques du sol mais aussi par la qualité de l'habitat. A l'échelle du paysage, la fragmentation de l'habitat influence négativement la diversité fongique et cela peut avoir des répercussions sur les services écosystémiques fournis par les champignons en forêt. Cette thèse a permis d'approfondir les connaissances sur les conséquences des perturbations anthropiques sur des communautés souvent ignorées dans les études écologiques mais qui sont essentielles au bon fonctionnement des forêts. A travers de ces travaux, le metabarcoding de l'ADNe du sol a été un outil précieux pour évaluer la biodiversité des forêts anciennes, notamment fongique. Sans cette technique, il aurait été difficile d'obtenir des résultats aussi concluants écologiquement dans un pas de temps réduit.

Enfin, les données récoltées permettraient d'apporter des conseils lors des plans de gestion forestière afin de conserver une qualité d'habitat nécessaire à l'établissement de la biodiversité du sol – et le volet 5 pourrait ainsi servir aux gestionnaires, ou aux utilisateurs de l'IBP par exemple. Ce rapprochement vis-à-vis des gestionnaires a déjà été initié, en particulier dans le cadre du volet 4, dans la mesure où les sites ont été décidés avec le PNR des Pyrénées Ariègeoises, ont parfois été positionné sur des parcelles privées, chez des membres de l'association Sylvestre. Que ce soit pour le déploiement à large échelle du metabarcoding de l'ADNe, ou la gestion privée des forêts, ces résultats invitent ainsi à considérer les champignons du sol, et leur diversité, notamment pour mieux appréhender la résilience des forêts sur le long terme.

Références

Amend AS, Seifert KA, Bruns TD. 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**(24): 5555-5565.

Andrieu E, Ladet S, Heintz W, Deconchat M. 2011. History and spatial complexity of deforestation and logging in small private forests. *Landscape and urban planning* **103**(2): 109-117.

Araujo MB, Rozenfeld A, Rahbek C, Marquet PA. 2011. Using species co-occurrence networks to assess the impacts of climate change. *Ecography* **34**(6): 897-908.

Babin D, Deubel A, Jacquiod S, Sørensen SJ, Geistlinger J, Grosch R, Smalla K. 2019. Impact of long-term agricultural management practices on soil prokaryotic communities. *Soil Biology and Biochemistry* **129**: 17-28.

Baiser B, Lockwood JL. 2011. The relationship between functional and taxonomic homogenization. *Global Ecology and Biogeography* **20**(1): 134-144.

Balvanera P, Pfisterer AB, Buchmann N, He JS, Nakashizuka T, Raffaelli D, Schmid B. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters* **9**(10): 1146-1156.

Banerjee S, Walder F, Büchi L, Meyer M, Held AY, Gattinger A, Keller T, Charles R, van der Heijden MG. 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *The ISME journal* **13**(7): 1722-1736.

Barroso-Bergada D, Pauvert C, Vallance J, Deliere L, Bohan DA, Buee M, Vacher C. 2021. Microbial networks inferred from environmental DNA data for biomonitoring ecosystem change: Strengths and pitfalls. *Molecular ecology resources* **21**(3): 762-780.

Baselga A. 2012. The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. *Global Ecology and Biogeography* **21**(12): 1223-1232.

Beiler KJ, Durall DM, Simard SW, Maxwell SA, Kretzer AM. 2010. Architecture of the wood-wide web: Rhizopogon spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts. *New Phytologist* **185**(2): 543-553.

Beiler KJ, Simard SW, Lemay V, Durall DM. 2012. Vertical partitioning between sister species of Rhizopogon fungi on mesic and xeric sites in an interior Douglas-fir forest. *Molecular Ecology* **21**(24): 6163-6174.

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Bmc Microbiology* **10**: 9.

Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, De Wit P, Sanchez-Garcia M, Ebersberger I, de Sousa F, et al. 2013. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* **4**(10): 914-919.

Berges L, Dupouey JL. 2021. Historical ecology and ancient forests: Progress, conservation issues and scientific prospects, with some examples from the French case. *Journal of Vegetation Science* **32**(1): 17.

Boeraeve M. 2019. *The impact of forest fragmentation on mycorrhizal communities.* PhD, KU Leuven.

Boeraeve M, Honnay O, Jacquemyn H. 2018a. Effects of host species, environmental filtering and forest age on community assembly of ectomycorrhizal fungi in fragmented forests. *Fungal Ecology* **36**: 89-98.

Boeraeve M, Honnay O, Jacquemyn H. 2019. Local abiotic conditions are more important than landscape context for structuring arbuscular mycorrhizal fungal communities in the roots of a forest herb. *Oecologia* **190**(1): 149-157.

Boeraeve M, Honnay O, Mullens N, Vandekerkhove K, De Keersmaeker L, Thomaes A, Jacquemyn H. 2018b. The impact of spatial isolation and local habitat conditions on colonization of recent forest stands by ectomycorrhizal fungi. *Forest Ecology and management* **429**: 84-92.

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* **10**(1): 57-U11.

Brice MH, Pellerin S, Poulin M. 2017. Does urbanization lead to taxonomic and functional homogenization in riparian forests? *Diversity and Distributions* **23**(7): 828-840.

Brown SP, Veach AM, Rigdon-Huss AR, Grond K, Lickteig SK, Lothamer K, Oliver AK, Jumpponen A. 2015. Scraping the bottom of the barrel: are rare high throughput sequences artifacts? *Fungal Ecology* **13**: 221-225.

Bruns TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP. 2009. Inoculum potential of Rhizopogon spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytologist* **181**(2): 463-470.

Buee M, Maurice JP, Zeller B, Andrianarisoa S, Ranger J, Courtecuisse R, Marcais B, Le Tacon F. 2011. Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecology* **4**(1): 22-31.

Calderon-Sanou I, Munkemuller T, Boyer F, Zinger L, Thuiller W. 2020. From environmental DNA sequences to ecological conclusions: How strong is the influence of methodological choices? *Journal of biogeography* **47**(1): 193-206.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *Isme Journal* **11**(12): 2639-2643.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4516-4522.

Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, Narwani A, Mace GM, Tilman D, Wardle DA, et al. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**(7401): 59-67.

Cardinale BJ, Matulich KL, Hooper DU, Byrnes JE, Duffy E, Gamfeldt L, Balvanera P, O'Connor MI, Gonzalez A. 2011. The functional role of producer diversity in ecosystems. *American Journal of Botany* **98**(3): 572-592.

Cardinale BJ, Wright JP, Cadotte MW, Carroll IT, Hector A, Srivastava DS, Loreau M, Weis JJ. 2007. Impacts of plant diversity on biomass production increase through time because of species complementarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(46): 18123-18128.

Christel A, Dequiedt S, Chemidlin-Prevost-Bouré N, Mercier F, Tripied J, Comment G, Djemiel C, Bargeot L, Matagne E, Fougeron A. 2023. Urban land uses shape soil microbial abundance and diversity. *Science of the Total Environment* **883**: 163455.

CNPF Occitanie 2023. Les forêts occitanes.

Connor N, Barberan A, Clauset A. 2017. Using null models to infer microbial co-occurrence networks. *Plos One* **12**(5): 23.

Cruz-Paredes C, Bang-Andreasen T, Christensen S, Ekelund F, Froslev TG, Jacobsen CS, Johansen JL, Mortensen LH, Ronn R, Vestergard M, et al. 2021. Bacteria Respond Stronger Than Fungi Across a Steep Wood Ash-Driven pH Gradient. *Frontiers in Forests and Global Change* **4**: 10.

de Vries FT, Griffiths RI, Bailey M, Craig H, Girlanda M, Gweon HS, Hallin S, Kaisermann A, Keith AM, Kretzschmar M, et al. 2018. Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks. *Nature communications* **9**: 12.

Degrune F, Theodorakopoulos N, Colinet G, Hiel M-P, Bodson B, Taminiau B, Daube G, Vandenbol M, Hartmann M. 2017. Temporal dynamics of soil microbial communities below the seedbed under two contrasting tillage regimes. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1127.

Diedhiou AG, Dupouey JL, Buee M, Dambrine E, Laut L, Garbaye J. 2009. Response of ectomycorrhizal communities to past Roman occupation in an oak forest. *Soil Biology & Biochemistry* **41**(10): 2206-2213.

Duffy JE. 2009. Why biodiversity is important to the functioning of real-world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* **7**(8): 437-444.

Dupouey JL, Dambrine E, Laffite JD, Moares C. 2002. Irreversible impact of past land use on forest soils and biodiversity. *Ecology* **83**(11): 2978-2984.

Edge CB, Fortin M-J, Jackson DA, Lawrie D, Stanfield L, Shrestha N. 2017. Habitat alteration and habitat fragmentation differentially affect beta diversity of stream fish communities. *Landscape Ecology* **32**(3): 647-662.

Egerton-Warburton LM, Querejeta JI, Allen MF. 2007. Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. *Journal of Experimental Botany* **58**(6): 1473-1483.

Egge E, Bittner L, Andersen T, Audic S, de Vargas C, Edvardsen B. 2013. 454 Pyrosequencing to Describe Microbial Eukaryotic Community Composition, Diversity and Relative Abundance: A Test for Marine Haptophytes. *Plos One* **8**(9): 15.

Evans DM, Kitson JJN, Lunt DH, Straw NA, Pocock MJO. 2016. Merging DNA metabarcoding and ecological network analysis to understand and build resilient terrestrial ecosystems. *Functional Ecology* **30**(12): 1904-1916.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**: 487-515.

Fahrig L. 2013. Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of biogeography* **40**(9): 1649-1663.

Fahrig L 2017. Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. In: Futuyma DJ ed. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, Vol 48*. Palo Alto: Annual Reviews, 1-23.

Fargione J, Tilman D, Dybzinski R, HilleRisLambers J, Clark C, Harpole WS, Knops JMH, Reich PB, Loreau M. 2007. From selection to complementarity: shifts in the causes of biodiversity-productivity relationships in a long-term biodiversity experiment. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**(1611): 871-876.

Finlay R, Read D. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* **103**(1): 143-156.

Flensted KK, Bruun HH, Ejrnaes R, Eskildsen A, Thomsen PF, Heilmann-Clausen J. 2016. Red-listed species and forest continuity - A multi-taxon approach to conservation in temperate forests. *Forest Ecology and management* **378**: 144-159.

Forster D, Qu ZS, Pitsch G, Bruni EP, Kammerlander B, Proschold T, Sonntag B, Posch T, Stoeck T. 2021. Lake Ecosystem Robustness and Resilience Inferred from a Climate-Stressed Protistan Plankton Network. *Microorganisms* **9**(3): 20.

Fukami T, Martijn Bezemer T, Mortimer SR, van der Putten WH. 2005. Species divergence and trait convergence in experimental plant community assembly. *Ecology Letters* **8**(12): 1283-1290.

Glassman SI, Peay KG, Talbot JM, Smith DP, Chung JA, Taylor JW, Vilgalys R, Bruns TD. 2015. A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist* **205**(4): 1619-1631.

Gomez-Hernandez M, Ramirez-Antonio KG, Gandara E. 2019. Ectomycorrhizal and wood-decay macromycete communities along development stages of managed Pinus patula stands in Southwest Mexico. *Fungal Ecology* **39**: 109-116.

Gosselin M, Laroussinie O. 2004. *Biodiversité et gestion forestière Connaître pour préserver. Synthèse bibliographique*: Cemagref Editions, Etudes du Cemagref, série Gestion des territoires.

Gouix N, Savoie JM, Bouteloup R, Corriol G, Cuypers T, Hannoire C, Infante Sanchez M, Maillé S, Marc D. 2019. Inventaire et caractérisation des noyaux de « vieilles forêts de plaine » Pour une continuité de la trame forestière entre Pyrénées et Massif-Central. Rapport final: Conservatoire d'espaces naturels Midi-Pyrénées / Ecole d'ingénieurs de Purpan.

Grilli G, Longo S, Huais PY, Pereyra M, Verga EG, Urcelay C, Galetto L. 2017. Fungal diversity at fragmented landscapes: synthesis and future perspectives. *Current Opinion in Microbiology* **37**: 161-165.

Haas SE, Hooten MB, Rizzo DM, Meentemeyer RK. 2011. Forest species diversity reduces disease risk in a generalist plant pathogen invasion. *Ecology Letters* **14**(11): 1108-1116.

Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P, Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME journal* **9**(5): 1177-1194.

Hartmann M, Howes CG, Abarenkov K, Mohn WW, Nilsson RH. 2010. V-Xtractor: An open-source, high-throughput software tool to identify and extract hypervariable regions of small subunit (16 S/18 S) ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Microbiological Methods* **83**(2): 250-253.

Hartmann M, Niklaus PA, Zimmermann S, Schmutz S, Kremer J, Abarenkov K, Lüscher P, Widmer F, Frey B. 2014. Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *The ISME journal* **8**(1): 226-244.

Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* **25**(1): 38-47.

Honnay O, Jacquemyn H, Bossuyt B, Hermy M. 2005. Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. *New Phytologist* **166**(3): 723-736.

Hooper DU, Adair EC, Cardinale BJ, Byrnes JEK, Hungate BA, Matulich KL, Gonzalez A, Duffy JE, Gamfeldt L, O'Connor MI. 2012. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* **486**(7401): 105-U129.

Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology* **12**(7): 1889-1898.

IGN 2023. IGN - Définition - F - Forêt.

Ihrmark K, Bödeker IT, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen KE. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region–evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* **82**(3): 666-677.

Johnson J, Evans C, Brown N, Skeates S, Watkinson S, Bass D. 2014. Molecular analysis shows that soil fungi from ancient semi-natural woodland exist in sites converted to non-native conifer plantations. *Forestry* **87**(5): 705-717.

Jones MD, Durall DM, Cairney JWG. 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist* **157**(3): 399-422.

Kang S, Mansfield MA, Park B, Geiser DM, Ivors KL, Coffey MD, Grunwald NJ, Martin FN, Levesque CA, Blair JE. 2010. The Promise and Pitfalls of Sequence-Based Identification of Plant-Pathogenic Fungi and Oomycetes. *Phytopathology* **100**(8): 732-737.

Karimi B, Maron PA, Boure NCP, Bernard N, Gilbert D, Ranjard L. 2017. Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters* **15**(2): 265-281.

Karst J, Jones MD, Hoeksema JD. 2023. Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution* **7**(4): 501-+.

Kibblewhite M, Ritz K, Swift M. 2008. Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**(1492): 685-701.

Kranabetter J, Kroeger P. 2001. Ectomycorrhizal mushroom response to partial cutting in a western hemlock-western redcedar forest. *Canadian Journal of Forest Research* **31**(6): 978-987.

Kyaschenko J, Clemmensen KE, Hagenbo A, Karltun E, Lindahl BD. 2017. Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed Pinus sylvestris stands. *The ISME journal* **11**(4): 863-874.

Larsson TB 2000. Biodiversity evaluation tools for European forests. *Conference on the Criteria and Indicators for Sustainable Forest Management at the Forest Management Unit Level*. Nancy, France: European Forest Institute. 75-81.

Lian CL, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T. 2006. Tricholoma matsutake in a natural Pinus densiflora forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytologist* **171**(4): 825-836.

Luoma DL, Eberhart JL, Molina R, Amaranthus MP. 2004. Response of ectomycorrhizal fungus sporocarp production to varying levels and patterns of green-tree retention. *Forest Ecology and management* **202**(1-3): 337-354.

Lupatini M, Jacques RJS, Antoniolli ZI, Suleiman AKA, Fulthorpe RR, Roesch LFW. 2013. Land-use change and soil type are drivers of fungal and archaeal communities in the Pampa biome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **29**: 223-233.

Mandakovic D, Rojas C, Maldonado J, Latorre M, Travisany D, Delage E, Bihouee A, Jean G, Diaz FP, Fernandez-Gomez B, et al. 2018. Structure and co-occurrence patterns in microbial communities under acute environmental stress reveal ecological factors fostering resilience. *Scientific Reports* **8**: 12.

Mennicken S, Kondratow F, Buralli F, Manzi S, Andrieu E, Roy M, Brin A. 2020. Effects of past and present-day landscape structure on forest soil microorganisms. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 118.

Mollier S. 2023. *Ecologie historique et conservation de la biodiversité des forêts anciennes dans les espaces protégés de montagne : une approche multitaxonomique.* PhD, Université Grenoble-Alpes Grenoble.

Mony C, Vandenkoornhuyse P, Bohannan BJM, Peay K, Leibold MA. 2020. A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Frontiers in Microbiology* **11**: 16.

Mori AS, Furukawa T, Sasaki T. 2013. Response diversity determines the resilience of ecosystems to environmental change. *Biological Reviews* **88**(2): 349-364.

Naeem S, Naeem S. 2009. *Biodiversity, ecosystem functioning, and human wellbeing an ecological and economic perspective*. Oxford ;: Oxford University Press.

Nguyen NH, Smith D, Peay K, Kennedy P. 2015. Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist* **205**(4): 1389-1393.

Olden JD, Poff NL, Douglas MR, Douglas ME, Fausch KD. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution* **19**(1): 18-24.

Peterken G, Game M. 1984. Historical factors affecting the number and distribution of vascular plant species in the woodlands of central Lincolnshire. *The Journal of Ecology* **72**: 155-182.

Piazza G, Ercoli L, Nuti M, Pellegrino E. 2019. Interaction between conservation tillage and nitrogen fertilization shapes prokaryotic and fungal diversity at different soil depths: evidence from a 23-year field experiment in the Mediterranean area. *Frontiers in Microbiology* **10**: 2047.

Querejeta J, Egerton-Warburton LM, Allen MF. 2003. Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia* **134**: 55-64.

Rands MR, Adams WM, Bennun L, Butchart SH, Clements A, Coomes D, Entwistle A, Hodge I, Kapos V, Scharlemann JP. 2010. Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science* **329**(5997): 1298-1303.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, et al. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**(5459): 1770-1774.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(16): 6241-6246.

Seppey CVW, Lara E, Broennimann O, Guisan A, Malard L, Singer D, Yashiro E, Fournier B. 2023. Landscape structure is a key driver of soil protist diversity in meadows in the Swiss Alps. *Landscape Ecology* **38**(4): 949-965.

Smart SM, Thompson K, Marrs RH, Le Duc MG, Maskell LC, Firbank LG. 2006. Biotic homogenization and changes in species diversity across human-modified ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**(1601): 2659-2665.

Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB. 1992. The fungus Armillaria bulbosa is among the largest and oldest living organisms. *Nature* **356**(6368): 428-431.

Smith S, Read D, Read D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

Sonnier G, Johnson SE, Amatangelo KL, Rogers DA, Waller DM. 2014. Is taxonomic homogenization linked to functional homogenization in temperate forests? *Global Ecology and Biogeography* **23**(8): 894-902.

Spake R, van der Linde S, Newton AC, Suz LM, Bidartondo MI, Doncaster CP. 2016. Similar biodiversity of ectomycorrhizal fungi in set-aside plantations and ancient old-growth broadleaved forests. *Biological conservation* **194**: 71-79.

Spencer J, Kirby K. 1992. An inventory of ancient woodland for England and Wales. *Biological conservation* **62**(2): 77-93.

Sterkenburg E, Clemmensen KE, Lindahl BD, Dahlberg A. 2019. The significance of retention trees for survival of ectomycorrhizal fungi in clear-cut Scots pine forests. *Journal of Applied Ecology* **56**(6): 1367-1378.

Su NE, Jarvie S, Yan YZ, Gong XQ, Li FS, Han P, Zhang Q. 2022. Landscape context determines soil fungal diversity in a fragmented habitat. *Catena* **213**: 11.

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*: Oxford University Press.

Teste FP, Simard SW, Durall DM, Guy RD, Berch SM. 2010. Net carbon transfer between Pseudotsuga menziesii var. glauca seedlings in the field is influenced by soil disturbance. *Journal of ecology* **98**(2): 429-439.

Theia 2023. Carte d'occupation des sols de la France métropolitaine.

Tian J, He NP, Kong WD, Deng Y, Feng K, Green SM, Wang XB, Zhou JZ, Kuzyakov Y, Ye GR. 2018. Deforestation decreases spatial turnover and alters the network interactions in soil bacterial communities. *Soil Biology & Biochemistry* **123**: 80-86.

Tilman D, Reich PB, Knops JMH. 2006. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* **441**(7093): 629-632.

Twieg BD, Durall DM, Simard SW. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* **176**(2): 437-447.

Urich T, Lanzen A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC. 2008. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. *Plos One* **3**(6): 13.

Van Dorp CH, Simard SW, Durall DM. 2020. Resilience of Rhizopogon-Douglas-fir mycorrhizal networks 25 years after selective logging. *Mycorrhiza* **30**(4): 467-474.

van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Kristufek V, Salles JF. 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(4): 1159-1164.

Varenius K, Kårén O, Lindahl B, Dahlberg A. 2016. Long-term effects of tree harvesting on ectomycorrhizal fungal communities in boreal Scots pine forests. *Forest Ecology and management* **380**: 41-49.

Varenius K, Lindahl BD, Dahlberg A. 2017. Retention of seed trees fails to lifeboat ectomycorrhizal fungal diversity in harvested Scots pine forests. *FEMS Microbiology Ecology* **93**(9): fix105.

Vellend M, Verheyen K, Jacquemyn H, Kolb A, Van Calster H, Peterken G, Hermy M. 2006. Extinction debt of forest plants persists for more than a century following habitat fragmentation. *Ecology* **87**(3): 542-548.

Wallander H, Johansson U, Sterkenburg E, Durling MB, Lindahl BD. 2010. Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests. *New Phytologist*: 1124-1134.

Wang Y, Zhang R, Zheng Q, Deng Y, Van Nostrand JD, Zhou JZ, Jiao NZ. 2016. Bacterioplankton community resilience to ocean acidification: evidence from microbial network analysis. *Ices Journal of Marine Science* **73**(3): 865-875.

Warren JM, Brooks JR, Meinzer FC, Eberhart JL. 2008. Hydraulic redistribution of water from Pinus ponderosa trees to seedlings: evidence for an ectomycorrhizal pathway. *New Phytologist* **178**(2): 382-394.

Wilcox BA, Murphy DD. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *The American Naturalist* **125**(6): 879-887.

Winfree R, Kremen C. 2009. Are ecosystem services stabilized by differences among species? A test using crop pollination. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**(1655): 229-237.

Zhao Y, Sanders NJ, Liu J, Jin T, Zhou H, Lu R, Ding P, Si X. 2021. β diversity among ant communities on fragmented habitat islands: the roles of species trait, phylogeny and abundance. *Ecography* **44**(10): 1568-1578.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Balint M, Bik H, Boyer F, Chariton AA, Creer S, Coissac E, Deagle BE, et al. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology* **28**(8): 1857-1862.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

Université de Toulouse

Titre : Conséquences de la fragmentation et de la qualité de l'habitat sur la diversité fongique du sol et les implications fonctionnelles en forêt ancienne

Mots clés : Paysage, Champignons, Forêt ancienne, Réseau Mycorhizien Commun

Résumé : Les forêts anciennes sont considérées comme des milieux riches en biodiversité avec la présence d'espèces rares ou spécialistes ce qui leur octroie une grande valeur de conservation. En France, les forêts anciennes sont les forêts antérieures au minimum forestier (milieu du 19ème siècle). Les forêts récentes sont apparues après cette période. Les champignons sont essentiels au fonctionnement des écosystèmes forestiers. Notamment, les relations mycorhiziennes peuvent faciliter la survie et la croissance des arbres dans les forêts boréales et tempérées. Le développement du metabarcoding sur l'ADNe facilite le suivi des communautés du sol. Ma thèse a pour objectif général d'aborder la surveillance de la biodiversité des sols de forêts anciennes. Précisément, durant ma thèse, nous nous sommes questionnés sur : - Les conséquences de la fragmentation forestière sur les communautés fongiques du sol ; - Le possible rôle des réseaux mycorhiziens sur la survie et la croissance des semis en forêts anciennes et récentes au moyen d'une approche expérimentale ; - L'influence de la qualité de l'habitat en forêt ancienne sur les communautés de la biodiversité du sol. A l'aide d'un échantillonnage du sol conséquent et de l'utilisation du metabarcoding de l'ADNe, il a été démontré que les réponses fongiques à la fragmentation passée et actuelle étaient complexes mais confirment que la fragmentation passée influence encore de nos jours les communautés fongiques. L'approche expérimentale mise en place dans différentes parcelles forestières n'a pas permis de montrer une influence significative des réseaux mycorhiziens sur la croissance et la survie des plantules. Cependant, la survie a été significativement plus élevée en forêt ancienne durant les premiers mois de l'expérimentation. A l'aide d'un indice de biodiversité potentiel, le dernier volet a montré que les principaux phylums du sol étaient sensibles à la qualité de l'habitat. Cette thèse a permis de montrer que la biodiversité du sol étaient sensibles aux perturbations anthropiques et que leurs réponses pouvaient être décalées dans le temps. Pour les gestionnaires forestiers, il est nécessaire de prendre en compte ces observations pour minimiser la perte en biodiversité du sol. Ces organismes sont essentiels au fonctionnement des forêts et leur perte pourrait perturber cet équilibre.

Title: Consequences of fragmentation and habitat quality on soil fungal diversity and functional implications in ancient forests

Key words: Landscape, Fungi, Ancient forest, Common Mycorrhizal Network

Abstract: Ancient forests are considered to be environments rich in biodiversity, with the presence of rare or specialist species, giving them a high conservation value. In France, ancient forests are those that predate the forestry minimum (mid 19th century). Recent forests appeared after this period. Fungi are essential to the functioning of forest ecosystems. In particular, mycorrhizal relationships can facilitate the survival and growth of trees in boreal and temperate forests. The development of metabarcoding on eDNA makes it easier to monitor soil communities. The general aim of my thesis is to address the monitoring of soil biodiversity in ancient forests.Specifically, during my thesis, we looked at : - The consequences of forest fragmentation on soil fungal communities; - The possible role of mycorrhizal networks on the survival and growth of seedlings in ancient and recent forests, using an experimental approach; -The influence of habitat quality in ancient forests on soil biodiversity communities. With the help of extensive soil sampling and the use of eDNA metabarcoding, it was shown that fungal responses to past and present fragmentation were complex, but confirmed that past fragmentation still influences fungal communities today. The experimental approach implemented in various forest plots did not show a significant influence of mycorrhizal networks on seedling growth and survival. However, survival was significantly higher in ancient forest during the first months of the experiment. Using a potential biodiversity index, the final section showed that the main soil phyla were sensitive to habitat quality. This thesis has shown that soil biodiversity is sensitive to human disturbance and that its response can be delayed over time. Forest managers need to take these observations into account to minimize the loss of soil biodiversity. These organisms are essential to the functioning of forests and their loss could upset this balance.