Normandie Université

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Apport de la flore du sous-bois à la bio-indication des changements temporels des sols forestiers français:application au C/N, pH et au phosphore édaphiques.

Présentée et soutenue par

RIBEMONT ROBINSON

Thèse soutenue le 10/12/2025

devant le jury composé de :

M. AUBERT MICHAEL	Professeur des Universités - URN - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. GEGOUT JEAN-CLAUDE	Professeur des Universités - AgroParisTech	Président du jury
MME LANGLOIS-SALIOU ESTELLE	Professeur des Universités - URN - Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse
M. MOREL LOIS	Maître de Conférences - Institut Agro Rennes-Angers	Membre du jury
M. NICOLAS MANUEL	Cadre de recherche - Office National des Forêts	Membre du jury
M. ARCHAUX FRÉDÉRIC	INGENIEUR DES PONTS, EAUX ET FORETS - INRAE - Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement	Rapporteur du jury
MME MONY CENDRINE	Professeur des Universités - UNIVERSITE RENNES 1	Rapporteur du jury

Thèse dirigée par **AUBERT MICHAEL** (ETUDE ET COMPREHENSION DE LA BIODIVERSITE) et **LANGLOIS-SALIOU ESTELLE** (ETUDE ET COMPREHENSION DE LA BIODIVERSITE)

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

ECODIV

« La nature semble dire à l'homme : pourquoi lever les yeux vers le ciel ? Je t'ai donné des plantes qui indiquent le temps. »
- Pline l'Ancien (23-79 av J.-C.)

Apport de la flore du sous-bois à la bioindication des changements temporels des sols forestiers français : application au C/N, au pH et au phosphore édaphiques

Robinson Ribémont

À mon grand-père, à Jeannot.

Table des Matières

TABLE DES MATIÈRES ____ **VII**

REMERCIEMENTS ____ **XIII**

INTRODUCTION GÉNÉRALE ____ **2**

1. Bioindication : histoire, définition et concepts généraux ____ **3**

2. Bioindication par la composition floristique des communautés végétales ____ **7**

2.1. Notion de communauté ____ *7*
2.2. Structure des communautés végétales ____ *8*
2.3. La composition floristique de la communauté comme bioindicateur ____ *11*

3. Bioindication par la composition floristique potentielle des communautés ____ **15**

3.1. Limites de la vision hiérarchique des filtres écologiques ____ *15*
3.2. La dark diversity, définition du concept ____ *17*
3.3. Méthodes d'estimation de la dark diversity ____ *20*

4. Bioindication par la structure fonctionnelle des communautés ____ **22**

4.1. Au-delà de la composition spécifique : la nécessité des traits fonctionnels ____ *22*
4.2. Traits de réponse et stratégies fonctionnelles : de l'individu à la communauté ____ *23*

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE ____ **26**

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ____ **31**

MATÉRIEL ET MÉTHODE GÉNÉRALE ____ **32**

1. Le REseau National de suivi à long terme des ECOsystèmes FORestiers (RENECOFOR) ____ **32**

I.1. Principe du RENECOFOR ____ *32*
I.2. Relevés floristique ____ *33*
I.3. Caractéristiques édaphiques ____ *35*

2. Valeurs Indicatrices des conditions édaphiques ____ **36**

2.1. La base de données CATMINAT ____ *36*
2.2. La base de données EcoPlant ____ *37*
2.3. Calcul des indices communautaires des conditions du sol et fonctions de transfert ____ *38*

3. Effet opérateur sur les relevés floristiques du RENECOFOR ____ **41**

3.1. Contrôle qualité du RENECOFOR ____ *41*
3.2. Quantification de l'effet observateur ____ *42*
3.2.1 Méthode ____ *42*
3.2.2 Résultats ____ *43*

CHAPITRE I 48

Understory plant indicator values poorly perform at monitoring changes in French forest soil chemical properties

Abstract 49

1. Introduction 50

2. Material & Methods 54

2.1. Long-term monitoring of forest ecosystems across a national network 54

2.1.1 RENECOFOR 54

2.1.2 Vegetation monitoring 54

2.1.3 Soil sampling 55

2.2 Understory Community Soil Index computation 55

2.2.1 Computing CSIs 55

2.2.2 Transferring species IVs from CATMINAT to EcoPlant for extensive and quantitative indicators 56

2.3. Stand characteristics and disturbances 57

2.3.1 Collecting factors potentially influencing the correspondence between temporal changes based on measured soil parameters and temporal changes based on CSI values 57

2.4. Statistical analysis 57

2.4.1 Testing the reliability of CSI values across the entire RENECOFOR network 57

2.4.2 Assessing the temporal dynamics of changes in soil chemical parameters and CSI values 58

2.4.3 Testing the degree of coupling between temporal changes in soil parameters and temporal changes in CSI values 59

2.4.4 Investigating factors influencing the degree of coupling between changes in soil chemical parameters and changes in CSI values 59

2.4.5 Statistical precision and used packages 60

3. Results 61

3.1. Evaluating the reliability of understory IVs as bioindicators of soil chemistry across the broad spatial scale of the RENECOFOR network 61

3.2. Assessing how changes in CSI values matches with soil chemistry changes over the long temporal extent of the RENECOFOR network 63

3.2.1 Soil national trends 63

3.2.2 CSIs national trends 64

3.2.3 Comparison between soil and CSIs trends 65

3.3. Identifying factors that influence the degree of coupling between measured changes in edaphic conditions and inferred changes from plant IVs 66

4. Discussion 68

4.1. Correlations at the RENECOFOR spatial scale support the ecological relevance of indicator values, despite consistent overestimations 69

4.2. Mismatches between measured and inferred changes in soil conditions challenge the use of forest understory plant IVs for monitoring soil changes 69

4.3. Factors influencing measured and indicated soil dynamics differ, explaining the mismatches 71

5. Conclusion 72

6. Acknowledgements 73

CHAPITRE 2 76

From dark to clear: Dark diversity improves the temporal and spatial bioindication of topsoil C/N in French ICP Forests

Abstract 77

1. Introduction 78

2. Materials & Methods 82

2.1. Study area and data collection 82

2.2. Constructing regional pool, site-specific species pool and dark diversity 82

2.3. Investigating species turnover within and between the different pools: observed species, dark diversity, site-specific species pool 84

2.4. Computing the understory community C/N Index 86

2.5. Statistical analysis 86

2.5.1 Estimating and characterizing dark diversity in the RENECOFOR network 86

2.5.2 Assessing the spatial coherence between vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity 87

2.5.3 Assessing the temporal coherence between vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity 87

2.5.4 Analysing species turnover among biodiversity pools and its impact on indicator value dynamics 88

2.5.5 Statistical precision and used packages 89

3. Results 91

3.1. Estimating and characterizing dark and observed diversity in the RENECOFOR network 91

3.2. Assessing the coherence between temporal changes in vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity 93

3.3. Analysing species turnover among species diversity pools and its impact on indicator value dynamics 95

4. Discussion 98

4.1. Relevance of dark diversity for bioindication of soil properties in french forests 98

4.2. Integrating dark diversity restores coherence between vegetation and soil C/N changes 100

4.3. CCNI dynamics are not explained by extinction debt or colonization credit but by local turnover between observed and dark diversity 101

4.4. Limitations and perspective 103

CHAPITRE 3 106

Leaf economics spectrum traits outperform traditional indicator values in detecting soil nutrient gradients

Abstract 107

1. Introduction 108

2. Materials & Methods 112

2.1. Study area, traits, and species selection 112

2.1.1 Site selection and edaphic gradient construction 113

2.1.2 Leaf Economic Spectrum trait-linked 113

2.1.3 Selection of constant species and construction of the dominant species assemblage in the understory 113

2.2. Field and lab measurements 115

2.2.1 Field measurements 115

2.2.2 Lab measurements 115

2.3. Statistical analyses 116

2.3.1 Data organization 116

2.3.2 Can the measured leaf traits represent the acquisition-conservation strategy? 116

2.3.3 Does the acquisition-conservation strategy vary along the nutrient edaphic gradient? 117

2.3.4 Does the acquisition-conservation strategy indicate soil C/N better than indicator values 117

3. Results 119

3.1. Leaf traits variation reflects an acquisitive–conservative strategy 119

3.1.1 *Rubus fruticosus* agg. 119

3.1.2 *Carex pilulifera* 119

3.1.3 *Lonicera periclymenum* 120

3.1.4 *The dominant community of the understory* 120

3.2. The acquisitive–conservative strategy varies along the edaphic nutrient gradient and with canopy openness 121

3.2.1 *Rubus fruticosus* agg. 121

3.2.2 *Carex pilulifera* 121

3.2.3 *Lonicera periclymenum* 121

3.2.4 *The dominant community of the understory* 122

3.3. Comparison of acquisition–conservation strategy and plant bioindicators along the soil C/N gradient 127

4. Discussion 130

4.1. Intraspecific variation shapes leaf economics spectrum responses to soil fertility 130

4.1.1 *Rubus fruticosus* agg. 130

4.1.2 *Carex pilulifera* 131

4.1.3 *Lonicera periclymenum* 131

4.2. Leaf trait variability at the community scale reveals a clear acquisitive–conservative spectrum and outperforms classical indicators along edaphic C/N gradients 132

4.3. Limitations and perspectives 134

DISCUSSION GÉNÉRALE 138

1. Préambule 139

2. Discussion méthodologique 143

2.1. Analyse comparative des dynamiques des conditions édaphiques et des communautés floristiques à l'échelle nationale 143

2.1.1 Ecart entre deux dates ou dynamique annuelle 143

2.1.2 Partitionner le réseau 146

2.2. Estimation de la diversité sombre 152

2.2.1 Pertinence du choix du principe de co-occurrence en bioindication 152

2.2.2 "Effet observateur" lors de l'estimation de la diversité sombre 154

2.3. Etude de la structure fonctionnelle des communautés du sous-bois 155

2.3.1 Choix entre moyenne de traits pondérée ou non par le recouvrement des espèces 155

3. Synthèse et mise en perspective des résultats 157

3.1. Confirmation de la pertinence de la composition floristique du sous-bois comme bioindicateur des conditions édaphiques forestière à l'échelle spatiale 157

3.1.1 Valeurs Indicatrices des communautés florisitique observée 157

3.1.2 Apport de la diversité sombre 158

3.2. La composition floristique du sous-bois ne bioindique pas les variations temporelles des conditions édaphiques forestières 160

3.2.1 L'utilisation de la diversité sombre réfute l'hypothèse d'une « dette édaphique » 160

3.2.2 Les conditions édaphiques et la végétation du sous-bois varient selon différents facteurs 161

3.2.3 Les traits fonctionnels sont des indicateurs plus sensibles que les valeurs indicatrices 163

3.3. Implications et perspectives 165

3.3.1 Remise en question de l'usage de la composition floristique comme proxy des variations des conditions environnementales dans le temps 165

3.3.2 La diveristé sombre, un nouvel outil pertinent pour la bioindication 165

3.3.3 Application des traits dans le concept de bioindication temporelle 166

4. Conclusion 168

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 170

ANNEXES 188

1. Chapitre 1 189

2. Chapitre 2 196

3. Chapitre 3 197

RÉSUMÉ GENERAL / ABSTRACT 204

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier mes parents, qui, depuis mes plus lointains souvenirs, m'ont toujours soutenu dans mes choix, fait confiance et n'ont jamais été avares de compliments ni de félicitations. Ils m'ont offert cette petite étincelle capable d'éclairer les moments de doute les plus sombres. Merci à mon père pour toutes ces heures passées devant des documentaires Arte à ses côtés, et pour m'avoir toujours pris au sérieux chaque fois que je disais : « C'est ça que je veux faire ! », en voyant des chercheurs et naturalistes descendre des falaises ou des arbres en rappel pour compter des plantes, ou simplement allongés au sol pour identifier une mousse. Merci à ma mère pour n'avoir rien lâché dans sa quête de compréhension de ce travail de thèse, et cela malgré mon manque de patience parfois désespérant. Merci et pardon pour tous les moments qu'elle a passés à s'inquiéter du présent comme de l'avenir.

Merci à mon « tonton » David d'avoir éveillé et nourri ma curiosité pour les beautés simples et fascinantes de la nature. Je ne te remercierai jamais assez pour toutes ces heures passées en forêt à ramasser des champignons ou à essayer d'identifier les oiseaux, et pour avoir animé mes plus beaux anniversaires d'enfance dans la forêt de Lyons. Mention spéciale aussi à mon oncle Vincent, qui nous a quittés cette année, et qui m'emmenait voir les cervidés dans la forêt domaniale de Blois : tonton, aujourd'hui, c'est devenu mon métier. Mille mercis à Antoine et à ma sœur Salomé, qui m'ont souvent sauvé de déprimes passagères en m'emmenant faire un tour dans la forêt de Roumare.

Pour continuer avec la famille, j'aimerais remercier tout particulièrement mon grand frère Jason, ou devrais-je dire Docteur Piquenot. Mon frère, douze années nous séparent, mais j'ai le sentiment que tant de choses nous rapprochent. Faire un doctorat en même temps a été une expérience vraiment émouvante et m'a permis de me sentir compris. Mon frère, mon partenaire de galère, merci de m'avoir montré le chemin. J'ai hâte de voir nos deux noms figurer ensemble sur un article. À mes trois grandes sœurs, Margot-Hélène, Jeanne-Alice et Salomé (oui, je vous assure, il n'y en a bien que trois), merci pour votre curiosité et votre patience. Les repas de famille ne devaient pas être simples avec vos deux geeks de frères. Blague à part, merci pour votre tendresse au quotidien, pour vos écoutes attentives et vos encouragements constants à donner le meilleur de moi-même.

À mes grands-parents, Lily et Jeannot. Je pourrais vous remercier pour tant de choses. J'ai partagé avec vous des moments charnières de mon parcours : le passage en médecine, les années de prépa, le début de mes études universitaires. À chaque fois, vous avez trouvé les mots, les gestes ou les plats pour me remonter le moral et me sortir du doute. Je dédie ce mémoire à celui qui, ces dernières années, l'a perdue : ce travail est pour toi, mon Jeannot.

Autour de la famille gravitent les amis, jamais bien loin. J'aimerais spécialement remercier mon frère de cœur Virgile, pour m'avoir poussé et encouragé à me lancer dans une thèse. Ton mantra « fais-le, sinon tu le regretteras », appuyé par les échos de Marine, m'a mis sur la bonne voie. Merci à vous deux d'être des exemples d'abnégation et de résilience, tant dans le travail que dans la vie. Luka, Clément et Rémi, merci d'être là, d'être curieux de ma vie et de me soutenir quoi que je fasse. Vous m'êtes précieux. J'ai hâte de fêter la fin de cette aventure à vos côtés.

Je voudrais également remercier toutes les personnes croisées au fil de mon parcours scolaire et universitaire, qui m'ont accompagné de près ou de loin dans mes choix. Messieurs Auboin, Mottet et Daoust, mes enseignants du lycée et de la prépa BCPST du lycée Corneille, merci de m'avoir appris ce que rigueur veut dire et de m'avoir fait comprendre que, oui, c'est bien la biologie, et surtout l'écologie, que je préfère. Merci à tous mes camarades de licence et de master pour ces années de sorties naturalistes, de raclettes automnales, de sessions de baguage ornitho (faut vraiment se lever à 5 heures du matin ?) ou de captures d'hétérocères (faut vraiment se coucher à 5 heures du matin ?). Ségolène, Adam et toute l'équipe du bar du 106, merci d'avoir transformé mon job étudiant en soirées entre amis, et d'avoir aménagé mes horaires pour me permettre de préparer le concours de l'école doctorale. Je vous dois beaucoup. Mélodie, Claire et Guillaume, mes amis doctorants des labos voisins, merci pour vos conseils avisés et vos oreilles attentives.

Ce qui m'amène à parler de ma seconde maison : le laboratoire ECODIV. Cela fait cinq ans que j'y évolue, depuis mon Master 1, entouré de personnes qui ont rendu mon quotidien plus beau, plus stimulant et qui m'ont construit en tant qu'enseignant-chercheur en devenir. Merci à mes professeurs devenus collègues, pour m'avoir montré qu'on peut être à la

fois intègre, brillant et chaleureux : Fabrice Bureau, Estelle Forey, Pierre Margerie, Lucie Vincenot, Ludovic Henneron, Aurélie Husté et Matthieu Chauvat. Mention particulière à Pierre Margerie, pour m'avoir montré qu'il existait une voie au-delà de la prépa.

Un immense, que dis-je, colossal merci à la pierre angulaire de ce laboratoire, qui, en plus de faire tourner la machine avec une efficacité redoutable, y insuffle une atmosphère bienveillante et chaleureuse. Merci à Philippe Delporte pour la rigueur en manip' et les soirées musicales partagées, à Sylvaine Buquet pour ta patience, ton écoute et tes encouragements, à Évelyne Blanchard pour ta bienveillance face au doctorant que j'étais, apprenant la gestion de données, et à Pierre Simonot pour ta bonne humeur, ta participation aux RENECOTRIP et nos échanges musicaux sur la route.

Aux moins permanents du labo, ou semi-permanents, mes collègues doctorants, ingénieurs, stagiaires, mais surtout amis, merci pour ces cinq années inoubliables. Les midis rythmés par nos conversations tantôt profondes, tantôt perchées, les Mölkkredi, les concerts, les sorties escalade, les barbecues, les anniversaires, les vacances, les mariages, tous ces moments au sein et en dehors du labo resteront gravés. Corentin Manière, pour ton humour et ta culture insondable, Angèle Berger pour ta bienveillance et ton rire devant mes jeux de mots capillotractés, Guillaume pour nos discussions beaucoup trop profondes pour un vendredi après-midi, Sezgin pour avoir été le « bully » de tes rêves, Romain Blanchard pour ton ambition de devenir un chevalier normand, et ma stagiaire Claire Barel, la meilleure stagiaire que j'aie jamais eue (certes la seule, mais la barre a été mise très haute). Un mot aussi pour la relève d'ECODIV : Nathanaël, merci de challenger mes convictions politiques et mes goûts en bande dessinée, et Lauréane, future locataire de mon bureau, je te souhaite d'y être aussi bien que moi. Louise, une fois partie tu seras la doyenne de cette équipe de doctorant, et avec toi, je la sais entre bonnes mains !

Merci à Vincent Moulin, mon encadrant de stage de M2 puis collègue : nos escapades dans les forêts des Boucles de la Seine restent gravées, notamment celle du Trait, avec un trafic, des joncs et une sacrée histoire. Merci à Chloé Folacher : je pourrais t'écrire un chapitre entier, mais je ferai court. Merci pour ta rigueur, ton exigence bienveillante, ton aide sur la communication visuelle et surtout pour la personne que tu es. À Lucas Poullard, ma seconde moitié de la team Pitchoune, je sais que tu resteras stoïque à la lecture de ces lignes, mais merci pour tout, du Limousin, où on envisageait la thèse, à notre bureau partagé, où on imagine la suite. Merci à Pierre Ganault et Agathe Toumoulin, exemples de réussite professionnelle et personnelle. J'avoue avoir pleuré comme un bébé à votre mariage. Votre amitié et votre soutien dans les moments où je touchais le fond, m'ont beaucoup aidé. Ce concert d'Aurora à illuminé mon année ! Merci, à mon « grand frère » de thèse mais surtout mon estimé ami Markus Neupert, idem, si je devais faire la liste des raisons de te remercier, je terminerais le manuscrit en 2026. Markus, je ne suis pas le premier et ne serais le dernier à te dire que ta présence fait briller le laboratoire, sur bien des points. Plus qu'un modèle professionnel, tu encourages par l'exemple chaque personne à devenir meilleure et je pense l'être devenu après ses années à tes cotés. Le seul défaut que je te trouve, c'est de ne pas avoir lu un roman de Brandon Sanderson alors que je t'en ai offert un pour tes 30 ans, inacceptable.

Après le « grand frère » de thèse, je dois exprimer mon admiration, ma gratitude et ma tendresse pour nos « parents », nos encadrants communs : Michaël Aubert et Estelle Langlois. Par où commencer ? Peut-être par expliquer que ce qui m'a poussé à faire cette thèse, c'était la certitude de la faire avec vous, Michaël et Estelle. De la licence au master, en passant par les stages d'ECODIV, vous m'aviez déjà tant appris. Au cours de ces trois années supplémentaires, vous avez fait de moi votre « padawan », jusqu'à ce que je devienne un véritable chevalier Jedi, maniant la force de l'excellence académique, la gestion de projet et l'esprit d'équipe. Mais plus encore, je vous remercie sincèrement pour les moments passés à vos côtés. Je repense très souvent à nos RENECOTRIP, qui ont cristallisé tout ce que j'aimais dans le fait de travailler avec vous. Estelle, merci pour ta patience et ta bienveillance à toute épreuve. Tu m'as donné la meilleure leçon de conduite accompagnée de ma vie lors de ces voyages (pour un adulte de 26 ans avec déjà trois ans de permis !), et je trouve que c'était l'allégorie parfaite de ton encadrement de thèse : calme, confiance et encouragement. Merci du fond du cœur. Michaël, je sais que tu n'aimes pas trop les compliments, mais je voulais te remercier de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même, avec bienveillance et surtout un humour redoutable. Sans ta question : « Tu aimes les stats, toi, non ? » lancée en réunion lors de mon stage de M2, il n'y aurait sans doute pas eu de RENECOTHÈSE, de RENECOTRIP ni même de RENECOFLAN. Alors pour ça, merci. Merci à vous deux pour votre confiance sans faille, notamment dans l'intégration au projet d'un concept aussi

classe que complexe : la dark diversity. Qui aurait cru que laisser son padawan passer du côté obscur serait une si bonne idée ?

Merci à Manuel Nicolas, le véritable et unique René Cofor. Merci pour ta gestion impeccable du réseau RENECOFOR, ta confiance et l'opportunité de présenter mes résultats aux quarante ans de l'ICP Forests, une expérience mémorable, de la conférence jusqu'aux bières autour d'un Schnitzel. Merci aussi à Jonathan Lenoir, Jean-Luc Dupouey et Simon Chollet pour votre investissement et vos précieux conseils.

Concernant le manuscrit, je remercie Frédéric Archaux, Cendrine Mony, Loïs Morel et Jean-Claude Gégout d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance. Merci également à Marion Gosselin, Florian Fort, Marina Rubio Gomez et Romain Gilbert pour leurs conseils avisés lors des Comités de Suivi Individualisés.

Enfin, je voudrais remercier une personne particulièrement importante : Jade Gauttieri. Jade, ces derniers mois ont été denses. J'ai l'impression que nous avons vécu plusieurs années en quelques jours, mais tu as rendu chacun d'eux plus doux et plus apaisant. Merci pour ton investissement et ton dévouement, passés, présents et à venir. Merci pour les heures de relecture, les conseils de typographie et d'identité visuelle : sans toi, je n'aurais pas été aussi fier du manuscrit. C'est fini. Merci pour ta patience et pour m'avoir toujours offert une « espôle » où me reposer. C'est la fin.

Ces remerciements, tels un inventaire floristique, ne sont pas exhaustifs. Je présente mes excuses à celles et ceux qui, par oubli, seraient passés dans la diversité sombre : absents mais qui mériteraient tout autant mes remerciements.

Introduction Générale

1. Bioindication : histoire, définition et concepts généraux

En 1751, Carl von Linné, figure fondatrice de la classification du vivant et de la notion de biodiversité, expose dans son *Philosophia Botanica* une idée à la fois ingénieuse et poétique : concevoir un jardin composé d'espèces florales dont l'ouverture et la fermeture des corolles marqueraient successivement les heures du jour. Cet « Horologium Florae » s'appuyait sur un principe simple mais fascinant : nombre de plantes à fleurs obéissent à un rythme circadien, si bien que leur état reflète la position du soleil et, par là même, l'écoulement du temps (Von Linné, 1751). Par exemple, l'ouverture de la fleur de *Nymphaea alba*, le nénuphar blanc, marquerait 6 heures du matin (**FIGURE 1**). Si l'idée séduit par son élégance, elle ne connut pourtant jamais de véritable essor, demeurant une curiosité confinée à quelques jardins botaniques. Ce manque de succès s'explique par la complexité du dispositif, qui ne dépendait pas uniquement de la lumière solaire : d'autres facteurs, tels que l'humidité du sol, la température ambiante ou encore la période de floraison des espèces, influencent également l'« horloge végétale ». Linné n'en demeure pas moins l'un des premiers à avoir formalisé le principe consistant à déduire une information environnementale (ici l'heure du jour) à partir d'un phénomène biologique rythmé et étroitement dépendant de son milieu.



FIGURE 1 "Horologium Florae" d'après Carl von Linné.

Il faut attendre la Renaissance puis les grandes expéditions scientifiques des XVIIIe et XIXe siècles, pour théoriser le lien entre la végétation et son habitat. En 1805, Alexander von Humboldt et Aimé Bonpland publient leur *Essai sur la géographie des plantes*, semant les graines de la phytogéographie (Humboldt & Bonpland, 1805). Cette discipline, à mi-chemin entre botanique et géographie, étudie la répartition des végétaux à la surface du globe, les causes de cette distribution, ainsi que les relations entre espèces ou communautés végétales et les caractéristiques géographiques, mésologiques (climat, sol) et biologiques (ensemble des organismes vivants). En 1815, Augustin Pyramus de Candolle et Jean-Baptiste de Lamarck dressent les premières cartes des régions botaniques de France. De Candolle détermine ensuite, à partir de l'endémisme des plantes à l'échelle mondiale, vingt régions botaniques allant des zones hyperboréales aux terres magellaniques (Candolle, 1820).

En 1896, le botaniste polonais Józef Paczoski introduit le terme « phytosociologie », désignant la discipline dédiée à l'étude des communautés végétales et de leurs relations avec le milieu (Maycock, 1967). Les pionniers de cette approche, tels que Charles Flahault et Henri Gaussen, observent que les espèces végétales ne se répartissent pas au hasard : certaines cohabitent régulièrement dans des conditions similaires. Ils définissent ainsi les associations végétales comme unités fondamentales de la couverture végétale. Plus tard, Braun-Blanquet précise cette notion : « L'association est un groupement végétal en équilibre avec le milieu, caractérisé par une composition floristique dans laquelle certains éléments exclusifs révèlent une écologie particulière » (Braun-Blanquet, 1915).

C'est entre le XIXe et le XXe siècles que le lien subtil entre les êtres vivants et les conditions de leur habitat commence à être exploité de manière systématique pour détecter les bouleversements environnementaux. La révolution industrielle, qui s'étend alors à travers l'Europe, engendre des pollutions atmosphériques sans précédent. Dans ce contexte, Grindon (1859) observe une détérioration des communautés de lichens près de Manchester et propose leur suivi comme indicateur de la qualité de l'air. Kolwitz et Marson (1902) introduisent une approche rationnelle de l'évaluation des écosystèmes aquatiques en élaborant un indice basé sur l'affinité ou l'intolérance des protozoaires vis-à-vis de la pollution organique des eaux. Cet indice sera ensuite adapté aux diatomées donnant naissance, sous l'impulsion du Cemagref (aujourd'hui INRAE), à l' « indice biologique diatomées ». Entre 1950 et 1990, Heinz Ellenberg, élève de Braun-Blanquet, mobilise la communauté des phytosociologues et de nombreux inventaires floristiques, associés à des relevés environnementaux en Europe centrale, pour concevoir une série d'indices traduisant les préférences écologiques des espèces (Ellenberg 1959, 1973, 1992). Ces indices attribuent à chaque taxon une valeur ordinale reflétant leurs tolérances ou leurs affinités pour divers facteurs : luminosité, humidité du sol et de l'air, acidité et richesse en nutriments édaphiques. Toujours largement utilisés et adaptés à d'autres régions, ces travaux constituent l'une des premières tentatives de quantification de l'information environnementale portée par la flore. Enfin, en 1968, le premier Congrès européen consacré à l'impact de la pollution atmosphérique se tient à Wageningen (Jóźwiak, 2014). Les discussions portent notamment sur les effets des polluants sur les organismes vivants et sur les méthodes permettant d'évaluer ces impacts à partir d'observations sur le vivant. Cet événement constitue une étape décisive dans la reconnaissance de l'intérêt scientifique de suivre la végétation et, plus largement, les organismes sensibles pour apprécier la qualité de l'environnement (Wilkomirski, 2013).

Plus tard, l'utilisation des organismes vivants pour évaluer l'état de l'environnement a été formalisée par Müller (1980), qui définit la bioindication comme « *la simplification des informations issues des biosystèmes permettant l'évaluation de l'ensemble d'une zone* ». Par « biosystèmes », Müller entend l'ensemble des organismes et de leurs interactions dans un écosystème, tandis que la « simplification » consiste à synthétiser cette complexité sous forme d'indicateurs, offrant ainsi une information directement exploitable pour apprécier la qualité ou l'état d'un milieu.

Dans la lignée de cette approche, Blandin (1986) précise que « *un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme, ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écocomplexe et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées* ». Nous retiendrons cette définition tout au long de ce travail.

Plus récemment, la distinction entre bioindicateurs, fournissant des informations qualitatives, et biomoniteurs, permettant des évaluations quantitatives, est clairement établie (Markert *et al.*, 2003). La définition d'un bioindicateur ou biomoniteur de qualité reste variable selon le contexte, mais s'appuie systématiquement sur cinq piliers fondamentaux : être scientifiquement connu, fiable et pertinent, sensible aux variations environnementales, reproductible, et enfin facile à identifier ou à échantillonner (Blandin, 1986 ; Markert *et al.*, 2003, **Box 1**).

Box 1 : Bioindicateur/biomoniteur : cinq critères clés.

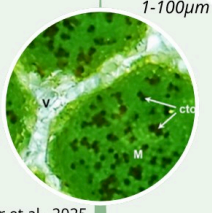


Aujourd'hui, la bioindication est appliquée dans de nombreux contextes, tel que la qualité des eaux, la gestion forestière, la protection des zones humides, les agrosystèmes ou le suivi des milieux urbains (Buckland *et al.*, 2005). Elle mobilise des formes de vie variées (protozoaires, plancton, champignons, lichens, bryophytes, trachéophytes, arthropodes ou mammifères) et opère à différents niveaux d'organisation biologiques : cellules et organites subcellulaires, tissus et organes, individus et communautés (Steubing, 1982). Parmi ces organismes, les plantes jouent un rôle central, tant à l'échelle individuelle qu'à celle des communautés (**Box 2**). Elles permettent d'orienter les actions de conservation et de guider la restauration écologique (Diekmann, 2003). Comprendre pleinement la valeur des informations qu'elles fournissent implique de définir clairement la notion de communauté végétale ainsi que la variabilité écologique propre à chaque individu.

Box 2 : Exemples d'usage de la bioindication à diverses échelles biologiques et formes de vie végétales.

Echelle subcellulaire/cellulaire

Bioindicateur: Chloroplaste de *Fagus sylvatica*.
Bioindication: Indicateur de pollution atmosphérique.
Réponse observée: Détérioration des chloroplastes, dépigmentation, stress oxydatif causé par l'ozone.
Contexte d'application: Gestion des milieux forestier.



Vollenweider et al., 2025

Echelle tissulaire/organe

Bioindicateur: Limbe de *Pteris vittata*.
Bioindication: Indicateur de pression d'herbivorie.
Réponse observée: Accumulation d'arsenic dans les feuilles, agissant comme une défense chimique contre les sauterelles.
Contexte d'application: Ecotoxicologie, agriculture et lutte biologique.



Rathinasabapathi et al., 2007

Echelle individuelle

Bioindicateur: *Arabidopsis halleri*.
Bioindication: Indicateur de pollution des sols.
Réponse observée: Accumulation de métaux lourds (Zn, Cd, Pb) dans un individu complet.
Contexte d'application: Risques industriels, sécurité agroalimentaire.



Höreth et al., 2020

Echelle communautaire

Bioindicateur: Macrophytes aquatiques (ex: Indice Biologique Macrophytique).
Bioindication: Indicateur de qualité des milieux aquatiques.
Réponse observée: Composition et diversité reflétant la qualité des milieux aquatiques (bonne santé ou pollution).
Contexte d'application: Gestion des milieux aquatiques.



Haury et al., 2006; Ziarnek, 2022

2. Bioindication par la composition floristique des communautés végétales

2.1. Notion de communauté

À l'instar de la notion de bioindication, celle de « communauté » a suivi une trajectoire complexe, reflet des débats qui ont accompagné l'essor de l'écologie. Longtemps, elle fut appréhendée de manière descriptive, comme un simple regroupement d'espèces présentes dans un même lieu et à un moment donné. Begon *et al.* (1996) la définissaient ainsi « un ensemble d'espèces coexistant dans un même espace-temps ».

Cette conception, héritée de la tradition naturaliste, mettait avant tout l'accent sur la co-occurrence des organismes. Et derrière elle, se cache un principe écologique important : pour qu'une espèce puisse intégrer une communauté, elle doit être capable de supporter les conditions abiotiques du milieu où elle s'établit. Hutchinson (1957) formalise cette idée à travers le concept de niche écologique, pensée comme un hypervolume dans lequel chaque dimension représente une ressource (alimentaire, en matériaux, en substrat, ou spatiale) ou une condition environnementale (e.g. température, précipitations, acidité). La disponibilité et la combinaison de ces dimensions varient dans l'espace et dans le temps, et déterminent les limites dans lesquelles l'espèce peut survivre et se reproduire. Hutchinson désigne cette étendue de conditions favorables comme la niche fondamentale, soit l'ensemble des conditions abiotiques permettant à l'espèce d'exister (**FIGURE 2**).

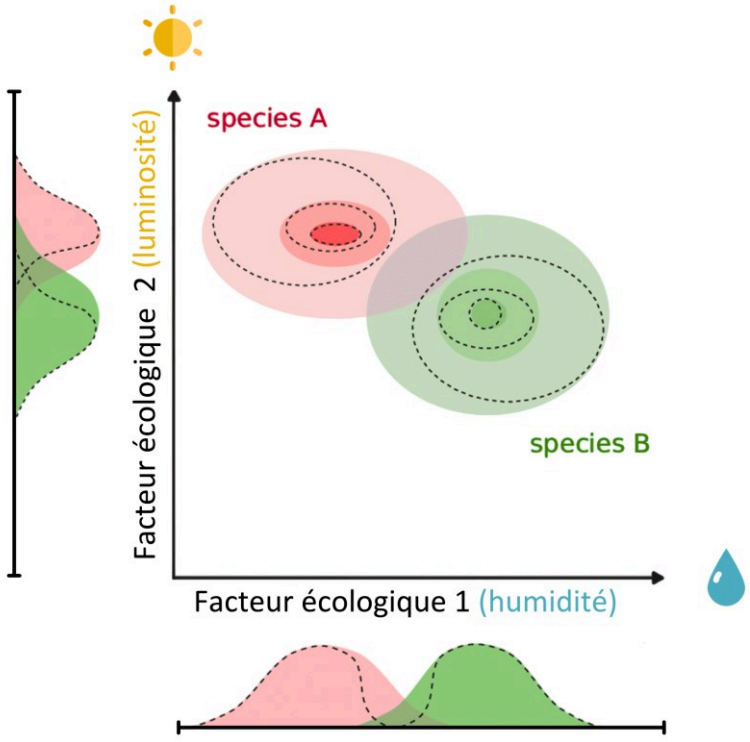


FIGURE 2 Représentation de la niche écologique selon Hutchinson en fonction de deux gradients environnementaux.

Les distributions de densité le long de chaque axe illustrent la variation de la performance des espèces A (rouge) et B (vert). Leur projection conjointe dans l'espace euclidien bidimensionnel délimite la niche fondamentale de chaque espèce. La niche réalisée, qui intègre les interactions compétitives entre A et B pour l'accès aux ressources, est représentée par les lignes discontinues.

Modifiée par Pierre Gaüzere, 2016, d'après Hutchinson 1957.

Au fil des décennies, la définition de la communauté s'est enrichie et précisée. Les clarifications épistémologiques de Fauth *et al.* (1996) ont ouvert la voie à une approche plus formelle, tandis que la montée en puissance des approches fonctionnelles et interactionnelles a mis en lumière l'importance des relations entre espèces. Compétition, facilitation, prédation ou mutualisme apparaissent ainsi comme des forces structurantes, déterminant l'espace effectivement occupé par chaque organisme. Cette dynamique rejoint la notion de niche réalisée de Hutchinson (1957), correspondant à la portion de la niche fondamentale réellement exploitée par un organisme, une fois prises en compte les contraintes biotiques imposées par les autres espèces (**FIGURE 2**). Chaque interaction contribue ainsi à définir la composition et la structure effectives de la communauté, que Molles (2010) décrit finalement comme « *une association d'espèces interagissant entre elles et vivant dans une zone donnée* ».

Dans ce cadre, nous retenons trois critères fondamentaux pour définir une communauté : (i) un ensemble d'espèces présentes dans un même espace-temps, (ii) capables de supporter les conditions abiotiques du milieu et leurs variations, et (iii) reliées entre elles par un réseau d'interactions (e.g. compétition, prédation). Une communauté peut ainsi se concevoir comme un assemblage d'espèces (e.g. végétales, animales, fongiques, bactériennes) coexistant dans un environnement donné, contraint par ses caractéristiques abiotiques (e.g. climat, sol, hydrologie) et structuré par les interactions qui les relient.

2.2. Structure des communautés végétales

La notion de communauté végétale désigne l'expression d'un ensemble d'organismes photosynthétiques capables de s'implanter, de croître et de se reproduire dans un milieu donné, dont les caractéristiques physico-chimiques et climatiques, mais aussi les composantes microbiennes et faunistiques, participent à son organisation et à sa dynamique (Langlois, 2017).

Dès le début du XXe siècle, les naturalistes américains et européens ont proposé des visions contrastées de la structuration des communautés. Clements (1916, 1936) concevait la communauté comme un « super organisme », une entité unique analogue à un organisme vivant, composée d'espèces interconnectées évoluant selon un schéma de succession relativement prévisible, depuis les stades juvéniles jusqu'au climax. À l'opposé, Gleason (1917, 1926) adoptait une perspective individualiste ou théorie du continuum : les communautés résultent de l'assemblage d'espèces individuelles, chacune répondant à ses propres contraintes écologiques et aux gradients environnementaux. Ici, les limites des communautés sont floues et arbitraires, et certaines espèces pouvaient se retrouver dans plusieurs assemblages (**FIGURE 3**). Comme le notent Walker et Del Moral (2003), Clements « voit la forêt mais néglige l'arbre », tandis que Gleason, attentif à l'arbre, peut « ne pas remarquer la forêt », mettant en lumière les complémentarités et limites de ces deux visions.

La vision de Gleason a longtemps prévalu, influençant des approches modernes telles que la « Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography » de Hubbell (2011), qui postule que la diversité et l'abondance des espèces peuvent parfois s'expliquer par des processus stochastiques, plutôt que par des différences spécifiques entre les espèces. Le hasard devient alors un acteur central de l'organisation des communautés. Cependant, au fil du temps, l'examen des attributs individuels (tolérance physiologique, capacité compétitive) a mis en évidence le rôle déterminant des contraintes environnementales et de la compétition dans la structuration des communautés végétales. D'autres interactions biotiques, comme la facilitation, ont également été reconnues pour leur importance et leurs effets positifs sur l'établissement et la persistance des espèces (Lortie *et al.*, 2004).

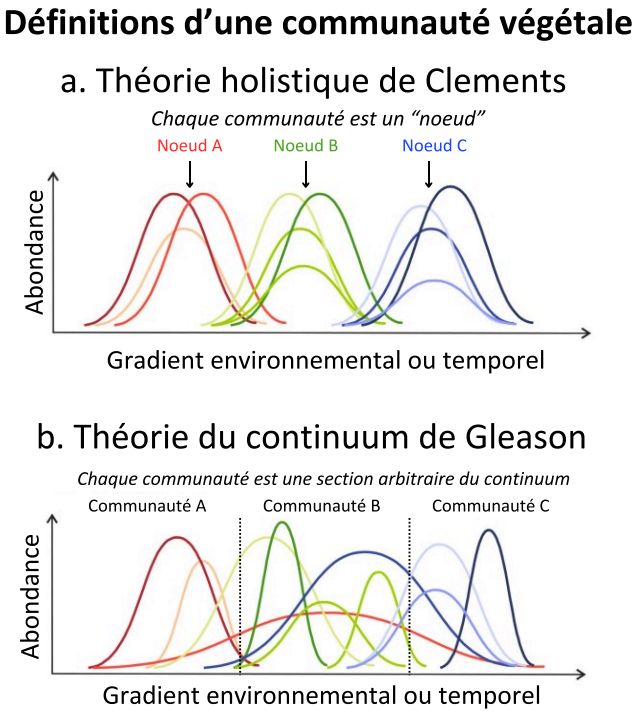


FIGURE 3 Visions contrastées de la communauté végétale selon Clements et Gleason.

Modifiée d'après Cardou et Cadotte, 2023.

En 1992, Paul Keddy propose les premières règles d'assemblage des communautés végétales, cherchant à concilier la vision individualiste de Gleason, l'approche holistique de Clements et la part de stochasticité dans l'organisation des communautés. Sa démarche consiste à identifier les espèces capables de s'implanter et de persister dans un milieu donné, à partir de la liste exhaustive des espèces présentes dans le paysage et des caractéristiques fonctionnelles qui leur sont associées (morphologiques, physiologiques ou écologiques), en fonction d'un ensemble de conditions environnementales définies. L'assemblage des communautés peut ainsi être envisagé comme une succession de filtres écologiques, éliminant progressivement les espèces dont les traits ne permettent pas de franchir les contraintes imposées par l'environnement (Keddy, 1992). Cette idée a été formalisée et élargie par Lortie *et al.* (2004), qui proposent que la structure des communautés résulte d'une combinaison synergique de processus stochastiques, des tolérances spécifiques des espèces aux conditions abiotiques locales, des interactions directes et indirectes (positives ou négatives) entre plantes, et des interactions avec d'autres organismes (**FIGURE 4**).

L'examen de ces filtres hiérarchisés montre que la composition spécifique d'une communauté végétale ne résulte pas seulement du hasard, mais de l'action conjointe de processus ordonnés. Chaque espèce d'une communauté renseigne sur les contraintes de dispersion, les conditions environnementales locales et les interactions biotiques. C'est sur cette logique que repose la bioindication par la composition floristique, offrant un outil puissant pour interpréter et suivre l'état des milieux.

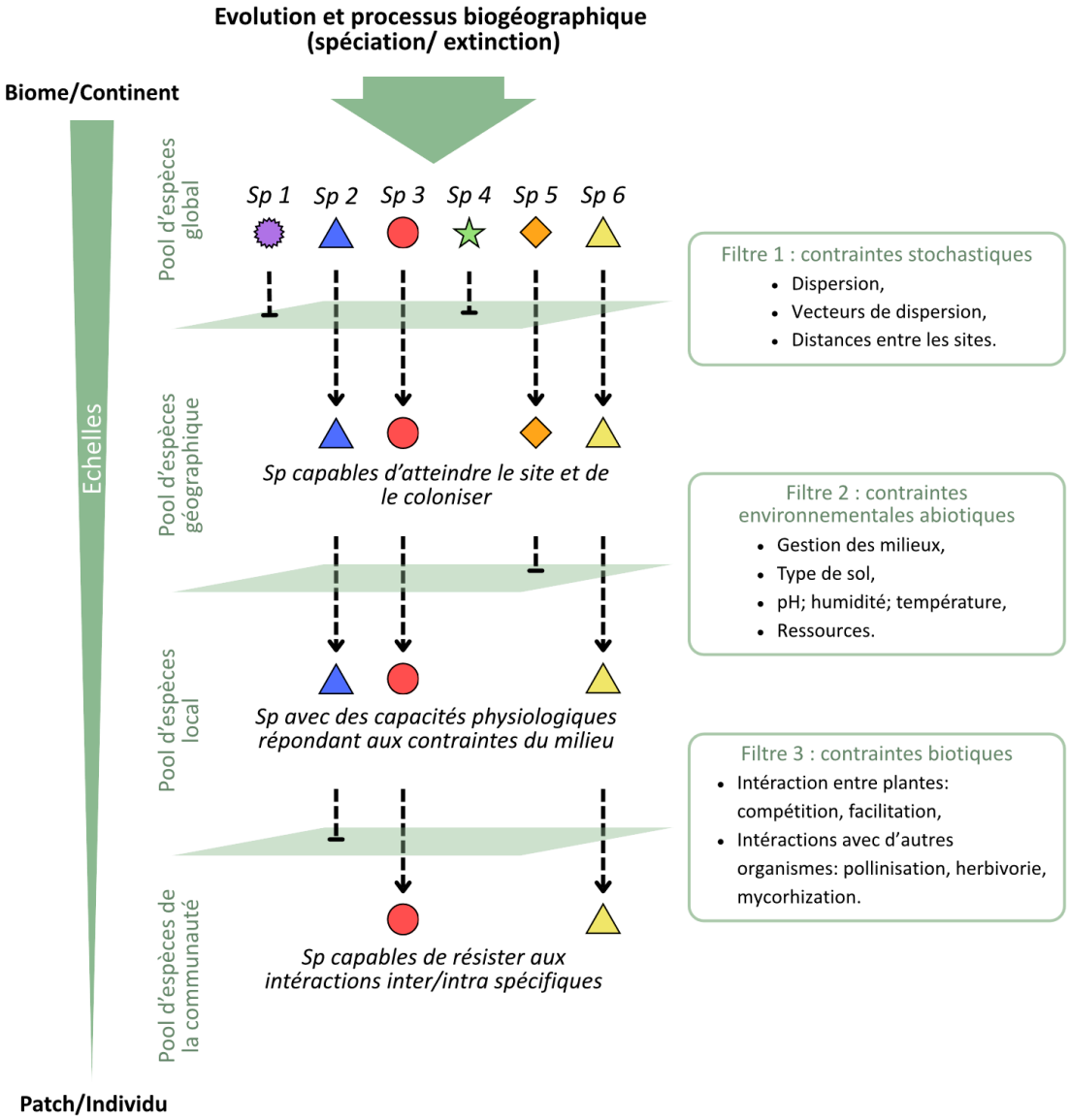


FIGURE 4 Modèle théorique des filtres environnementaux (abiotiques et biotiques) intervenant dans la structuration des communautés végétales.

L'assemblage des espèces formant une communauté résulte de tris successifs opérés par plusieurs filtres superposés. Les espèces, représentées par des symboles, sont sélectionnées en fonction de leurs traits de réponse (couleur). Ces filtres environnementaux — stochastiques, abiotiques et biotiques — s'exercent à des échelles de temps et d'espace de plus en plus fines.

D'après Keddy 1992, Belyea & Lancaster 1999, Lortie et al. 2004, Kraft et al. 2008.

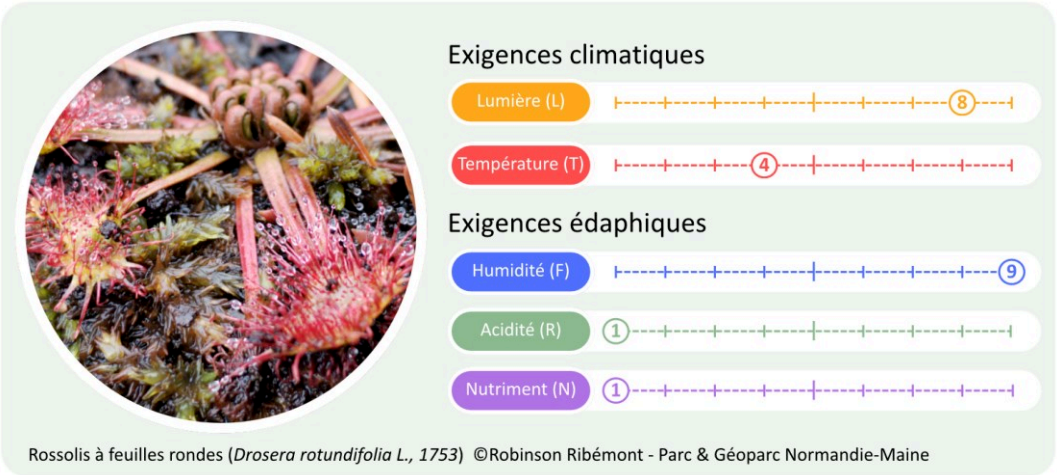
2.3. La composition floristique de la communauté comme bioindicateur

L'étude des communautés végétales repose sur l'observation de leurs compositions locales, mais ces observations n'acquièrent véritablement leur sens que si l'on précise l'échelle à laquelle elles sont réalisées. En pratique, lors de relevés floristiques, la communauté végétale est souvent circonscrite à une placette ou à un quadrat, permettant de décrire de manière concrète et opérationnelle la composition d'un site. Dans ce cadre, Braun-Blanquet (1932) a proposé une méthode systématique et descriptive, fondée sur le recensement des espèces et l'évaluation de leur abondance selon des échelles standardisées.

La présence d'une espèce reflète directement l'action des filtres écologiques (de dispersion, abiotiques et biotiques) qui déterminent quelles plantes peuvent s'établir et prospérer localement. La communauté végétale apparaît ainsi comme le produit d'une sélection fine, où chaque espèce signale, par sa simple existence, les conditions environnementales du milieu (**Box 3**).

C'est précisément ce principe qu'exploitent les indices de bioindication, à commencer par les indices d'Ellenberg (1992). À chaque espèce est attribuée une série de valeurs numériques traduisant ses préférences écologiques, reflétant ainsi sa niche fondamentale, vis-à-vis de différents facteurs : luminosité (L, de 1 = espèce d'ombre à 9 = espèce de pleine lumière), humidité du sol (F, de 1 = sols très secs à 12 = sols aquatiques), acidité (R, de 1 = sols très acides à 9 = sols très basiques), teneur en azote (N, de 1 = sols très pauvres à 9 = sols très riches) ou encore température (T, de 1 = zones alpines froides à 9 = régions méditerranéennes chaudes). Par exemple, *Drosera rotundifolia* (Rossolis à feuilles rondes), petite plante carnivore vivace de la famille des Droseraceae, affectionne particulièrement les tourbières acides. Sa présence indique de fait un milieu saturé en eau, fortement acide, où la décomposition de la matière organique extrêmement lente est à l'origine d'un milieu hyper-oligotrophe (**Box 3**).

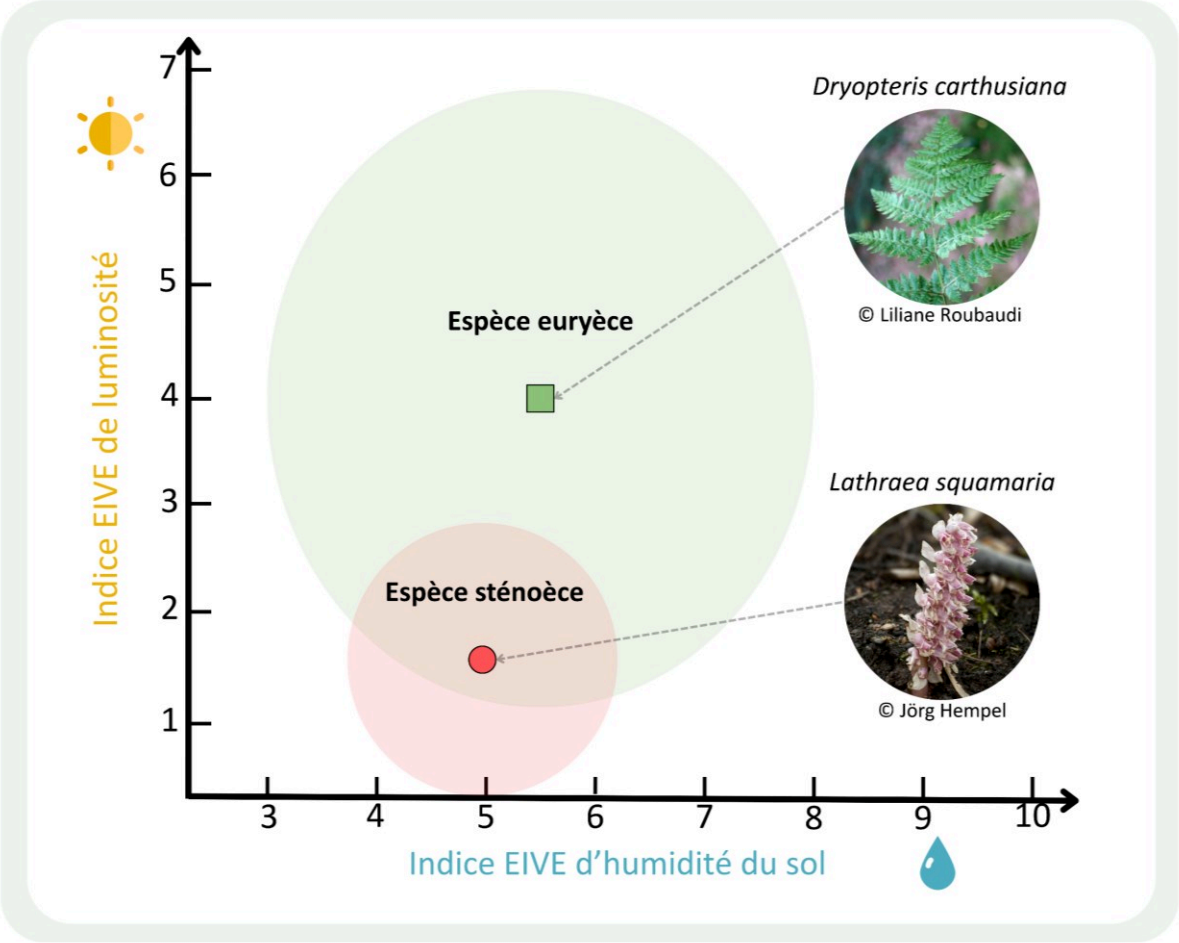
Box 3 : Indices d'Ellenberg de *Drosera rotundifolia*.



Rossolis à feuilles rondes (*Drosera rotundifolia L., 1753*) ©Robinson Ribémont - Parc & Géoparc Normandie-Maine

Cependant, toutes les espèces ne renseignent pas de manière égale sur les caractéristiques de leur milieu. L'amplitude écologique d'une espèce correspond à l'étendue des conditions qu'elle peut tolérer pour survivre et se reproduire. Certaines espèces, très tolérantes, peuvent se développer dans une grande variété d'habitats ; ce sont les euryèces. D'autres, les sténoèces, ne prospèrent que dans des conditions environnementales précises et reflètent donc plus fidèlement ces conditions. Ainsi, en bioindication, la présence d'une sténoèce constitue un indicateur plus fin, plus sensible et plus fiable qu'une euryèce (**Box 4**).

Box 4 : Espèces euryèce et sténoèce.



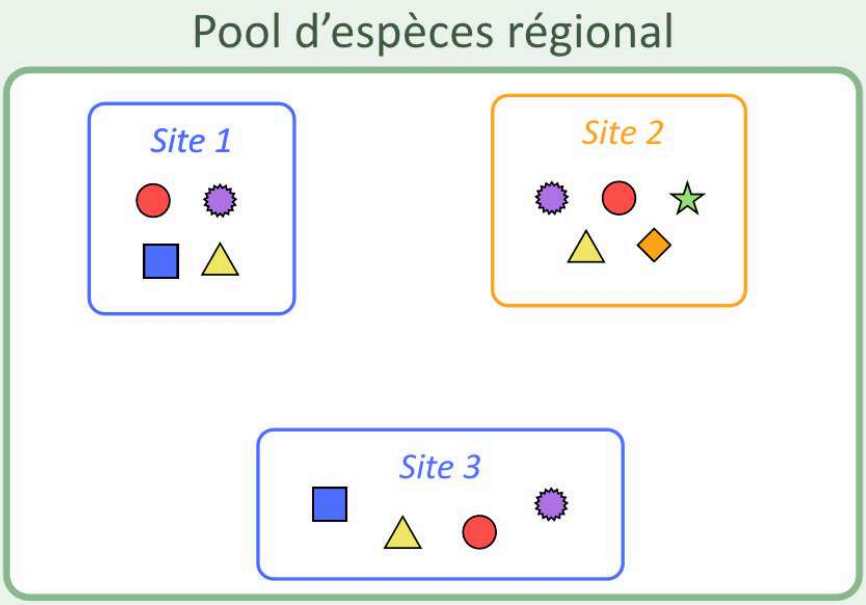
Les amplitudes écologiques des deux espèces ont été construites avec les valeurs indicatrices d'humidité du sol (M) et de luminosité (L) issues des données de Ecological Indicator Values for Europe (EIVE) 1.0 (Dengler *et al.*, 2023)

À l'échelle de la communauté, la bioindication résulte de la combinaison des niches écologiques des espèces présentes, dont la contribution au signal dépend de leur amplitude écologique. Les espèces sténoèces, étroitement spécialisées et particulièrement sensibles aux variations du milieu, offrent une forte valeur diagnostique mais présentent une reproductibilité plus faible, leur présence pouvant fluctuer au gré de légères modifications locales des conditions environnementales. À l'inverse, les espèces euryèces, dotées d'une large tolérance écologique, réagissent plus faiblement aux variations du milieu. Leur signal écologique est donc moins informatif, mais leur présence stable et régulière les rend plus faciles à observer et à suivre.

En combinant les valeurs des indices de toutes les espèces présentes dans un relevé, il devient possible de construire un indice synthétique de l'état écologique du site étudié (Ellenberg *et al.*, 1992), regroupant toutes les qualités attendues chez un bon bioindicateur (**Box 1**). Cette approche permet de révéler des similitudes ou des différences entre sites selon la composition de leurs communautés végétales : lorsque deux sites présentent une flore identique, la moyenne des indices à l'échelle de la communauté suggère que leurs conditions environnementales sont comparables, tandis qu'une divergence dans la composition floristique indique des variations correspondantes des conditions écologiques (**Box 5**). Ces indices se sont avérés particulièrement précieux pour comparer des sites ou suivre leur dynamique au fil du temps, en mettant en lumière des gradients écologiques peu marqués ou des changements induits par des perturbations (Chytrý *et al.*, 2009). De plus, ils permettent de détecter et de quantifier des conditions dont la mesure directe serait autrement coûteuse en argent, en temps et en main-d'œuvre (Diekmann, 2003), comme la disponibilité en nutriments essentiels pour la croissance des plantes (Van Sundert *et al.*, 2020), les variations de pH du sol (Delgado & Ederra, 2013) ou encore l'intensité lumineuse dans les sous-bois (Dzwonko *et al.*, 2001).

Bien que régulièrement discutés et parfois critiqués (attribution subjective des valeurs aux espèces, sensibilité locale et applicabilité géographique limitée ; Schaffers & Sýkora, 2000 ; Ewald, 2003 ; Smart & Scott, 2004 ; Zolotova *et al.*, 2022), les indices d'Ellenberg demeurent très utilisés et ont été adaptés à d'autres régions que l'Europe centrale. En France, les travaux de Philippe Julve (1998) et sa base de données phytosociologiques « Baseflor » du programme CATMINAT ont permis de développer des indices analogues, mieux calibrés pour la flore métropolitaine. Plus récemment, Dengler *et al.* (2023) ont proposé une synthèse continentale, les *Ecological Indicator Values for Europe* (EIVE), qui harmonisent et affinent les indices floristiques à l'échelle européenne. Parallèlement, le réseau EcoPlant, dirigé par Jean-Claude Gégout, a constitué une vaste base de données phytoécologiques associant relevés floristiques et caractéristiques pédologiques des stations forestières de France métropolitaine (Gégout *et al.*, 2005). Cette dernière fournit les optimums écologiques de nombreuses espèces vis-à-vis du pH du sol, du rapport C/N édaphique ou encore de la température, renforçant ainsi les fondements de la bioindication à l'échelle nationale.

Box 5 : Évaluation comparative des conditions écologiques à partir des indices floristiques moyens de différents sites.



Indices d'Ellenberg par espèce

	Humidité (F)	Lumière (L)
■	8	3
▲	6	5
●	5	5
✹	5	5
★	4	8
◆	4	9

Moyenne des indices d'Ellenberg par site

	Humidité (F)	Lumière (L)
Site 1	6	4.5
Site 2	4.8	6.4
Site 3	6	4.5

Observations

Les sites *1* et *3* présentent des communautés végétales similaires, témoignant de conditions plus humides et moins lumineuses que celles observées sur le site *2*.

3. Bioindication par la composition floristique potentielle des communautés

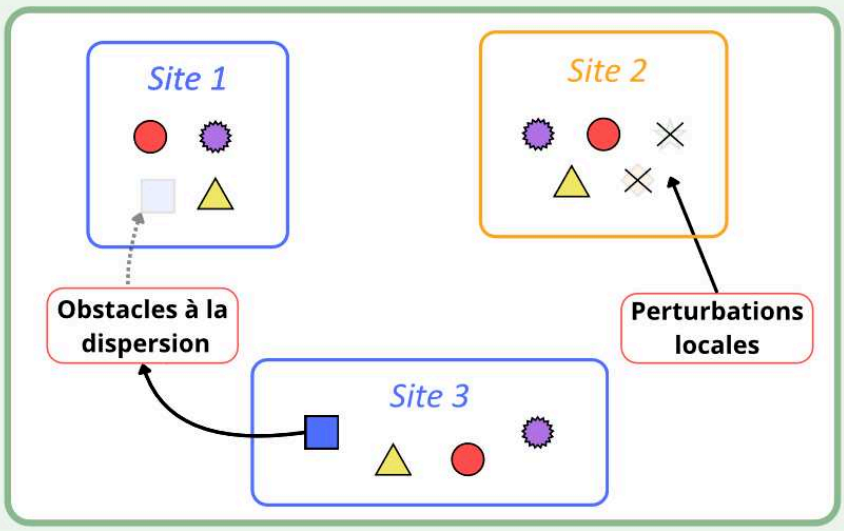
3.1. Limites de la vision hiérarchique des filtres écologiques

Si les règles hiérarchiques d'assemblage des communautés offrent un cadre théorique robuste pour comprendre la structuration des communautés végétales, leur application en bioindication comporte néanmoins plusieurs limites. La première tient à l'interdépendance des filtres. HilleRisLambers *et al.* (2012) soulignent en effet que ceux-ci n'agissent pas de manière strictement séquentielle, mais interagissent entre eux, ce qui remet en cause la hiérarchie proposée. Dans les modèles de Keddy (1992) et de Lortie (2004), le filtre stochastique lié à la dispersion est souvent présenté comme le premier, opérant à la plus large échelle spatiale. Il détermine le passage du pool d'espèces global (l'ensemble théorique des espèces potentiellement disponibles) au pool d'espèces géographique (les espèces capables d'atteindre et de coloniser un site donné, **FIGURE 4**).

En pratique cependant, des perturbations ou des contraintes paysagères locales peuvent entraver la dispersion même entre deux sites voisins, affectant ainsi le passage du pool géographique au pool régional ou local (l'ensemble des espèces adaptées aux conditions du milieu). Il en résulte que deux habitats très proches et soumis à des conditions environnementales similaires peuvent héberger des communautés différentes, si certaines espèces adaptées ne parviennent pas à coloniser l'un d'eux (**Box 6**).

Dans un tel contexte, l'application d'indices floristiques, tels que ceux proposés par Ellenberg (1992), peut conduire à des interprétations erronées : d'une part, elle peut suggérer des différences significatives entre des sites dont les conditions écologiques sont pourtant comparables ; d'autre part, elle peut indiquer une similarité basée sur la composition floristique alors que les environnements locaux divergent réellement. Se fonder uniquement sur la composition observée revient ainsi à évaluer l'état d'un milieu à partir d'un signal partiel, parfois biaisé. Ce décalage souligne l'importance de distinguer la composition effectivement observée de la composition potentielle, c'est-à-dire l'ensemble des espèces susceptibles de s'établir dans un site donné en fonction de ses conditions écologiques, mais absentes pour des raisons de dispersion limitée, d'histoire paysagère, de perturbations passées ou actuelles.

Box 6 : Décalage entre conditions environnementales réelles et communautés observées.



Indices d'Ellenberg par espèce

	Humidité (F)	Lumière (L)
■	8	3
▲	6	5
●	5	5
✹	5	5
★	4	8
◆	4	9

Moyenne des indices d'Ellenberg par site

	Humidité (F)	Lumière (L)
Site 1	5.33	5
Site 2	5.33	5
Site 3	6	4.5

Observations

Les sites *1* et *2* présentent des communautés végétales similaires en raison d'événements stochastiques (perturbations, obstacles à la dispersion). Leurs communautés suggèrent à tort des conditions d'humidité et de luminosité comparables.

3.2. La *dark diversity*, définition du concept

En 2011, Pärtel et ses collaborateurs introduisent une idée originale et éclairante pour l'étude des communautés végétales : celle de la « dark diversity » ou « diversité sombre » en français. Il s'agit de l'ensemble des espèces qui pourraient, en théorie, s'implanter dans un site donné, car elles sont écologiquement compatibles avec ses conditions, mais qui sont absentes lors des relevés floristiques de ce site (Pärtel et al, 2011).

Autrement dit, ces espèces représentent la part « manquante » de la communauté, invisible aux seules observations lors des relevés locaux, mais néanmoins significative pour comprendre le potentiel écologique du site. Cette notion complète le cadre classique de la biodiversité, qui distingue la diversité α (correspondant aux espèces effectivement exprimées sur un site) et la diversité ɣ, (englobant l'ensemble des espèces régionales). La diversité sombre se concentre sur la portion de la diversité ɣ qui pourrait être présente localement dans α, mais qui ne l'est pas en raison de contraintes stochastiques ou historiques. À la différence de la diversité β, qui mesure la variation des espèces entre plusieurs sites et capture les différences de composition spatiale, la diversité sombre s'intéresse aux espèces absentes mais potentiellement présentes selon les conditions locales (**FIGURE 5.A**)

Ce concept trouve un écho naturel dans la théorie des filtres écologiques. Les espèces de la diversité sombre d'un site appartiennent au pool régional et ont franchi les filtres abiotiques et biotiques, disposant ainsi d'une niche compatible avec le site et de la capacité théorique d'y survivre et de s'y reproduire. Leur absence locale résulte donc principalement d'une limitation à la colonisation ou à l'établissement. Les propagules peuvent ne pas atteindre le site en raison de perturbations stochastiques (e.g. tempêtes) ou parvenir sur place sans pouvoir germer ou s'enraciner à cause de contraintes micro-environnementales (e.g. la chute d'une graine sur un tapis dense de mousse empêchant son contact avec le sol et sa germination). L'absence de ces espèces ne traduit donc pas un habitat inadapté, mais reflète une limitation locale aléatoire de colonisation ou d'établissement (Partel *et al.*, 2011).

Il convient également de rappeler que l'absence d'une espèce dans un relevé ne garantit pas nécessairement son absence sur l'ensemble du site. Les relevés, souvent réalisés dans des quadrats de surface limitée, reflètent seulement la composition de l'échantillon étudié, et la probabilité de détecter des espèces moins fréquentes ou localement regroupées peut dépendre du hasard (Kéry & Schmidt, 2008). Une espèce attendue sur un site peut donc ne pas apparaître dans un relevé simplement parce que le quadrat n'a pas couvert sa micro-localisation.

La diversité sombre complète ainsi l'information fournie par la communauté observée, transformant l'absence en donnée informative et offrant un signal écologique plus complet pour interpréter l'état et le potentiel d'un milieu.

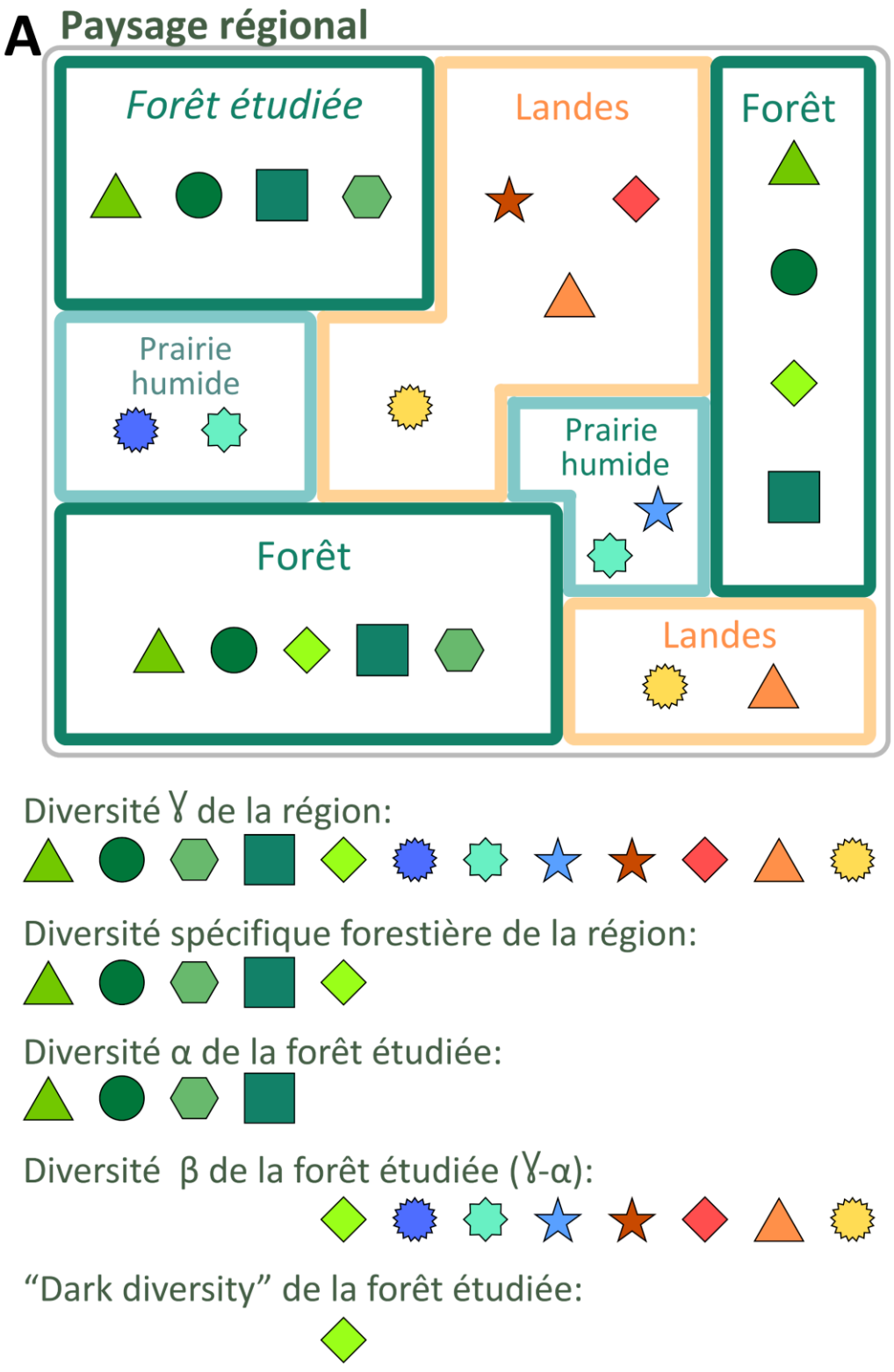


FIGURE 5.A Diversité γ, α, β et *dark diversity* appliquées à un paysage régional.

Chaque espèce est représentée par une forme et une couleur, et répartie dans trois milieux différents : la forêt (encadré vert), la prairie humide (encadré bleu) et les landes (encadré orange). La forêt étudiée présente des conditions environnementales similaires à celles des autres forêts de la région. Chacune d'elles a le potentiel d'accueillir l'ensemble de la diversité spécifique forestière régionale. Si une espèce de cette diversité régionale, bien que potentielle dans la forêt étudiée (ex. : losange vert clair), est absente, elle est alors considérée comme faisant partie de la dark diversity de la forêt étudiée.

D'après Pärtel et al., 2011.

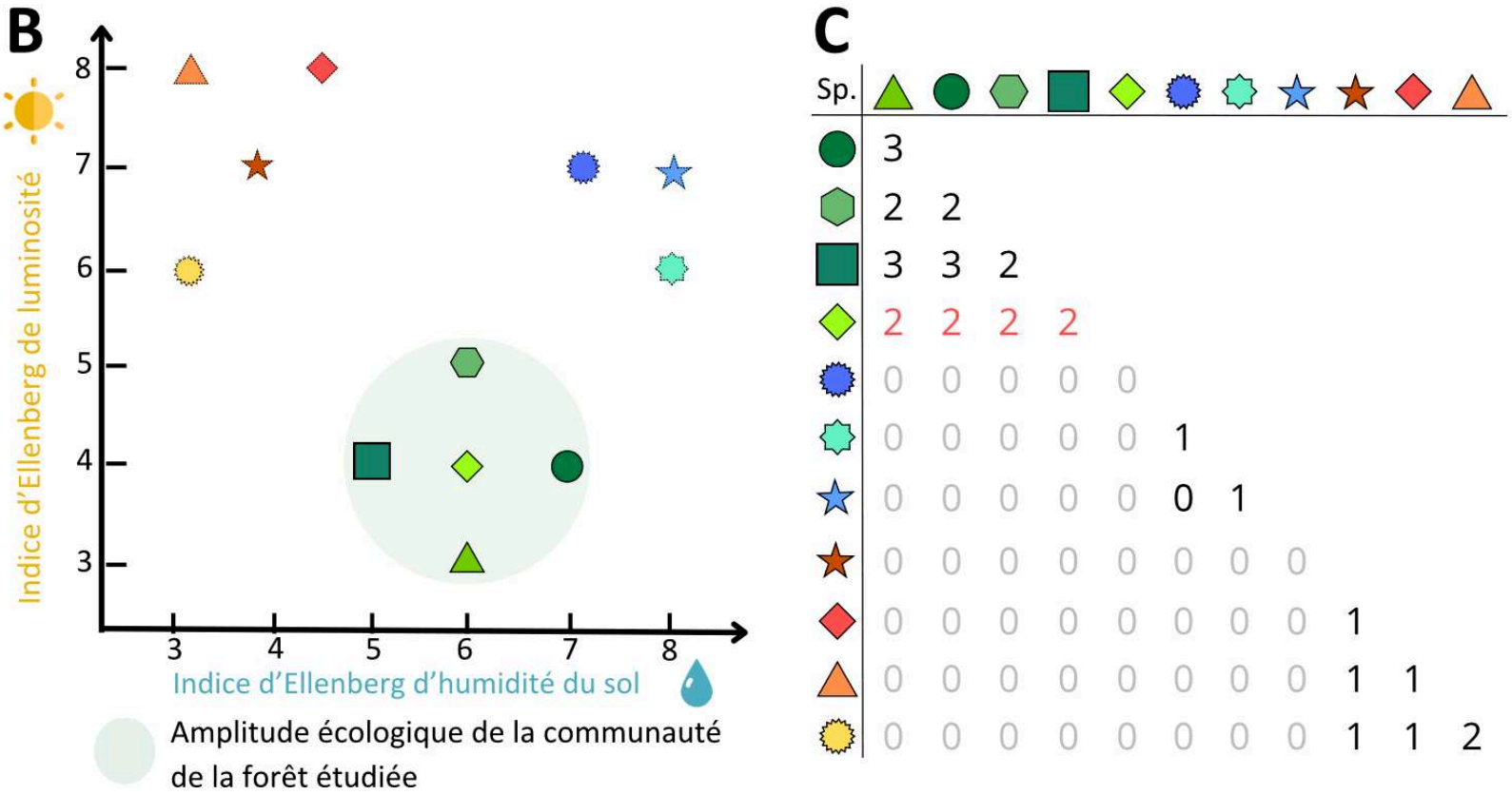


FIGURE 5. B & 5.C Méthodes d'estimation de la *dark diversity* d'un site local au sein d'une région : (B) à partir de l'amplitude écologique de la communauté végétale du site, et (C) à partir des co-occurrences régionales des espèces.

(B) À partir des indices d'Ellenberg (ou d'autres disponibles) des espèces présentes dans la forêt étudiée, et couvrant plusieurs facteurs environnementaux (ici la luminosité et l'humidité), on détermine l'amplitude écologique de la communauté. Si les indices d'une espèce absente se situent à l'intérieur de cette amplitude écologique, cela signifie qu'elle est localement adaptée mais non observée ; elle fait alors partie de la *dark diversity* de la forêt étudiée (ex. : losange vert clair).

(C) À partir de l'ensemble des relevés floristiques régionaux, on construit une matrice de co-occurrence des espèces. Si une espèce absente de la forêt étudiée (ex. : losange vert clair) co-occurre fréquemment avec les espèces présentes dans cette forêt (espèces en vert), elle est considérée comme faisant partie de la *dark diversity* de la forêt étudiée.

D'après Pärtel et al, 2011 ; Lewis et al., 2016.

L'idée que ce concept puisse trouver des applications en écologie de la restauration (Moeslund *et al.*, 2017) ou de la conservation (Lewis *et al.*, 2017 ; Morel *et al.*, 2022) a été progressivement développée à la suite des travaux fondateurs de Pärtel et de ses collaborateurs (2011). Au cours de la dernière décennie, de nombreux travaux ont mobilisé cette approche pour évaluer la complétude écologique de différents types d'habitats (Pereira-Moura *et al.*, 2024 ; Pärtel *et al.*, 2025). Toutefois, à notre connaissance, le concept de diversité sombre n'a encore jamais été intégré dans une démarche de bioindication visant à caractériser l'information écologique portée par la végétation absente, ce qui constitue un champ d'application encore largement inexploré.

3.3. Méthodes d'estimation de la *dark diversity*

Si l'intérêt théorique de considérer les espèces potentiellement présentes mais absentes d'un site commence à être reconnu, leur détection pratique reste un défi méthodologique de taille (Pärtel *et al.*, 2011, 2014 ; Lewis *et al.*, 2014). Deux approches principales, aux fondements conceptuels distincts, ont été développées pour estimer la diversité sombre.

La première s'appuie sur les exigences écologiques des espèces. Elle définit qu'une espèce appartient à la *dark diversity* si elle figure dans le pool régional (c'est-à-dire l'ensemble des espèces présentes dans une zone géographique donnée) et si, localement, toutes ses exigences écologiques sont satisfaites par le site étudié. Lewis *et al.* (2014) ont, en pratique, utilisé les indices d'Ellenberg des espèces présentes sur un site pour construire ce qu'ils nomment l'amplitude écologique de la communauté. Une espèce absente localement, mais dont les valeurs indicatrices entrent dans cette amplitude, est alors considérée comme membre de la diversité sombre (**FIGURE 5.B**). Dans le cadre de la théorie des filtres, cette méthode identifie les espèces ayant franchi le filtre abiotique, mais dont l'établissement a été empêché par d'autres contraintes. Cependant, elle présente des limites notables : elle ignore les interactions biotiques et sa fiabilité dépend fortement de la qualité et de la disponibilité des indices bioindicatifs mobilisés pour définir l'amplitude écologique de la communauté (Lewis *et al.*, 2014).

La seconde approche repose sur le principe de co-occurrence et ne nécessite pas de disposer d'informations sur les exigences écologiques des espèces au préalable. Elle s'appuie uniquement sur des relevés floristiques réalisés au sein d'une zone géographique délimitée pour l'étude, afin d'estimer la probabilité qu'une espèce absente localement fasse partie de la diversité sombre. L'idée est la suivante : si certaines espèces apparaissent fréquemment ensemble ailleurs, l'absence d'une d'elles sur un site où les autres sont présentes suggère qu'elle pourrait également s'y établir (**FIGURE 5.C**). Cette méthode permet d'identifier les espèces ayant franchi à la fois les filtres abiotiques et biotiques, leur co-occurrence fréquente reflétant leur adaptation aux conditions environnementales du site ainsi qu'aux interactions biotiques au sein de la communauté. La contrainte restante relève principalement de facteurs stochastiques ou contextuels, tels que la dispersion limitée, les perturbations locales ou d'autres événements imprévisibles qui peuvent empêcher l'établissement d'espèces par ailleurs

adaptées. L'indice de Beals illustre ce principe (Beals, 1984) : pour chaque espèce absente d'un site, il calcule la probabilité de sa présence en fonction de la fréquence avec laquelle elle co-occurre avec les espèces effectivement présentes sur ce site, à travers les relevés d'une entité géographique donnée. L'indice varie de 0 à 1, où 0 correspond à une probabilité nulle de présence et 1 à une probabilité maximale. Il permet, selon un seuil arbitraire généralement compris entre 0,80 et 0,95, de déterminer si une espèce absente d'un site peut être considérée comme membre de la diversité sombre (Trindade *et al.*, 2022, Chollet *et al.*, 2025).

La méthode hypergéométrique (Carmona *et al.*, 2019) complète et affine cette logique en s'appuyant sur un raisonnement statistique rigoureux. Elle compare, pour chaque espèce absente d'un site, le nombre réel de co-occurrences avec celui attendu si sa distribution était aléatoire, c'est-à-dire en l'absence d'association entre espèces. Cette probabilité est calculée à partir de la fonction de masse de la distribution hypergéométrique, qui décrit la chance qu'une espèce absente co-occurre un certain nombre de fois avec les autres espèces observées dans la région (Carmona *et al.*, 2019). Comme pour l'indice de Beals, cette approche attribue à chaque espèce une probabilité d'appartenance à la diversité sombre et utilise un seuil de 0,80 à 0,95 pour déterminer son statut. Elle corrige les biais liés aux espèces très rares ou très fréquentes, prend en compte la structure régionale des co-occurrences et permet d'identifier les espèces ayant franchi les filtres abiotiques et biotiques, mais dont la présence locale est limitée par des contraintes stochastiques. Ainsi, elle offre un signal écologique plus complet et précis que l'observation seule.

Bien que complémentaires, ces deux approches ne fournissent pas la même information. Utiliser les indices écologiques pour définir l'amplitude environnementale d'une communauté, puis les mobiliser à nouveau comme métriques de bioindication, revient à fonder l'évaluation sur les mêmes paramètres qui ont servi à la construire, introduisant ainsi un risque de raisonnement circulaire. En revanche, le principe de co-occurrence présente un avantage majeur : indépendant des outils de bioindication, reposant uniquement sur des inventaires floristiques, il intègre à la fois les contraintes abiotiques et biotiques. L'approche hypergéométrique, en particulier, a démontré sa supériorité méthodologique dans l'estimation de la diversité sombre (Carmona *et al.*, 2019) et apparaît parfaitement adaptée à une application en bioindication, offrant un signal écologique potentiellement plus complet, fiable et interprétable.

4. Bioindication par la structure fonctionnelle des communautés

4.1. Au-delà de la composition spécifique : la nécessité des traits fonctionnels

La simple présence ou absence d'espèces offre une première lecture des conditions abiotiques et biotiques d'un site, mais cette approche demeure souvent insuffisante. Certaines plantes, dotées d'une large amplitude écologique, tolèrent des variations marquées de leur environnement ; ainsi, deux lieux soumis à des contraintes distinctes peuvent présenter une composition floristique étonnamment proche. Dans de tels cas, les indices classiques de bioindication, comme ceux proposés par Ellenberg (1992), risquent de suggérer à tort une similarité des conditions. Pourtant, derrière une apparente homogénéité floristique, se cachent parfois des adaptations très différentes aux contraintes locales, invisibles si l'on se limite à l'inventaire des espèces (**FIGURE 6**).

L'approche par les traits fonctionnels permet de dépasser cette limite. Elle éclaire à la fois la structuration des communautés et leur réponse aux filtres écologiques. Ces traits, définis comme des caractéristiques morphologiques, physiologiques, phénologiques ou comportementales mesurables au niveau individuel (Violle *et al.*, 2007), peuvent être caractérisés selon leur rôle principal. Certains traits traduisent la manière dont les organismes réagissent aux conditions du milieu (« traits de réponse »), tandis que d'autres influencent le fonctionnement des écosystèmes (« traits d'effet »), par exemple en conditionnant la productivité, la qualité de la biomasse ou les cycles biogéochimiques (Lavorel & Garnier, 2002 ; Cadotte *et al.*, 2015). Il convient toutefois de souligner que certains traits peuvent simultanément refléter la réponse aux conditions environnementales et affecter le fonctionnement de l'écosystème, selon le contexte et l'échelle d'observation.

Ces traits varient à la fois entre espèces (variabilité interspécifique) et au sein d'une même espèce (variabilité intraspécifique, **FIGURE 6**). Cette dernière, issue de la plasticité phénotypique, peut atteindre l'ampleur de la variabilité observée entre espèces (Fortunel *et al.*, 2009 ; Albert *et al.*, 2011 ; Kazakou *et al.*, 2013). L'action successive des filtres écologiques sélectionne, dans le pool régional d'espèces, les traits les mieux adaptés aux conditions locales (Lavorel & Garnier, 2002 ; **FIGURE 6**). Les contraintes abiotiques tendent à resserrer la gamme des valeurs de traits, favorisant convergence et homogénéité, tandis que les interactions biotiques encouragent au contraire une diversification et un élargissement de la distribution des traits (Bernard-Verdier *et al.*, 2012 ; Garnier & Navas, 2012).

Ainsi, là où la seule composition floristique peut donner l'illusion d'une équivalence écologique, l'analyse des traits fonctionnels peut mettre en lumière des différences. Elle fournit un indicateur potentiellement plus sensible de l'état écologique des milieux (**FIGURE 6**).

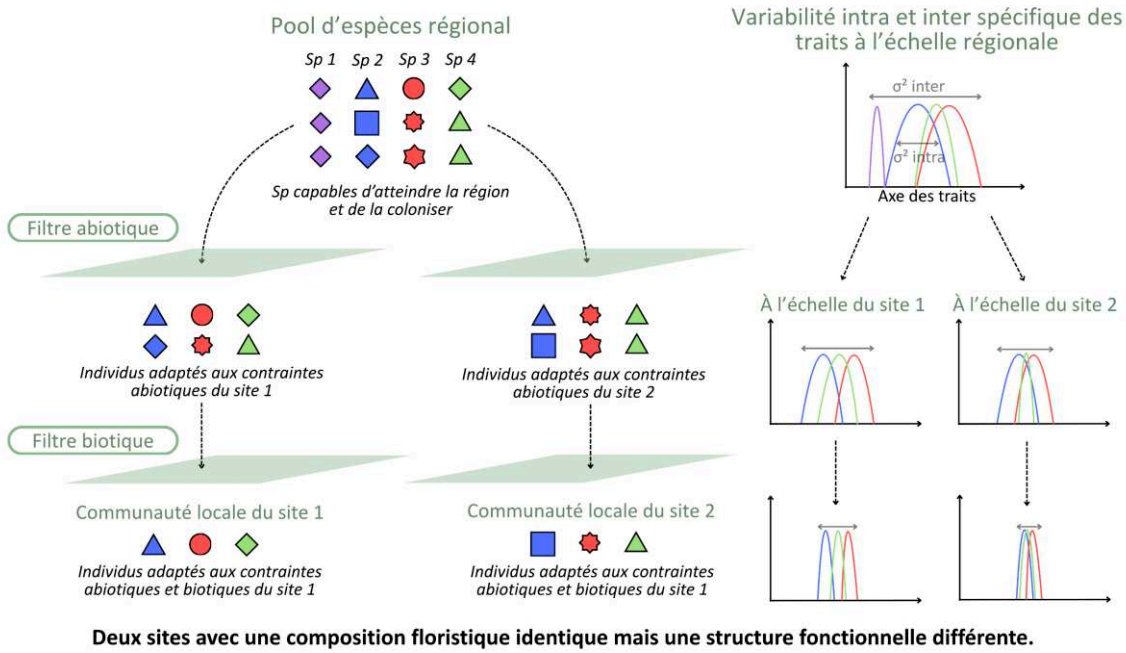


FIGURE 6 Lien entre théorie des filtres, variabilité des traits et bioindication à l'échelle des communautés.

Une couleur correspond à une espèce, tandis que les symboles renvoient à différentes valeurs de traits fonctionnels. Ce schéma propose une révision de la théorie des filtres d'assemblage des communautés en intégrant la variabilité intraspécifique dès le pool régional. Les espèces peuvent s'implanter dans une communauté locale si l'amplitude de leurs variations intraspécifiques couvre les conditions abiotiques et biotiques du site. Ainsi, selon l'ampleur de cette variabilité, une même espèce régionale peut coloniser plusieurs sites présentant des environnements distincts. Dans ce cas, la composition spécifique des communautés locales pourra être identique, mais les valeurs de traits exprimées par les espèces communes différeront, reflétant les contrastes des conditions écologiques entre sites.

D'après Violle et al., 2012.

4.2. Traits de réponse et stratégies fonctionnelles : de l'individu à la communauté

Les traits de réponse constituent un outil privilégié pour relier les espèces aux conditions environnementales locales (Lavorel & Garnier, 2002 ; Violle *et al.*, 2007). Ils apparaissent donc particulièrement pertinents dans une perspective de bioindication. L'analyse conjointe de plusieurs traits permet en effet de dégager une stratégie de vie, définie comme une combinaison cohérente de caractéristiques morphologiques, physiologiques et phénologiques. Cette stratégie traduit la capacité d'une plante à croître, se reproduire et exploiter les ressources dans un environnement donné. Elle reflète les arbitrages opérés entre croissance, reproduction, défense et longévité des organes, et illustre les multiples voies par lesquelles les espèces maximisent leur succès écologique face aux contraintes abiotiques et biotiques (Grime, 2001 ; Craine, 2009 ; **FIGURE 7**).

Un cadre conceptuel majeur illustre aujourd'hui ces stratégies : le *Plant Economic Spectrum* (PES, Weigelt *et al.* 2021). Celui-ci englobe non seulement le *Leaf Economic Spectrum* (LES) et le *Root Economic Spectrum* (RES), mais intègre également des axes additionnels liés à la taille végétative (**FIGURE 7**). Le PES décrit ainsi plusieurs gradients de stratégies.

Il permet notamment de caractériser la stratégie de gestion des ressources (eau, azote et carbone) à l'échelle d'un individu, ou parfois d'un organe, le long d'un continuum allant de la conservation à l'acquisition (Reich, 2014). Les organes conservateurs, souvent persistants d'une année sur l'autre, facilitent la réallocation de ressources vers les nouvelles feuilles ou autres organes, tandis que les organes orientés vers l'acquisition privilégient une production rapide de tissus et la croissance. Ce compromis, largement documenté à l'échelle mondiale, se manifeste aussi bien dans les traits foliaires que racinaires. (Westoby & Wright, 2006 ; Díaz *et al.*, 2016).

Un second axe, propre aux racines, correspond au gradient de collaboration. Il oppose un mode « faire soi-même », caractérisé par des racines fines et longues explorant activement le sol, à un mode d' «externalisation » fondé sur la collaboration avec les symbioses mycorhiziennes, et associé à des racines plus épaisses (Weigelt *et al.*, 2021). À ces gradients s'ajoutent des axes indépendants liés à la taille : la hauteur de la plante et la profondeur racinaire. Ces dimensions ne se superposent pas nécessairement au gradient de conservation et reflètent d'autres compromis fonctionnels, qu'il s'agisse du positionnement vertical des individus dans la canopée ou de l'accès aux ressources selon la profondeur du sol (Weigelt *et al.*, 2021). En intégrant ces différentes dimensions, le PES devient un espace fonctionnel à plusieurs axes. Il permet ainsi de mettre en évidence des nuances stratégiques souvent invisibles, en particulier celles liées à la collaboration racinaire et au compromis de taille.

La robustesse de ces cadres a été largement démontrée, en particulier pour le *Leaf Economic Spectrum* (LES), qui reste l'axe le mieux documenté car le plus accessible. Wright *et al.* (2004) ont montré qu'à l'échelle mondiale, les traits foliaires s'organisent selon un continuum acquisitif–conservatif cohérent, directement lié à la disponibilité en ressources et aux conditions de stress environnemental. Reich *et al.* (1997) ont souligné que la variation des traits foliaires au sein des communautés végétales est étroitement corrélée aux gradients de fertilité des sols et à la disponibilité en eau, confirmant ainsi leur pouvoir explicatif dans la compréhension des stratégies adaptatives. Enfin, l'agrégation de ces traits à l'échelle communautaire, pondérée par l'abondance des espèces, permet de révéler des réponses collectives aux contraintes locales, illustrant l'utilité du LES comme outil de bioindication (Bernard-Verdier, 2012 ; Verberk, 2013).

En pratique, cette agrégation consiste à calculer les valeurs moyennes des traits des espèces, pondérées par leur abondance dans la communauté (*Community-Weighted Means*, CWM). Ces indicateurs résument la structure fonctionnelle d'un assemblage végétal et permettent d'inférer les conditions environnementales ayant façonné cet assemblage (Díaz *et al.*, 2007 ; Ackerly & Cornwell, 2007). Cette approche s'appuie sur le postulat de Grime (1998), selon lequel les espèces dominantes reflètent fidèlement la valeur moyenne de la communauté. Elle comporte toutefois des limites : la pondération par l'abondance tend à survaloriser certaines espèces très recouvrantes, au risque de masquer la contribution fonctionnelle d'espèces plus discrètes mais écologiquement significatives (Bello *et al.*, 2008).

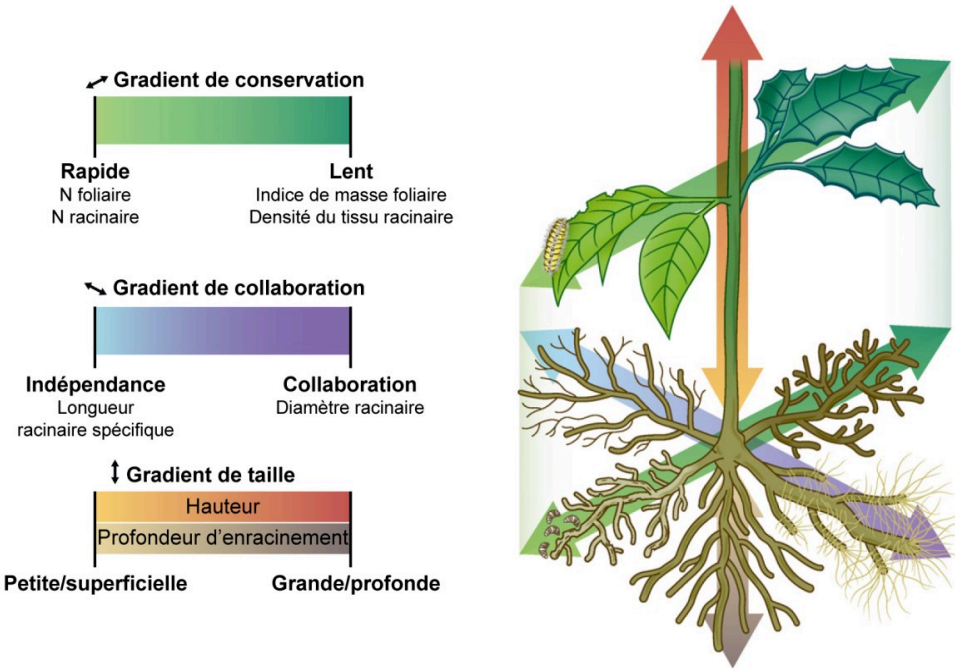


FIGURE 7 Le spectre économique des plantes, réunissant le spectre économique foliaire et le spectre économique racinaire.

Le spectre économique foliaire est particulièrement utile pour interpréter la stratégie de conservation des ressources d'une espèce végétale. Il traduit en effet un continuum entre des espèces à croissance rapide, qui investissent dans des feuilles fines et riches en azote mais à durée de vie courte, et des espèces à croissance plus lente, dotées de feuilles plus denses, pauvres en azote, mais durables, reflétant une stratégie de conservation à long terme.

D'après Weigelt et al., 2021.

L'analyse des traits de réponse, en particulier dans le cadre conceptuel du LES, offre ainsi un langage commun pour interpréter les stratégies fonctionnelles des plantes. Elle permet de relier directement la diversité fonctionnelle végétale aux gradients environnementaux et ouvre la voie à une bioindication plus fine.

Ainsi, trois approches complémentaires permettent de relier la composition végétale aux conditions environnementales. L'analyse de la flore exprimée d'abord, constitue un outil historique et éprouvé pour détecter les gradients écologiques. La diversité sombre i.e. l'analyse de la flore potentielle non exprimée ensuite, enrichit cette lecture en intégrant les espèces absentes mais potentiellement présentes. Enfin, l'étude des traits fonctionnels révèle les stratégies d'adaptation mises en œuvre par les communautés pour s'accommoder des conditions locales. Combinées, ces approches pourraient constituer un socle méthodologique prometteur pour une bioindication pertinente, fiable et sensible.

Dans un contexte de bouleversements globaux, il est indispensable d'affiner notre capacité à détecter et interpréter les signaux écologiques, en particulier au sein d'écosystèmes sensibles tels que les forêts tempérées. Celles-ci subissent de fortes pressions anthropiques qui les rendent particulièrement vulnérables aux changements environnementaux, notamment au réchauffement climatique, à la pollution atmosphérique, à l'eutrophisation et à la fragmentation des habitats (Gouvenain & Silander, 2016 ; De Vries *et al.*, 2014, 2019).

Contexte et Objectifs de la Thèse

Les forêts tempérées sont des écosystèmes dominés par les arbres, hébergant également des communautés végétales, animales et microbiennes étroitement dépendantes des conditions édaphiques et atmosphériques (Barthod, 1996). Elles couvrent près de 666 millions d'hectares, soit environ 16 % de la surface forestière mondiale, et assurent des services essentiels : support de la biodiversité, régulation climatique, protection des sols et fourniture de ressources culturelles et économiques (Gouvenain & Silander, 2016).

Dans les années 1980, les pluies acides et les dépôts atmosphériques de soufre et d'azote ont fortement affecté les forêts européennes, provoquant un affaiblissement des peuplements et une acidification des sols, notamment dans le « triangle noir » d'Europe de l'Est, région industrielle fortement polluée à la frontière de l'Allemagne de l'Est, de la Pologne et de la Tchéquie. (Ulrich *et al.*, 1980 ; Grennfelt *et al.*, 2020 ; **FIGURE 8**). Face à ces menaces, le *International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests* (ICP Forests) est créé en 1985, afin d'évaluer l'état de santé des forêts à diverses échelles spatiales et temporelles.



FIGURE 8 Effet des pluies acides sur les forêts tempérées d'Europe centrale.

Une forêt en République tchèque, décimée par les pluies acides.

Photographie de Vladimir Ivanovitch.

Le programme s'appuie sur deux réseaux complémentaires, chacun apportant un éclairage particulier sur le fonctionnement des écosystèmes forestiers. Le Niveau I, vaste réseau d'environ 6 000 placettes réparties à travers l'Europe, assure un suivi annuel de l'état des cimes et, tous les 10 à 15 ans, une évaluation du statut nutritionnel des arbres ainsi que des conditions édaphiques. Il offre une vision d'ensemble des tendances spatiales et temporelles à grande échelle (**FIGURE 9**). Le Niveau II, mis en place sur plus de 600 placettes, complète ce dispositif par un suivi approfondi incluant la qualité de l'air et les dommages visibles liés à l'ozone, les dépôts atmosphériques, la chimie des sols et de l'eau, les conditions météorologiques, la végétation du sous-bois, ainsi que la croissance, la phénologie, la litière et la chimie foliaire des arbres (**FIGURE 9**). Ces observations permettent de relier les pressions environnementales aux réponses écologiques, et d'analyser la manière dont les forêts réagissent aux changements environnementaux dans l'espace comme dans le temps (Talkner *et al.*, 2015 ; Krüger *et al.*, 2020).

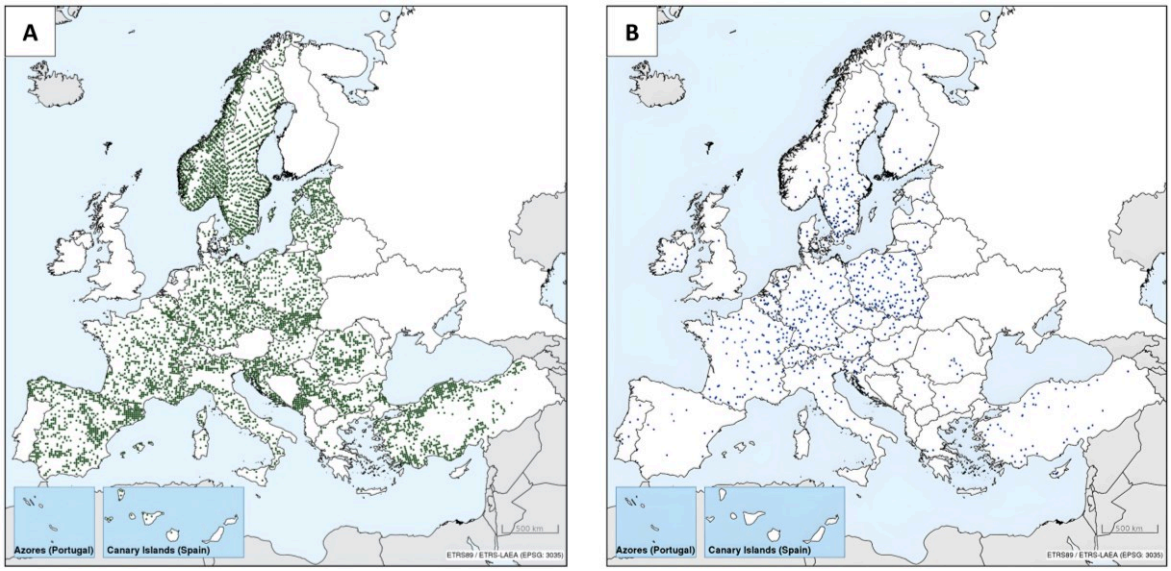


FIGURE 9 Répartition spatiale des placettes de Niveau I (A) et II (B) de l'ICP Forest.

Les données issues du suivi de Niveau II ont révélé une dégradation progressive du statut nutritionnel des arbres, avec une baisse notable des concentrations foliaires en phosphore (P), magnésium (Mg) et potassium (K), et, dans une moindre mesure, en azote (N). Cette évolution compromet non seulement la croissance des peuplements forestiers, mais également leur résilience face aux stress biotiques et abiotiques (Jonard *et al.*, 2015 ; Du *et al.*, 2021). Entre 1992 et 2009, certaines espèces comme *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* et *Pinus sylvestris* ont montré une détérioration marquée de leur nutrition en phosphore. La baisse des concentrations foliaires en P était particulièrement prononcée dans les placettes initialement pauvres en cet élément, suggérant qu'une carence latente pouvait évoluer vers une déficience manifeste entraînant la mortalité des arbres. Par ailleurs, plus de 70 % des placettes de *Picea abies* et environ 30 % de celles de *Pinus sylvestris* présentaient également une carence en azote (Jonard *et al.*, 2015 ; **FIGURE 10**), tendance qui s'est confirmée au cours des décennies suivantes (Du *et al.*, 2021).

En revanche, l'analyse des sols révèle des dynamiques parfois déconnectées de celles observées dans les tissus foliaires des essences forestières suivies (**FIGURE 11**). À l'échelle du réseau RENECOFOR, qui constitue la partie française du Niveau II de l'ICP Forests, la disponibilité en phosphore édaphique demeure globalement stable. En revanche, le stock et la concentration d'azote total augmentent dans les horizons superficiels (0–10 cm, horizon A) tout en diminuant dans les horizons plus profonds (10–20 cm et 20–40 cm). La tendance la plus marquée concerne l'augmentation généralisée du ratio C/N dans l'ensemble des horizons minéraux, reflétant principalement un accroissement du stockage de carbone dans les sols forestiers (Saenger *et al.*, 2024).

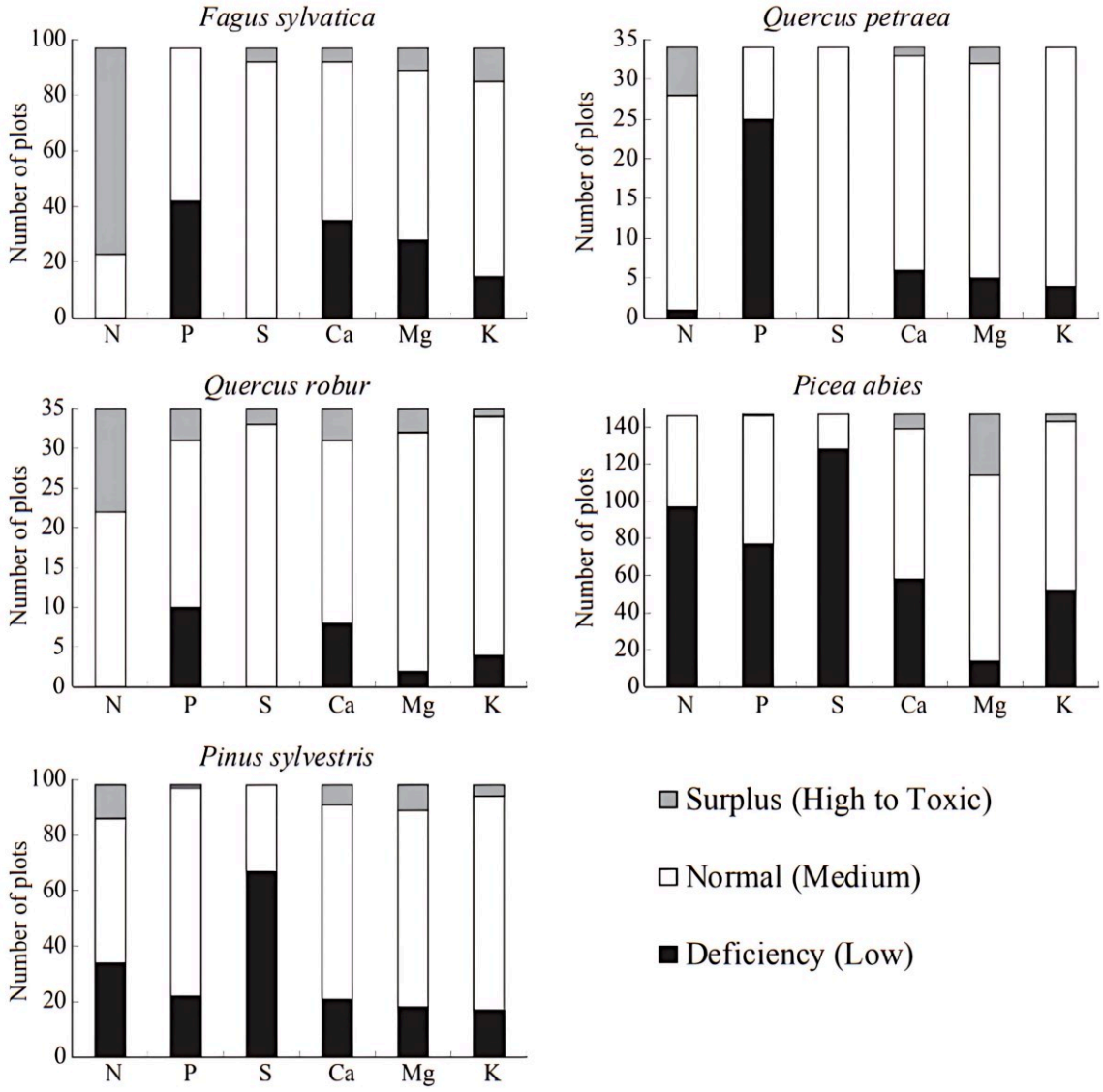


FIGURE 10 Nombre de placettes de niveau II de l'ICP Forest dans les trois classes de statut nutritionnel foliaire.

Chaque barre indique le nombre de placettes dans lesquelles la concentration foliaire moyenne des feuilles ou aiguilles de l'année en cours se situe dans les seuils définis par Mellert & Göttlein (2012) pour N, P, Ca, Mg et K, et par Stefan *et al.* (1997) pour S.

D'après Jonard et al., 2015.

Cette déconnexion apparente entre la dynamique temporelle du statut nutritionnel des arbres et celle des nutriments édaphiques soulève une question : si les arbres ne reflètent pas fidèlement les variations temporelles du sol, qu'en est-il des autres strates de la végétation forestière ? Cette interrogation concerne tout particulièrement le sous-bois, souvent mobilisé comme bioindicateur des conditions édaphiques (de Tillesse & Devillez, 1995 ; Diekmann, 2003 ; Coudun & Gégout, 2005 ; de Vries *et al.*, 2014, 2019 ; Wang *et al.*, 2022).

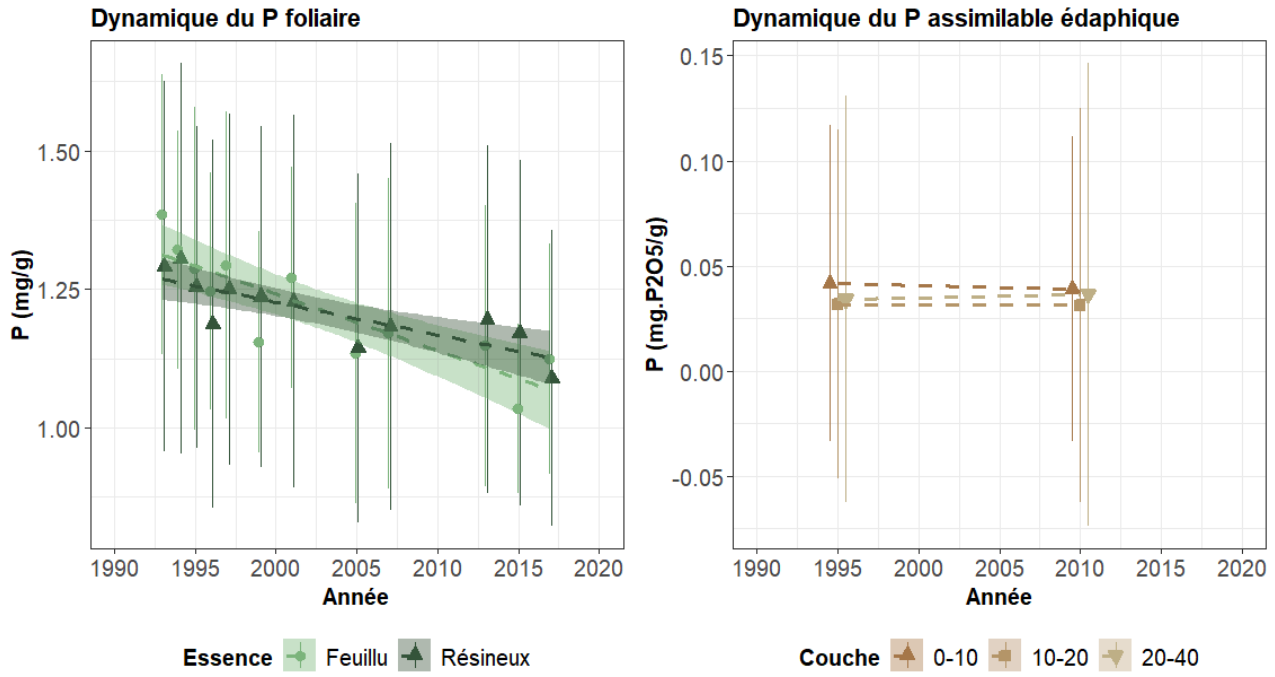


FIGURE 11 Dynamiques du phosphore foliaire et édaphique sur le RENECOFOR.

La diminution des concentrations foliaires en phosphore (P) est significative sur le réseau RENECOFOR, tant pour les résineux (représentés par des triangles vert foncé) que pour les feuillus (ronds vert clair). En revanche, les dynamiques du phosphore assimilable dans le sol restent stables à travers toutes les couches minérales : 0–10 cm (triangle vert en haut, marron foncé), 10–20 cm (carré marron) et 20–40 cm (triangle vert en bas, marron clair).

A l'instar des arbres, cette strate intermédiaire, composée d'espèces herbacées, de fougères, de mousses et de petits arbustes est particulièrement sensible aux gradients environnementaux locaux, intégrant contraintes édaphiques, lumineuses et hydriques ainsi que pressions anthropiques (Diekmann, 2003 ; Gilliam, 2007).

La fiabilité des indices de bioindication végétale le long de gradients spatiaux est bien établie : elle repose souvent sur des tests de corrélation mettant en évidence une relation positive entre la moyenne communautaire des indices (pondérée ou non par l'abondance des espèces) et les mesures de terrain, selon des gradients de conditions environnementales tels que le pH, la fertilité ou l'humidité du sol. Ces validations s'appuient sur des jeux de données étendus, allant des grandes échelles nationales, comme aux Pays-Bas (Wamelink, 2002) ou en France (Gégout *et al.*, 2003, 2008), à des échelles plus réduite, couvrant plusieurs dizaines de sites forestiers au Royaume-Uni (Carpenter & Goodenough, 2014).

La bioindication temporelle repose sur l'idée que la dynamique du sous-bois reflète les changements de l'état de santé des forêts (Wittig, 1992 ; Thimonier *et al.*, 1994 ; Gilliam, 2007 ; Boulanger *et al.*, 2015). Par exemple, Riofrio-Dillon *et al.* (2012) ont utilisé les valeurs indicatrices d'EcoPlant (Gégout *et al.*, 2005) pour reconstruire les changements à long terme de l'acidité des sols dans les forêts françaises basé sur des relevés floristiques anciens. Sur la même base, Sebasta *et al.* (2011) ont utilisés les indices d'Ellenberg pour suivre l'acidification des sols en Ukraine sur six décennies. Bien que le sous-bois soit régulièrement utilisé comme proxy des changements édaphiques (Keith *et al.*, 2009 ; Riofrio-Dillon, 2012, 2013), la relation entre le sol et sa végétation n'a jamais été examinée à partir de suivis standardisés à long terme. Autrement dit, les dynamiques des conditions mesurées dans le sol et celles bioindiquées par la flore n'ont jamais été comparées à partir de mesures édaphiques et d'inventaires floristiques réalisés sur des sites suivis de manière harmonisée, régulière et permanente.

Ainsi, si une décorrélation est observée entre les statuts nutritionnels des arbres et la fertilité des sols, il est légitime de se demander si la dynamique du sous-bois n'est pas elle aussi partiellement découplée des dynamiques édaphiques, remettant en question sa capacité à indiquer fidèlement les changements temporels.

Dans ce contexte, cette thèse vise à évaluer la cohérence entre les dynamiques édaphiques observées et celles bioindiquées par la végétation du sous-bois des forêts tempérées françaises, en s'appuyant sur les données floristiques et édaphiques du réseau RENECOFOR, la partie française du Niveau II de l'ICP Forests. Trois approches complémentaires seront mobilisées pour tester la sensibilité écologique du sous-bois :

- **Composition floristique observée** : reflète directement les filtres écologiques locaux.
- **Diversité sombre** : prend en compte les espèces absentes mais écologiquement compatibles.
- **Traits fonctionnels** : révèlent les stratégies de réponse face à des modifications des contraintes abiotiques et biotiques.

Hypothèses de travail

La question centrale de cette thèse peut être formulée comme suit : **la dynamique du sous-bois reflète-t-elle fidèlement les variations temporelles des conditions édaphiques ?** Pour y répondre, nous avons défini trois objectifs intégrés :

(i) Évaluer dans quelle mesure la flore du sous-bois reflète les dynamiques des conditions édaphiques à travers la composition floristique des assemblages d'espèces exprimées.

> **Hypothèse 1 (H1) :** conformément à l'hypothèse admise dans la littérature, la composition floristique du sous-bois constitue un indicateur fiable des conditions édaphiques, traduisant à la fois leur distribution spatiale et leurs dynamiques temporelles à l'échelle des forêts françaises.

(ii) Tester l'apport de la diversité sombre pour compléter et affiner la bioindication temporelle.

> **Hypothèse 2 (H2) :** la prise en compte de la diversité sombre, c'est-à-dire des espèces absentes mais qui devraient être présentes, permet de compléter et d'améliorer la bioindication temporelle des conditions édaphiques.

(iii) Examiner la variabilité inter- et intraspécifique des traits fonctionnels relevant du *Leaf Economics Spectrum* des espèces du sous-bois le long d'un gradient de nutriments du sol**,** afin d'évaluer dans quelle mesure ces traits influencent la capacité du sous-bois à refléter les dynamiques édaphiques**.**

> **Hypothèse 3 (H3)** : la variabilité inter- et intraspécifique des traits fonctionnels foliaires des espèces du sous-bois, reflétant le Leaf Economics Spectrum, illustre les changements de stratégies acquisition–conservation le long des gradients édaphiques de disponibilité en nutriments et constitue un indicateur précis et sensible de la fertilité du sol.

Matériel et méthode général

1. Le REseau National de suivi à long terme des ECOsystèmes FORestiers (RENECOFOR)

1.1. Principe du RENECOFOR

Le réseau RENECOFOR (REseau National de suivi à long terme des ECOsystèmes FORestiers) a été créé en 1992 par l'Office National des Forêts (ONF) dans le cadre des engagements de la France au sein du programme européen ICP Forests. Il constitue le dispositif national de placettes permanentes de niveau II de ce programme. Le réseau comprend 102 sites répartis sur l'ensemble du territoire métropolitain, installés dans des peuplements forestiers matures, c'est-à-dire ayant atteint leur âge ou diamètre d'exploitabilité, et relativement homogènes. Ces placettes couvrent une grande diversité de contextes pédoclimatiques et d'essences dominantes, telles que *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea*, *Quercus robur*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra var. corsicana*, *Pinus pinaster*, *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decid*ua, *Picea abies* ou *Abies alba* (**FIGURE 12**).

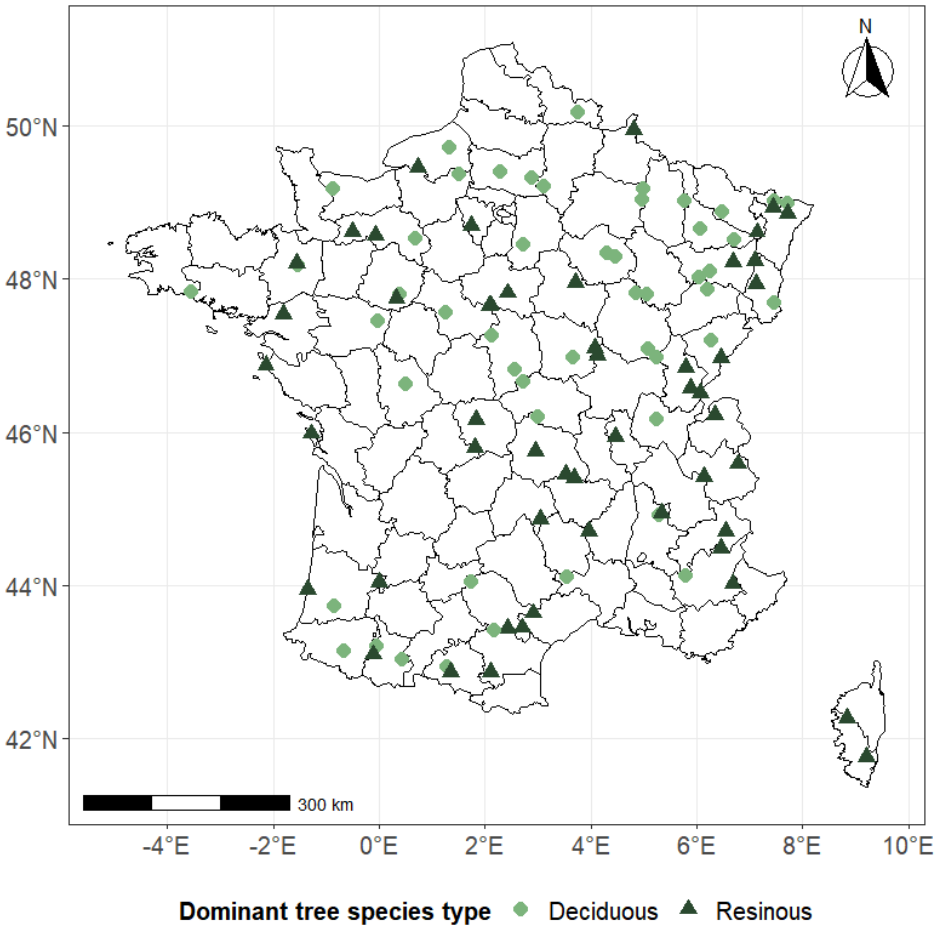


FIGURE 12 Répartition spatiale des placettes du RENECOFOR.

Les placettes de résineux sont représentées par des triangles vert foncé, tandis que les placettes de feuillus sont représentées par des cercles vert clair.

Chaque placette couvre deux hectares, dont une zone centrale de 0,5 hectare clôturée pour exclure les grands herbivores (**FIGURE 13**). Conçu comme un dispositif d'observation intégrée, le réseau RENECOFOR assure un suivi à long terme de multiples composantes des forêts : croissance et état sanitaire des arbres, chimie foliaire, conditions édaphiques, composition floristique du sous-bois et dépôts atmosphériques. L'objectif est de détecter et de comprendre les changements affectant le fonctionnement des écosystèmes forestiers sous l'effet des pressions environnementales globales, telles que la pollution atmosphérique, le changement climatique, les dépôts azotés ou la fragmentation des habitats. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons plus particulièrement sur les inventaires floristiques du sous-bois et les échantillonnages édaphiques, afin d'évaluer dans quelle mesure la variabilité spatiale et la dynamique temporelle de la végétation du sous-bois, à l'échelle nationale, reflètent celle des conditions édaphiques.

1.2. Relevés floristiques

Le suivi de la végétation au sein du réseau RENECOFOR repose sur un protocole standardisé mis en place en 1995 sur les 102 placettes permanentes. Les relevés floristiques sont effectués tous les cinq ans, avec deux passages annuels (printemps et été) afin de détecter la majorité des espèces présentes, d'estimer le recouvrement maximal de chaque espèce et de chaque strate, et ainsi d'optimiser la précision des inventaires (Dupouey *et al.*, 1999).

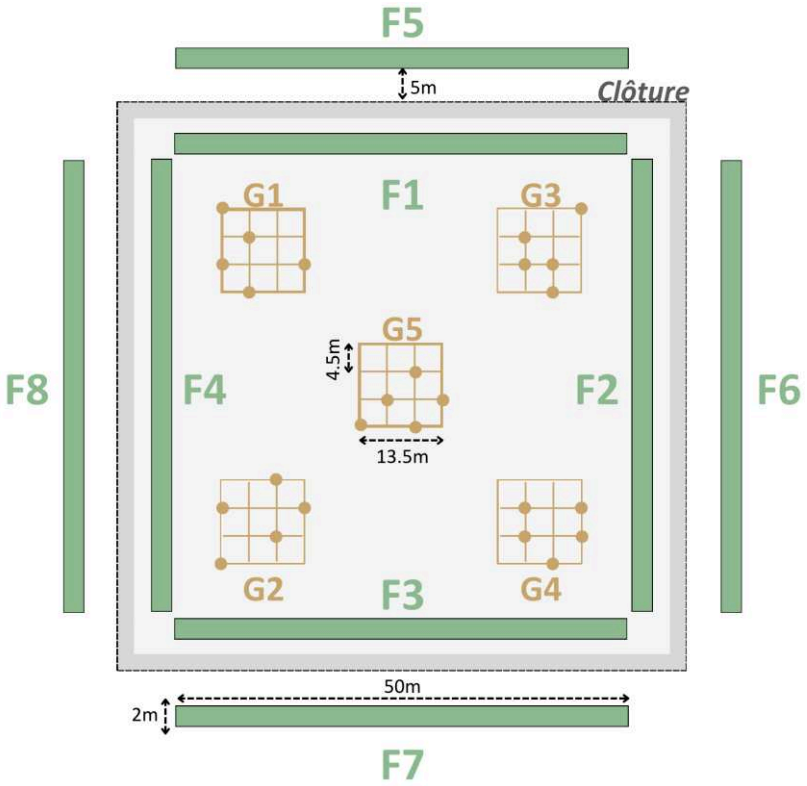


FIGURE 13 Organisation des placettes du RENECOFOR.

Les bandes vertes (2 × 50 m) représentent les zones d'inventaire floristique. Celles-ci sont séparées : de F1 à F4 pour les bandes situées à l'intérieur de la clôture, et de F5 à F8 pour celles à l'extérieur. Les grappes marron (13,5 × 13,5 m) correspondent aux zones d'échantillonnage du sol, les points indiquant les intersections où les prélèvements édaphiques ont été effectués.

Pour chaque placette, huit sous-placettes de 100 m² (bandes de 50 × 2 m) sont matérialisées, quatre à l'intérieur et quatre à l'extérieur de la clôture en respectant une distance minimale de deux mètres par rapport à la clôture. Les sous-placettes sont repérées avec des piquets et cartographiées, et leur numérotation (F1 à F4 à l'intérieur, F5 à F8 à l'extérieur) suit une orientation selon le Nord et un sens horaire. Les sous-placettes ne sont quasiment jamais situées dans l'espace réservé à la circulation (environ 5 m entre la limite de la placette centrale et la clôture) (**FIGURE 13)**.

Les observations floristiques sont réalisées par un ou deux experts, dont au moins un connaît parfaitement la flore locale. Une corde de référence est tendue sur la longueur de la sous-placette pour définir une ligne droite, facilitant la mesure du recouvrement. La présence de perturbations majeures telles que chablis, trouées ou tas de bois est systématiquement notée à l'aide d'un plan schématique sur la fiche de terrain. Chaque individu est identifié au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce et répertoriée selon *Flora Europaea* (Tutin *et al.*, 1968–1993). Des qualificatifs sont ajoutés pour contextualiser les observations *e.g.* abrouti, frotté, dépression humide, fossé, pierre, chablis, limite de sous-placette.

Le relevé distingue cinq strates végétales :

- Strate muscinale : Bryophytes humicoles ;
- Strate semis : plants de l'année des espèces ligneuses ;
- Strate herbacée : ligneuses de moins de 30 cm + les espèces herbacées ;
- Strate arbustive basse (ligneux de 0,3–2 m) ;
- Strate arbustive haute (ligneux de 2–7 m) ;
- Strate arborée (ligneux >7 m).

Pour chaque espèce et strate, le coefficient d'abondance-dominance de Braun-Blanquet (1932) est estimé visuellement, en tenant compte à la fois de la fréquence et du recouvrement, selon une échelle semi-quantitative allant de r à 5 : r (espèce très rare, généralement représentée par un seul individu), + (moins de dix individus, recouvrement inférieur à 5 %), 1 (plus de 10 individus, recouvrement inférieur à 5 %), 2 (5 à 25 %), 3 (25 à 50 %), 4 (50 à 75 %) et 5 (plus de 75 %). La proportion de sol non couvert par la végétation muscinale et herbacée est également notée. Les lianes ligneuses sont relevées dans chaque strate où elles apparaissent.

Dans cette thèse, nous nous concentrons exclusivement sur la végétation du sous-bois, que nous définissons comme l'ensemble de la strate herbacée et de la strate arbustive basse. Les mousses ont été exclues, leurs valeurs indicatrices n'étant que partiellement renseignées dans les référentiels français, contrairement aux strates herbacée et arbustive. Lorsque plusieurs relevés annuels étaient disponibles (printemps et été), nous avons retenu celui où l'espèce présentait la plus grande abondance-dominance. Enfin, si une espèce apparaissait à la fois dans la strate herbacée et dans la strate arbustive basse, elle n'a été comptabilisée qu'une seule fois, en prenant le recouvrement maximal observé.

1.3. Caractéristiques édaphiques

L'échantillonnage des sols a été réalisé dans les 102 placettes forestières permanentes du réseau RENECOFOR. Les prélèvements ont été effectués lors de deux campagnes principales : 1993–1997 et 2007–2012, avec un intervalle moyen d'environ 15 ans par placette. Pour chaque placette, les campagnes ont été conduites durant la même saison afin de limiter la variabilité saisonnière des paramètres édaphiques.

Dans la zone centrale clôturée de 0,5 hectare, trois couches minérales et organo-minérales de sol ont été échantillonnées : 0–10 cm, 10–20 cm et 20–40 cm. Les prélèvements ont été réalisés sur cinq sous-placettes de 13,5 m × 13,5 m, situées au centre et aux quatre coins de la placette. Pour chaque sous-placette, un échantillon composite par couche a été constitué à partir de cinq points de prélèvement répartis selon une grille systématique (4,5 × 4,5 m), afin de tenir compte de la variabilité locale tout en évitant les zones perturbées (résidus de coupe, traces de débardage) et la proximité des arbres vivants (**FIGURE 13**).

Pour chaque couche, un échantillon non perturbé a été prélevé à l'aide d'un cylindre de Kopecky (250 cm^3) afin de mesurer la densité apparente du sol. Cette donnée est essentielle pour estimer les stocks de carbone et d'azote, en permettant de convertir les concentrations de ces éléments en valeurs volumétriques. Le reste du sol a ensuite été collecté pour les analyses chimiques. Les mêmes protocoles ont été appliqués pour les deux campagnes, à l'exception d'un déplacement de 1,5 m des sous-placettes lors de la deuxième campagne pour éviter toute perturbation des prélèvements antérieurs. Les analyses chimiques ont été réalisées par le Laboratoire d'Analyses des Sols (INRAe, Arras, France), selon des protocoles identiques pour les deux campagnes.

La déconnexion observée entre les dynamiques foliaires en P et N et celles du sol (Jonard *et al.*, 2014), l'augmentation marquée du ratio C/N dans les horizons minéraux (Saenger *et al.*, 2024), ainsi que l'utilisation régulière de la végétation du sous-bois comme indicateur des processus d'eutrophisation et d'acidification (Keith *et al.*, 2009 ; Riofrio-Dillon, 2012, 2013) justifient de porter l'attention sur les paramètres édaphiques suivants :

- pH H_2O : mesure de l'acidité active du sol dans une suspension sol/eau (1:5 V/V), reflétant directement la concentration en ions H^+ disponibles pour les processus biologiques.
- pH $CaCl_2$: mesure de l'acidité échangeable du sol dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 $mol \cdot L^{-1}$ (NF ISO 10390), moins influencée par la teneur en sels solubles et offrant une meilleure comparabilité entre sols de texture ou de matière organique différentes.
- Carbone organique (C) et azote total (N) : déterminés par combustion sèche après décarbonatation pour la couche superficielle (0-10cm). Pour les couches plus profondes (10–20 cm et 20–40 cm), le C a été quantifié par oxydation sulfochromique à 30 °C après décarbonatation (méthode d'Anne), tandis que le N a été mesuré selon la méthode de Kjeldahl. Les valeurs obtenues, combinées à la densité apparente, ont ensuite servi à calculer les stocks

de C et N par unité de surface. Le rapport C/N, indicateur clé de la qualité de la matière organique et de l'état de minéralisation du sol, a également été calculé.

- Phosphore assimilable (P) : fraction du phosphore disponible pour les plantes, extraite selon la méthode adaptée au pH du sol (Dyer pour pH $CaCl_2$ < 6,5 ; Joret-Hébert pour pH $CaCl_2$ > 6,5) et mesurée par colorimétrie.

Les analyses ont été réalisées conformément aux normes françaises et internationales, avec des contrôles réguliers pour garantir la comparabilité entre les deux campagnes.

2. Valeurs Indicatrices des conditions édaphiques

Pour estimer les caractéristiques nutritionnelles (fertilité chimique) des sols forestiers à partir de la composition floristique, nous avons calculé des indices communautaires des conditions du sol (ICS) à partir de valeurs indicatrices (VI) spécifiques pour le pH H_2O, le rapport C/N et le phosphore assimilable du sol. Les VI ont été extraites de deux bases principales : BaseFlore du programme CATMINAT (Julve, 1998) et EcoPlant (Gégout *et al.*, 2005).

2.1. La base de données CATMINAT

CATMINAT fournit des VI ordinales pour les conditions nutritionnelles et d'acidité du sol. Pour la nutrition, l'indice N représente la disponibilité en nutriments, et pour l'acidité, l'indice R reflète l'acidité du sol. Ces VI sont comprises sur une échelle de 1 à 9, où 1 correspond à des conditions extrêmes (nutriments très pauvres ou sols très acides) et 9 à des conditions opposées (sols riches ou très basiques). Ces valeurs ordinales permettent de classer les espèces selon leurs préférences écologiques, sans indiquer une valeur quantitative précise des conditions édaphiques (Julve, 1998).

Les VI du programme CATMINAT ont été attribuées par synthèse bibliographique et observations phytosociologiques réalisées sur l'ensemble du territoire français métropolitain. L'optimum écologique de chaque espèce pour une variable du sol a été estimé en fonction de sa fréquence et de sa répartition le long des gradients pédologiques observés dans les relevés, suivant la logique des indices d'Ellenberg : l'espèce est considérée comme indicative des conditions de sol correspondant à la valeur pour laquelle elle est le plus fréquemment rencontrée (Julve, 1998).

2.2. La base de données EcoPlant

La base EcoPlant est une base nationale regroupant des données phytoécologiques géoréférencées, incluant à la fois des informations floristiques et pédologiques sur l'ensemble du territoire français. Les observations sont réalisées sur des unités spatiales standardisées, généralement de 400 m^2, et renseignent la présence ainsi que l'abondance ou la dominance des espèces selon la méthode de

Braun-Blanquet (1932). Pour 2 000 à 5 600 sites, des mesures de pH H_2O, du ratio C/N et du phosphore assimilable du sol sont également disponibles. Ces informations permettent d'établir avec précision les liens entre la composition floristique et les conditions pédologiques locales (Gégout *et al.*, 2005).

L'optimum écologique de chaque espèce pour le pH, le C/N et le phosphore a été déterminé en construisant des courbes de probabilité de présence le long des gradients pédologiques, selon la méthodologie proposée par Ter Braak et Looman (1986). Pour chaque facteur du sol, la probabilité de présence de l'espèce a été modélisée, à partir de l'ensemble des relevés où l'espèce est présente. L'optimum écologique correspond au maximum de cette courbe de réponse, c'est-à-dire la valeur du facteur du sol pour laquelle la probabilité de présence de l'espèce est maximale (**FIGURE 14**). Cette approche permet d'obtenir des VI quantitatives et continues, directement comparables aux mesures de terrain (Gégout *et al.*, 2006).

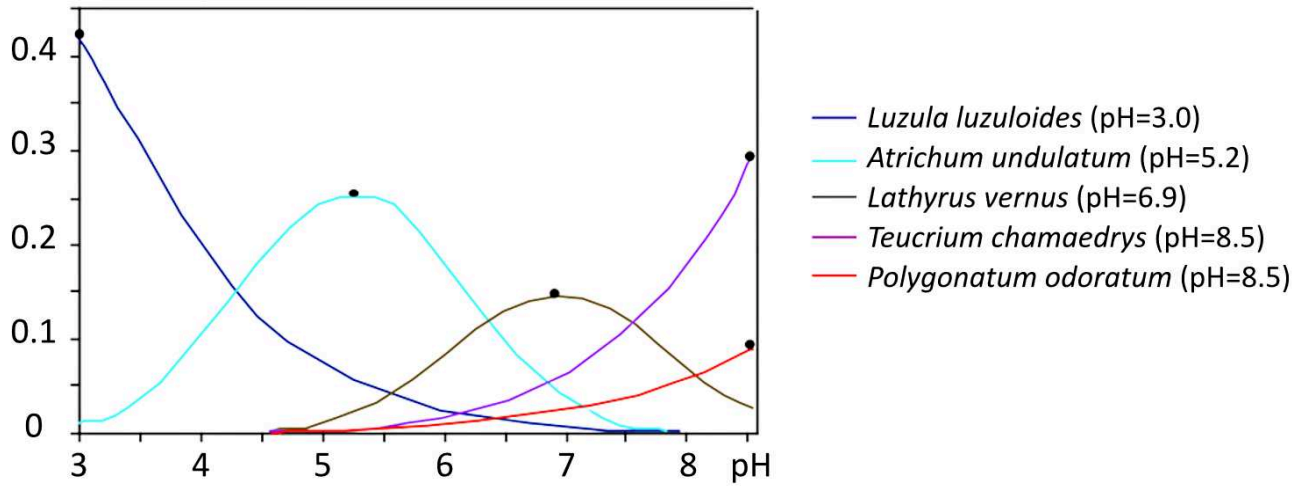


FIGURE 14 Courbes de réponse et valeurs indicatrices de 5 espèces végétales vis-à-vis du pH dans les forêts françaises.

D'après Gégout et al., 2006.

2.3. Calcul des indices communautaire de conditions du sol et fonctions de transfert

Les valeurs indicatrices (VI) des espèces du sous-bois pour les paramètres chimiques du sol ont été extraites des bases CATMINAT (Julve, 1998) et EcoPlant (Gégout *et al.*, 2005) afin de tirer parti de leurs atouts respectifs. CATMINAT couvre la majorité des espèces, mais ses indices qualitatifs unitaires ne sont pas directement comparables aux mesures de sol. EcoPlant, en revanche, fournit des VI quantitatives continus directement comparables aux analyses pédologiques, mais couvre moins d'espèces.

Pour bénéficier à la fois de la couverture taxonomique étendue de CATMINAT et de la comparabilité quantitative d'EcoPlant (**FIGURE 15**), nous avons appliqué la méthodologie de Richard *et al.* (2021). Des fonctions de transfert ont été développées, via des modèles additifs généralisés (GAM) afin de convertir les indices communautaires de conditions du sol (ICS) calculés à partir de CATMINAT en équivalents EcoPlant pour le pH H_2O, le ratio C/N et le phosphore assimilable. La calibration de ces fonctions s'est appuyée sur un ensemble de 45 379 relevés floristiques issus de l'Inventaire Forestier National (2005–2016) (**FIGURE 16**).

La nomenclature taxonomique a été harmonisée entre les relevés et les deux bases VI pour assurer la cohérence des données. Pour chaque relevé, les ICS ont été calculés à partir des VI de CATMINAT et d'EcoPlant, en faisant la moyenne des valeurs des espèces présentes, pondérant de manière équitable les espèces rares et communes. Cette approche représente l'optimum écologique moyen de la communauté le long de chaque gradient pédologique, en intégrant la contribution de toutes les espèces observées.

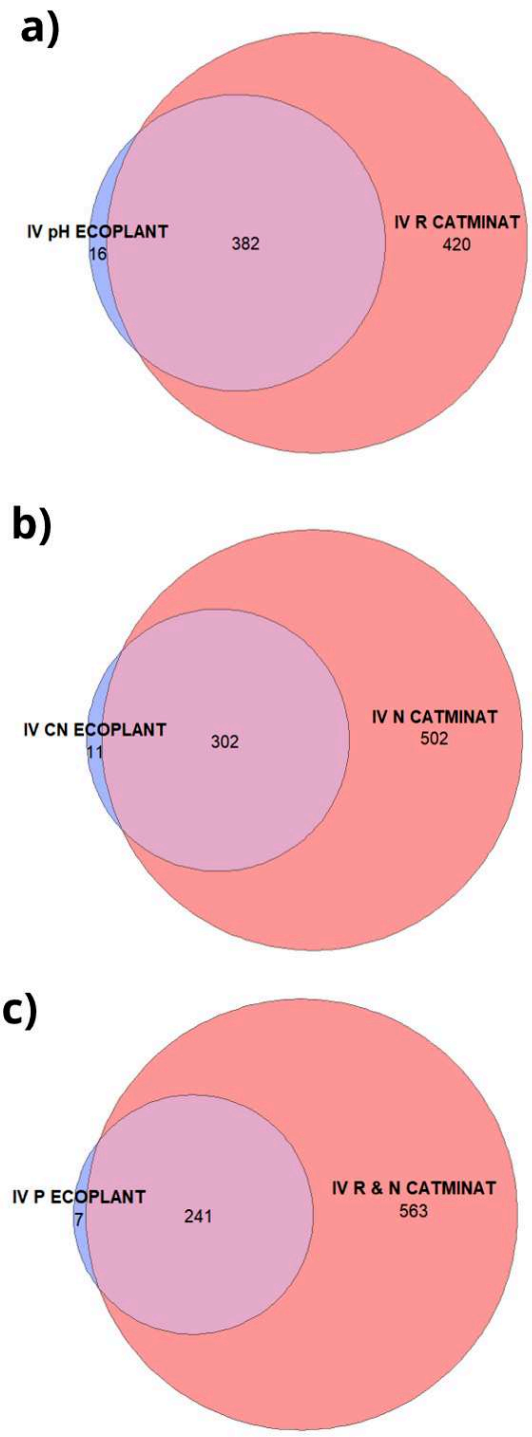


FIGURE 15 Diagrammes de Venn représentant le recoupement des taxons présents dans les bases CATMINAT et EcoPlant pour les valeurs indicatrices.

Ces diagrammes illustrent le nombre de taxons communs entre les bases CATMINAT et EcoPlant pour les valeurs indicatrices des espèces du sous-bois (acidité (a), disponibilité en nutriments, C/N (b) et phosphore assimilable (d)), incluant 811 à 815 taxons recensés dans les strates herbacée et arbustive basse combinées.

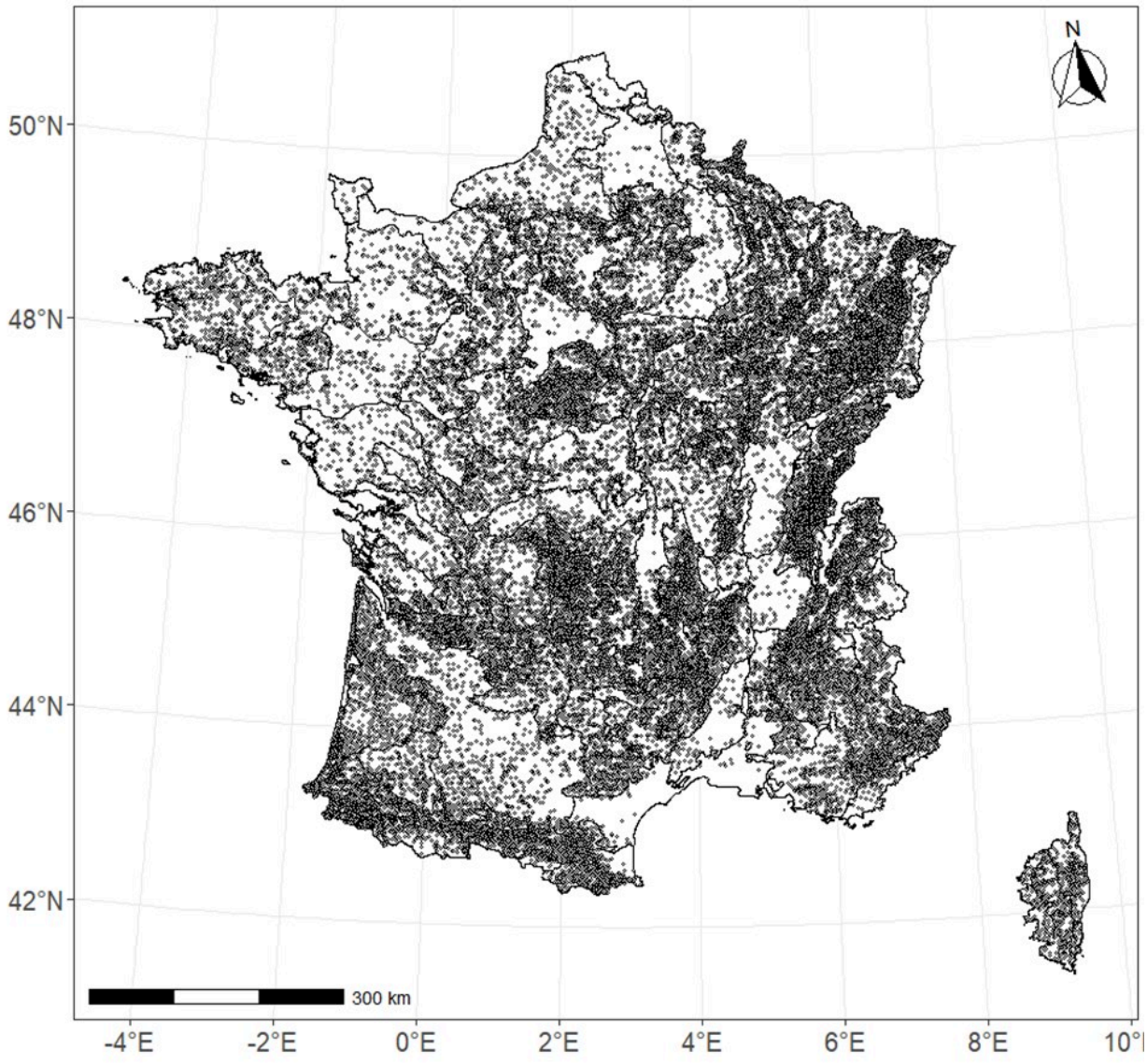


FIGURE 16 Distribution spatiale des placettes de suivi de l'Inventaire Forestier National.

Chaque point représente l'un des 45 379 relevés réalisés entre 2005 et 2016. Seuls les relevés effectués pendant la période de végétation et comprenant au moins deux espèces ont été conservés.

Les relations entre les ICS de CATMINAT et d'EcoPlant ont été modélisées à l'aide de GAM, capables de capturer les relations potentiellement non linéaires entre indices. Les données ont été réparties en un ensemble d'entraînement (70 %) des données et un ensemble de test (30 %) afin d'optimiser le paramètre de lissage et d'évaluer la capacité de généralisation du modèle.

Chaque variable nutritionnelle a été modélisée spécifiquement. Pour le pH H_2O, le CSI CATMINAT de réactivité du sol (R) a été mis en relation avec l'ICS EcoPlant du pH, traduisant les indices ordinaux en valeurs continues comparables aux mesures de terrain. Pour le ratio C/N, le ICS CATMINAT pour la disponibilité en nutriments (N) a été relié à l'ICS EcoPlant correspondant, capturant la non-linéarité entre nutrition floristique et mesures chimiques du sol. Enfin, pour le phosphore assimilable, le l'ICS EcoPlant a été modélisé en interaction avec les ICS CATMINAT N et

R, reflétant l'interdépendance entre disponibilité en nutriments, acidité et phosphore dans les sols forestiers (**FIGURE 17** ; voir également Lenoir *et al.*, 2013 ; Richard *et al.*, 2021)

La performance des fonctions de transfert a été évaluée sur l'ensemble de test et exprimée en termes de déviance expliquée, avec 81,7 % pour le pH H2O, 74,8 % pour le rapport C/N et 53,4 % pour le phosphore assimilable. Ces résultats montrent que les fonctions de transfert reproduisent de manière fiable les indices quantitatifs d'EcoPlant à partir des ICS CATMINAT, tout en conservant une couverture maximale des espèces.

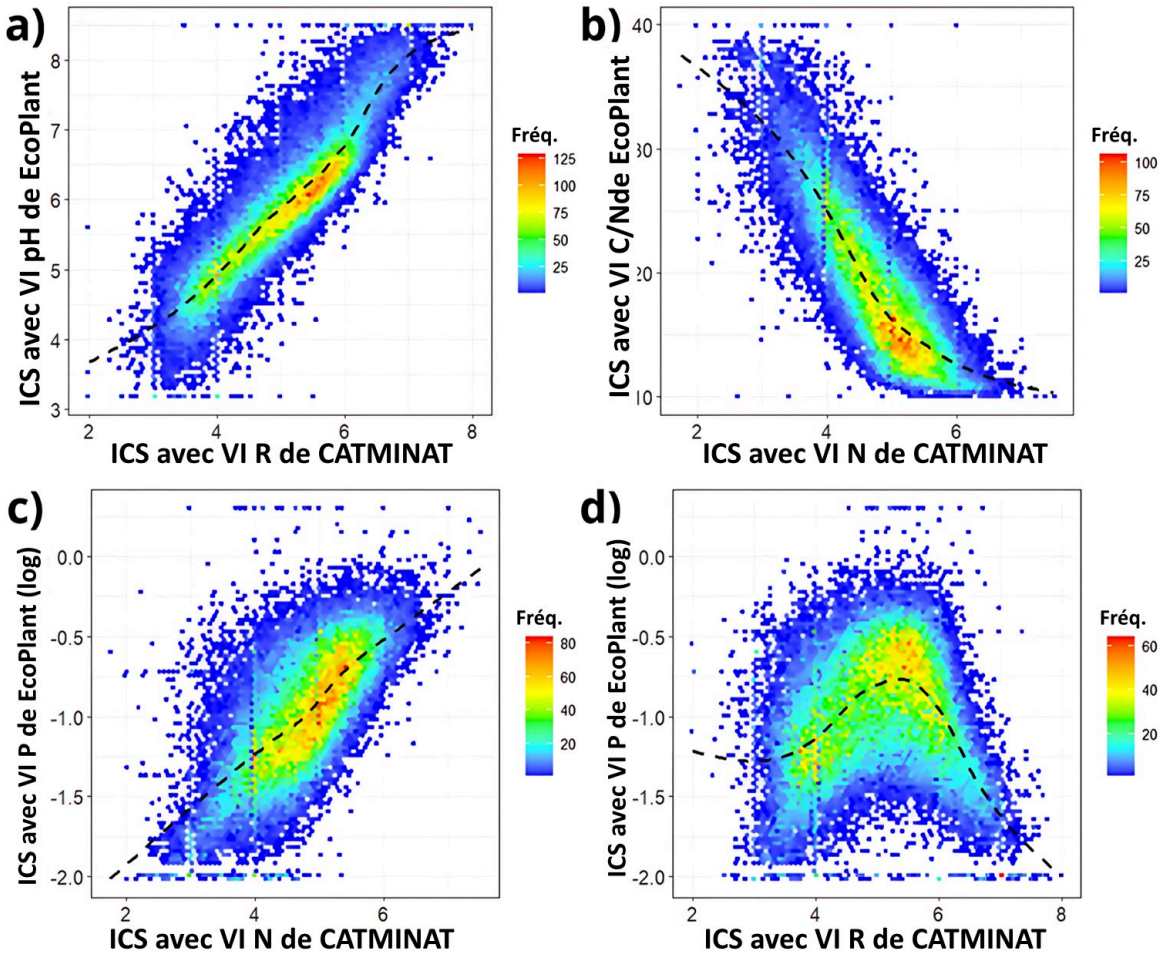


FIGURE 17 Graphique hexagonal des ICS : comparaison de CATMINAT et EcoPlant avec ajustement des fonctions de transfert.

Graphiques en hexagones comparant les ICS calculés à partir des bases CATMINAT et EcoPlant pour l'acidité du sol (a), la disponibilité en nutriments (b), le rapport C/N et le phosphore assimilable (c & d), avec les fonctions de transfert ajustées permettant de rendre les ICS CATMINAT comparables aux valeurs empiriques mesurées dans le sol.

Avant d'analyser et comparer les dynamiques floristiques et édaphiques à long terme, il est indispensable de s'assurer de la fiabilité des données de suivi. Les relevés floristiques, en particulier, peuvent être influencés par la subjectivité des observateurs, qu'il s'agisse de l'identification des espèces, de l'estimation du recouvrement ou de l'attribution aux différentes strates de végétation. Un contrôle rigoureux de la qualité des données est donc une étape préalable essentielle pour garantir la robustesse des analyses ultérieures

3. Effet opérateur sur les relevés floristiques du RENECOFOR

3.1. Contrôle qualité du RENECOFOR

La qualité des relevés floristiques du réseau RENECOFOR est en partie assurée par un protocole reposant sur des exercices d'intercalibration et des visites de contrôle. Tous les cinq ans, en amont des campagnes floristiques, les exercices d'intercalibration réunissent l'ensemble des équipes sur des sous-placettes communes. Celles-ci sont d'abord échantillonnées de manière indépendante par chaque équipe, puis, dans un second temps, conjointement par l'ensemble des participants. Cette démarche permet d'établir un relevé consensuel, d'analyser les divergences entre observateurs et de s'accorder sur les éléments effectivement présents. Elle permet ainsi de quantifier les espèces non détectées, les erreurs d'identification et les divergences dans l'attribution aux différentes strates verticales. (**FIGURE 18**). Ces exercices calibrent les équipes sur les mesures subjectives, comme le recouvrement des espèces et l'attribution aux strates, et favorisent l'harmonisation des pratiques entre équipes. Ils sont, dès lors, un outil essentiel pour limiter l'effet opérateur.



FIGURE 18 Botanistes du RENECOFOR lors du relevé consensuel de la campagne d'intercalibration de 2024.

Patrick Behr

Un second dispositif garantissant la qualité du réseau repose sur les visites de contrôle, qui offrent une évaluation directe de la qualité des relevés dans leurs conditions de terrain réelles. Dans les dix jours suivant les inventaires floristiques réalisés sur une placette RENECOFOR par l'équipe de référence (dont les données sont conservées pour le suivi), une équipe de contrôle effectue un relevé indépendant, en appliquant rigoureusement la même méthodologie sur la même placette. La comparaison des deux relevés permet de quantifier un « effet observateur », c'est-à-dire d'éventuelles divergences dans la détection des espèces ou dans l'estimation de leur abondance, et d'évaluer ainsi la reproductibilité des observations. La comparaison des listes floristiques met en évidence les différences d'observation taxonomique, tandis que l'analyse des coefficients d'abondance-dominance informe sur la cohérence des mesures quantitatives.

3.2. Quantification de l'effet observateur

3.2.1 Méthode

Pour évaluer l'« effet observateur » sur les relevés RENECOFOR, les données de visite de contrôle couvrant les six campagnes floristiques réalisées entre 1995 et 2021 ont été exploitées. La méthodologie proposée par Camaret (2006) et Archaux (2009) a été adaptée afin de déterminer si le turn-over des botanistes a pu introduire un biais temporel à l'échelle nationale.

L'analyse a débuté par la comparaison de l'exhaustivité des relevés, définie selon Archaux (2009) comme le rapport entre la richesse observée et la richesse réelle corrigée. Les indices de similarité classiques (Jaccard ou Sørensen) ne permettant pas d'estimer de manière fiable l'exhaustivité (certaines espèces pouvant être manquées simultanément par les deux équipes) un estimateur Jackknife de premier ordre a été utilisé pour corriger ce biais. Cet estimateur repose sur le principe que la fréquence des espèces rares, notamment celles observées une seule fois (singletons), renseigne sur la probabilité qu'une partie de la richesse réelle n'ait pas été détectée. Concrètement, il estime le nombre d'espèces manquantes à partir de la relation :

$$S_{Jack1} = S_{obs} + \frac{n-1}{n} \times Q_1$$

Où S_{obs} est la richesse observée, n le nombre relevés, de Q_1 le nombre d'espèces présentes dans un seul relevé. La richesse corrigée correspond alors à S_{Jack1} et le niveau d'exhaustivité de chaque relevé est calculé comme le rapport S_{obs}/ S_{Jack1}. Cette approche fournit une estimation robuste de la performance de détection des équipes, en tenant compte des espèces potentiellement manquées (Burnham & Overton, 1979).

Les différences d'abondance par espèce ont ensuite été examinées. Les coefficients Braun-Blanquet (r, +, 1, 2, 3, 4, 5) ont été recodés sur une échelle numérique uniforme de 1 à 7. Pour chaque espèce, la différence entre le coefficient de l'équipe de contrôle et celui de l'équipe de référence (C-R) a été calculée, et la moyenne de ces différences a été testée par un test t pour vérifier si elle diffère significativement de zéro.

Enfin, l'effet des observateurs sur la bioindication a été évalué à travers le calcul des indices communautaires des conditions du sol (ICS), à partir des valeurs indicatrices transférées de CATMINAT vers EcoPlant, en versions non pondérée et pondérée par l'abondance-dominance. Les ICS issus des relevés de contrôle et de référence ont été comparés par régression linéaire : une forte corrélation, une pente proche de 1 et un intercept proche de 0 indiquent que, malgré les différences d'observateurs, les relevés fournissent des indications cohérentes sur les propriétés édaphiques.

Cette approche intégrée permet ainsi de quantifier rigoureusement l'impact des observateurs sur la qualité des relevés et sur les analyses écologiques basées sur la composition floristique, tout en tenant compte des variations dans le temps et entre équipes, et de valider leur utilisation pour la suite de cette thèse.

3.2.2 Résultats

L'exhaustivité des relevés varie d'une campagne à l'autre, mais elle reste globalement comprise entre 60 et 80 % pour les groupes de référence comme pour les groupes de contrôle. Les écarts d'exhaustivité entre ces groupes sont également variables, atteignant leur maximum lors de la campagne floristique de 1995. Toutefois, les tests t n'ont mis en évidence aucune différence significative, indiquant que, malgré de légers écarts, les deux groupes détectent et omettent un nombre comparable d'espèces (**FIGURE 19**).

Pour ce qui est des différences moyennes de coefficients d'abondance-dominance, elles ne dépassent pas 0,20, soit un cinquième d'une classe, et les tests t ($\mu = 0$) n'ont révélé aucun écart significatif. Les groupes apparaissent donc globalement concordants dans l'estimation de l'abondance relative des espèces. La variabilité était toutefois plus marquée en 1995 et 2000, correspondant aux premières années du réseau RENECOFOR, période nécessitant un calibrage des équipes et un ajustement du protocole, justifiant les exercices d'intercalibration. En 2010, les écarts sont moins importants, bien que les contrôleurs aient tendance à attribuer des abondances légèrement supérieures, à la limite de la significativité ($p = 0{,}126$) (**FIGURE 20**).

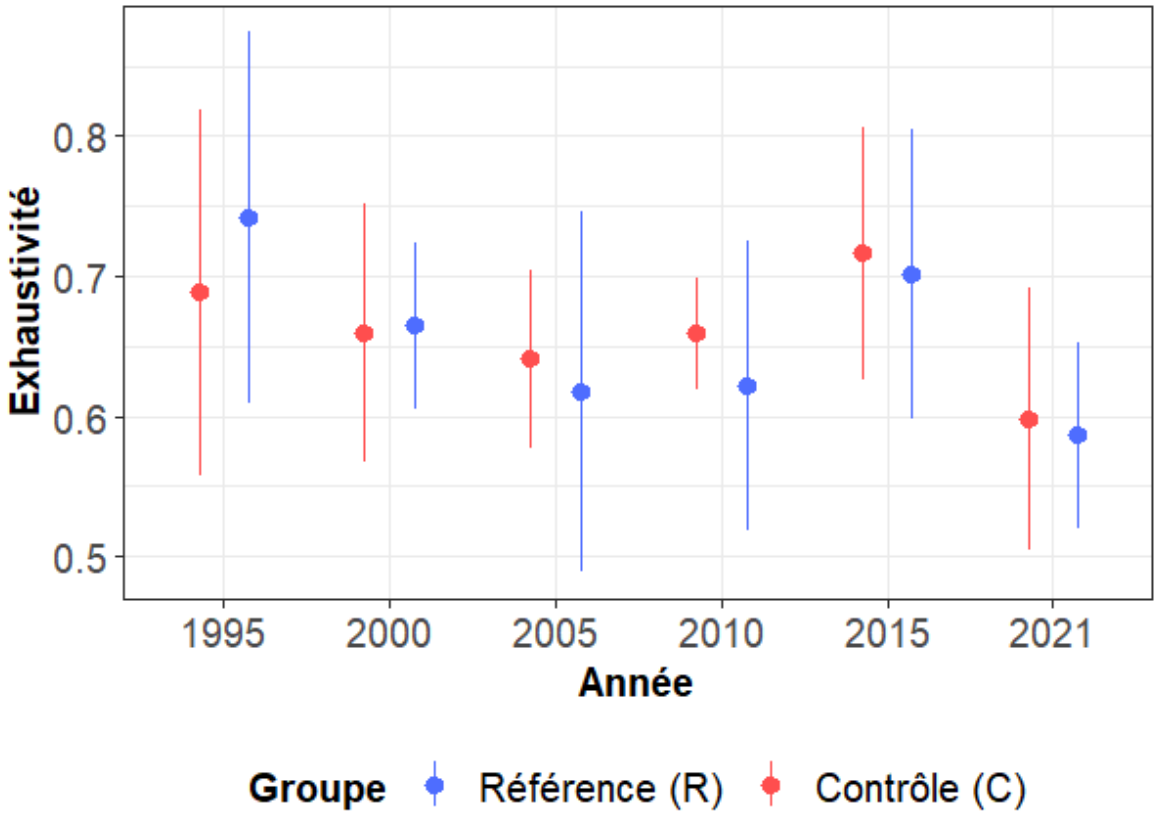


FIGURE 19 Comparaison de l'exhaustivité lors de l'inventaire floristique entre les groupes de référence et les groupes de contrôle.

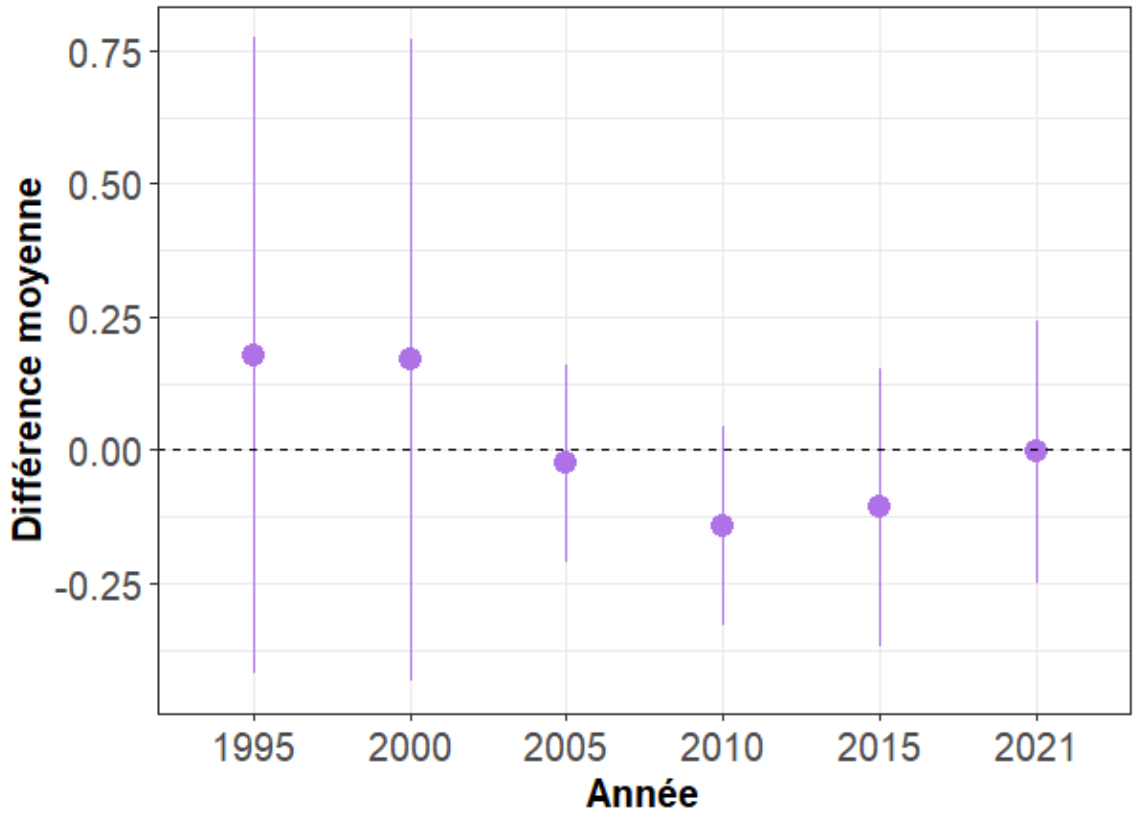


FIGURE 20 Différence moyenne entre les classes d'abondance attribuées par l'équipe de contrôle et l'équipe de référence.

Pour les indices communautaires des conditions du sol, qu'ils soient calculés à partir de la présence/absence des espèces ou pondérés par leur abondance-dominance, les valeurs obtenues par les deux équipes sont fortement corrélées, avec des coefficients de détermination (R^2) toujours supérieurs à 0,84. Les corrélations les plus faibles concernent le phosphore assimilable (R^2 = 0,84–0,88). Les pentes proches de 1 et les intercepts proches de 0 indiquent que l'information portée par les indices communautaires de sol (CSI) est très cohérente entre les observateurs, quel que soit le mode de calcul. (**FIGURE 21**)

En conclusion, ces résultats indiquent qu'aucun effet observateur majeur n'est détectable : malgré les différences entre botanistes, les relevés floristiques, la classification des abondances et les indices communautaires restent globalement comparables. Néanmoins, certaines campagnes, notamment celles de 1995 et 2000, présentent une différence moyenne entre les classes d'abondance plus élevée, illustrant que le démarrage du suivi n'était pas totalement exempt de variabilité. Ces observations soulignent l'importance cruciale des exercices d'intercalibration réguliers, qui permettent d'harmoniser la méthodologie et de réduire les divergences entre équipes, garantissant ainsi la fiabilité du suivi à long terme.

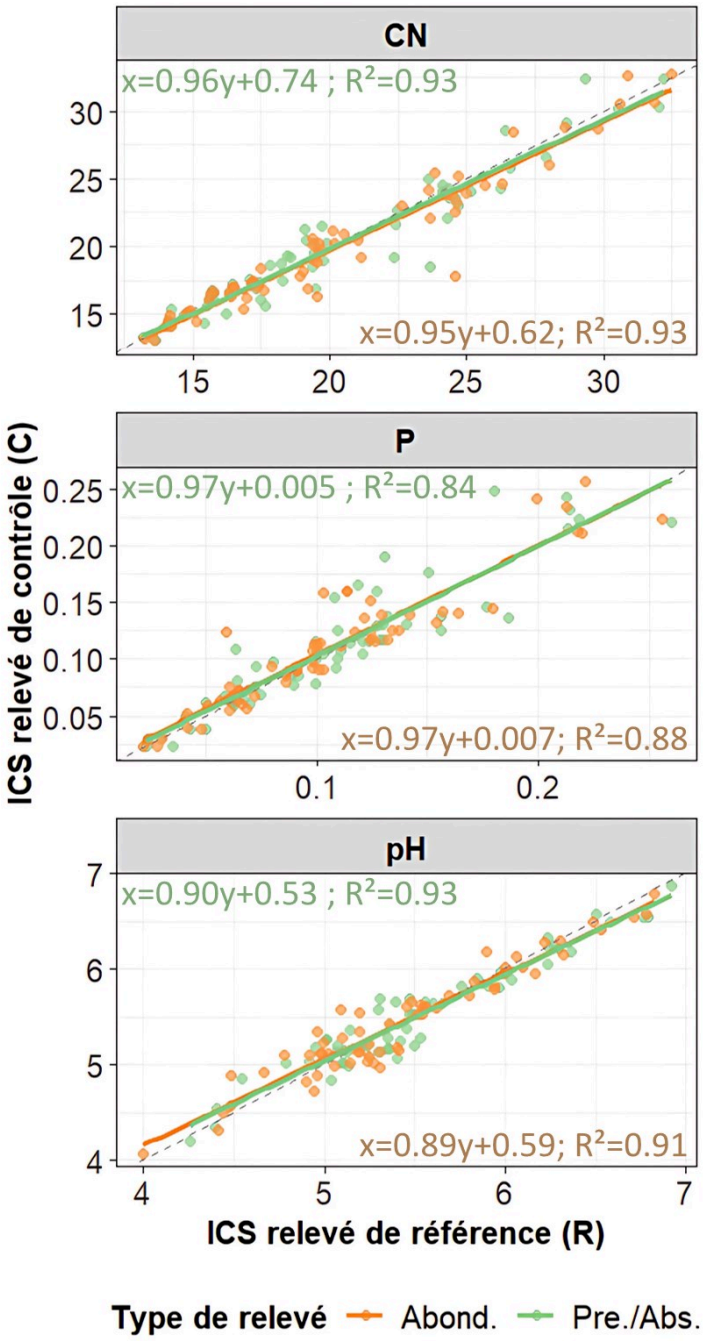


FIGURE 21 Comparaison des ICS calculés avec les inventaires des groupes de référence et ceux calculés avec les groupes de contrôle.

Deux méthodes de calcul des indices communautaires de conditions de sol (ICS) ont été utilisées : en orange, les ICS pondérés par l'abondance des espèces ; en vert, les ICS calculés sans pondération.

Ces résultats confirment la fiabilité et la cohérence des relevés floristiques du réseau RENECOFOR. Les données peuvent donc être mobilisées en toute confiance pour répondre aux objectifs de la thèse, à commencer par le premier : **évaluer dans quelle mesure le sous-bois reflète les dynamiques des conditions édaphiques à travers la composition floristique des assemblages d'espèces exprimées.**

Chapter I

Understory plant indicator values poorly perform at monitoring changes in french forest soil chemical properties

---

Accepted with minor revisions in Ecological Indicators

Authors

Robinson Ribémont[1*], Jean Luc Dupouey[2], Benoît Richard[3], Jonathan Lenoir[4], Iris Le Roncé[5], Vincent Boulanger[6], Didier Alard[7], Thérèse Beaufils[8], Carole Begeot[8], Sylvaine Camaret[9], Déborah Closset-Kopp[4], Emmanuel Corcket[10], Guillaume Decocq[4], Richard Eynard Machet[11], François Gillet[8], Arnaud Mouly[8], Pascale Ruffaldi[8], Fabien Spicher[4], Erwin Ulrich[12], Manuel Nicolas[6], Estelle Langlois[1] & Michaël Aubert[1]

Authors' affiliations

[1]ECODIV USC INRAE 1499, Université de Rouen Normandie, France

[2]INRAE-UMR Silva, Champenoux, France

[3]Office Français de la Biodiversité, Picardie, France

[4]UMR CNRS 7058 « Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés » (EDYSAN), Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

[5]Office National des Forêts, Unité territoriale, Grenoble, France

[6]Office National des Forêts, Département RDI, Fontainebleau, France

[7]Université de Bordeaux, INRAE, BIOGECO, Pessac, France

[8]UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

[9]UFR LLSH, Université Savoie Mont Blanc, Domaine Universitaire de Jacob-Bellecombette, Chambéry, France

[10]IMBE – UMR CNRS 7263, Aix Marseille Université, France

[11]e-Sciences, Cognin, France

[12]Office National des Forêts, Direction Forêt et Adaptation aux Changements Climatiques, Maisons Alfort, France

Abstract

Understory plant communities are widely used to infer soil conditions through species indicator values (IVs), scores reflecting species' ecological preferences for factors such as soil acidity, moisture, or nutrient levels. While their reliability to describe soil conditions along spatial gradients is well established, their ability to capture temporal changes in soil chemistry remains largely untested at both temporal and geographical scales. We combined 26 years of vegetation monitoring with two French national soil surveys (1993–1997; 2007–2012) across 102 permanent forest plots to assess the reliability of community soil indices (CSIs) as bioindicators of soil pH, carbon-to-nitrogen ratio (C/N), and extractable phosphorus. CSIs were computed by averaging species IVs for each plot and survey. Temporal dynamics of measured soil properties and CSIs were analysed using mixed-effects models at the national scale, while local trends were estimated separately for each plot to directly compare measured and vegetation-inferred changes. CSIs showed strong spatial correlations with measured pH and C/N, but weaker relationships for phosphorus. In contrast, no significant coupling was found between temporal changes in CSIs and measured soil parameters, with frequent mismatches in both direction and magnitude at the plot level. Measured soil dynamics were mainly driven by initial edaphic conditions and stand age, whereas CSIs dynamics responded primarily to canopy openness and anthropogenic disturbances such as thinning or tree harvesting. These findings confirm the value of IVs for spatial bioindication but highlight their limited sensitivity for detecting long-term soil changes, especially where soil changes remain modest.

Keywords

Biodiversity, bioindication, long-term monitoring, plant community, edaphic condition.

I. INTRODUCTION

In forest ecosystems, understory vegetation, primarily herbaceous species and sometimes low shrubs (Gilliam & Roberts, 2003), serves as a key indicator of environmental conditions (Diekmann & Dupré, 1997; Gilliam, 2007; Verstraeten *et al.*, 2013). Because plant occurrences and local abundances are closely tied to environmental conditions through niche theory (Hutchinson, 1957), the species composition of plant communities is widely used to infer local environmental conditions. This approach offers a reliable and cost-effective alternative to direct measurements (Diekmann & Dupré, 1997; Diekmann, 2003). In his seminal work, Ellenberg (1973) introduced the concept of plant species "Indicator Values" (IVs), which assign an ordinal score, based on expert knowledge from field observations and experimental measurements, to each species according to its ecological preferences for factors such as soil acidity, moisture, or nutrient levels. Initially developed from vegetation surveys in Western Europe, these IVs were later refined through niche modelling, such as the IVs from Dengler *et al.* (2023), and regionally calibrated to better fit other contexts across Europe, leading to databases such as CATMINAT (Julve, 1998) or the EcoPlant IVs (Gégout, 2005), which are specifically adapted for vegetation in metropolitan France. Available for many plant species, IVs allow for the indirect estimation of local environmental conditions by averaging species IVs co-occurring within the same plant community (Diekmann, 2003).

For instance, the IVs of forest understory plant species have been used to model trophic status and map soil pH across French forests (de Tillesse & Devillez, 1995; Coudun & Gégout, 2005), as well as to assess light availability and soil conditions in Carpathian woodlands (Dzwonko, 2001). Understory vegetation was also widely used to monitor soil acidification and nutrient imbalances, especially nitrogen (N) and sulfur (S) depositions which have both significantly influenced temperate forest dynamics since the late 1980s (de Vries *et al.*, 2014, 2019; Wang *et al.*, 2022). As bioindicators of temporal environmental change, understory dynamics are assumed to reflect shifts in forest ecosystem health (Wittig, 1992; Thimonier *et al.*, 1994; Gilliam, 2007; Boulanger *et al.*, 2015). For example, Riofrio-Dillon *et al.* (2012) used EcoPlant IVs to reconstruct long-term changes in soil acidity across French forests, while Sebasta *et al.* (2011) applied Ellenberg's IVs to track soil acidification in Ukrainian forests over six decades.

While the reliability of plant IVs as bioindicators along spatial gradients is well established through correlative-based models relating community weighted means of plant IVs to actual field measurements (Wamelink, 2002; Gégout *et al.*, 2003, 2006, 2008; Carpenter & Goodenough, 2014), their reliability over time remains largely untested. Few studies have compared temporal changes in environmental variables obtained from field measurements with those inferred by vegetation resurveys relying on plant IVs, particularly in forest ecosystems. When such comparisons have been made, they focused on overall trends, testing whether there was a good match in the direction of change (a decrease vs. an increase), rather than assessing whether the magnitude of change estimated from bioindication was coupled with that estimated from empirical field measurements. Some studies

have shown a consistent decrease in soil acidity or increase in nutrient availability, as bioindicated by vegetation trends, such as in the Meerdaal Forest in Belgium (Baeten *et al.*, 2009), or across British grasslands (McGovern *et al.*, 2011). However, others reported a complete disconnect between measured temporal changes in soil parameters and trends obtained through bioindication, as observed for soil acidity in the Tournibus Forest in Belgium (Van Calster *et al.*, 2007), or across German deciduous forests (Dölle & Schmidt, 2009). Moreover, these studies often have limited scope, focusing on small areas or semi-permanent plots with large temporal gaps between sampling dates: for example, Van Calster *et al.* (2007) only compared data from 1967 and 2005, while Dölle and Schmidt (2009) worked on 10 plots within the Göttingen Experimental Garden. They also tended to overlook potential confounding factors, beyond soil conditions, that might influence understory composition, such as stand characteristics, management practices, and disruptive natural events (e.g., storms, fires) (Bricca *et al.*, 2023). Canopy disturbances induced by such events may alter light availability and soil moisture in the forest understory (Gálhidy *et al.*, 2006), potentially favouring early successional and light demanding species (Ares *et al.*, 2009), thereby affecting the coupling between measured changes in soil characteristics and changes inferred from community-mean IVs.

To our knowledge, only Richard *et al.* (2021) conducted a pioneering large-scale (Metropolitan France), long-term (1995–2017) comparison between changes in measured annual mean temperature and thermophilization rates inferred from multiple resurveys (i.e., more than three resurveys) of understory plant species composition. Their study revealed a lag between the temporal dynamics of measured temperature and those inferred from bioindication, with the rate of change in community-inferred temperature being three times slower than that estimated from weather stations — a lag partly influenced by stand characteristics and anthropogenic disturbances. However, a similar assessment is still lacking for soil conditions: to date, no study has explicitly tested whether temporal changes in soil properties inferred from changes in plant community composition lag behind those observed through direct field measurements. This gap is even more critical as recent results by Saenger *et al.* (2024) have shown a significant increase in the C/N ratio in the soils of French forests. Given the slow and complex dynamics of temperate forest ecosystems (Gilliam, 2007) and the large-scale nature of environmental changes (Lindenmayer *et al.*, 2022), standardized, large-scale, and long-term monitoring of both vegetation and soil is therefore crucial to evaluate the degree of coupling between observed environmental changes and those inferred from plant community shifts (Bakker *et al.*, 1996).

In this context, the present study, backed by 26 years monitoring of both edaphic characterisation and vegetation inventories on permanent forest plots, aims to: (i) evaluate the capacity of forest understory plant species to infer variation in soil chemistry across the broad spatial extent of metropolitan France; (ii) assess the reliability of permanent vegetation plots to monitor changes in soil chemistry over a 26-years period; and (iii) identify the determinants influencing the degree of coupling between observed (i.e., from field measurements) and inferred (i.e., from community-mean IVs) changes in soil chemistry. We hypothesize that community-inferred soil

chemistry provides a reliable proxy for both the spatial pattern and temporal dynamics of measured soil conditions across France, with the strength of coupling varying by soil parameters and sampling depth. As Indicator Values (IVs) for soil pH and soil C/N ratio exhibit strong spatial concordance with these soil parameters (Riofrio-Dillon *et al.*, 2013), we expect the understory vegetation to track long-term changes in soil C/N, a major trend recently documented in French forests (Saenger *et al.*, 2024). Because plant-available phosphorus is difficult to quantify and showed little variation across the network, a decoupling between soil phosphorus availability and plant indicator values is hypothesized. We anticipate that these spatial and temporal couplings will be stronger in topsoil layers, where vegetation-based indicators are commonly calibrated. Finally, we hypothesize that temporal coupling may further depend on stand characteristics, disturbance regimes, and canopy openness.

To address these objectives, we used floristic inventories and soil data collected between 1993 and 2021 on permanent forest plots from the RENECOFOR monitoring program, the French component of the European International Co-operative Programme on the Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests (ICP Forests). Established in 1985, ICP Forests monitors key indicators of forest ecosystem health (including soil chemistry, understory plant species composition, meteorological conditions, stand structure, and disturbance history) through standardized protocols applied at varying intervals, from continuous to decadal monitoring. This long-term and multi-scalar dataset provides a robust basis for assessing the correspondence between trends in community-mean IVs and directly measured environmental changes.

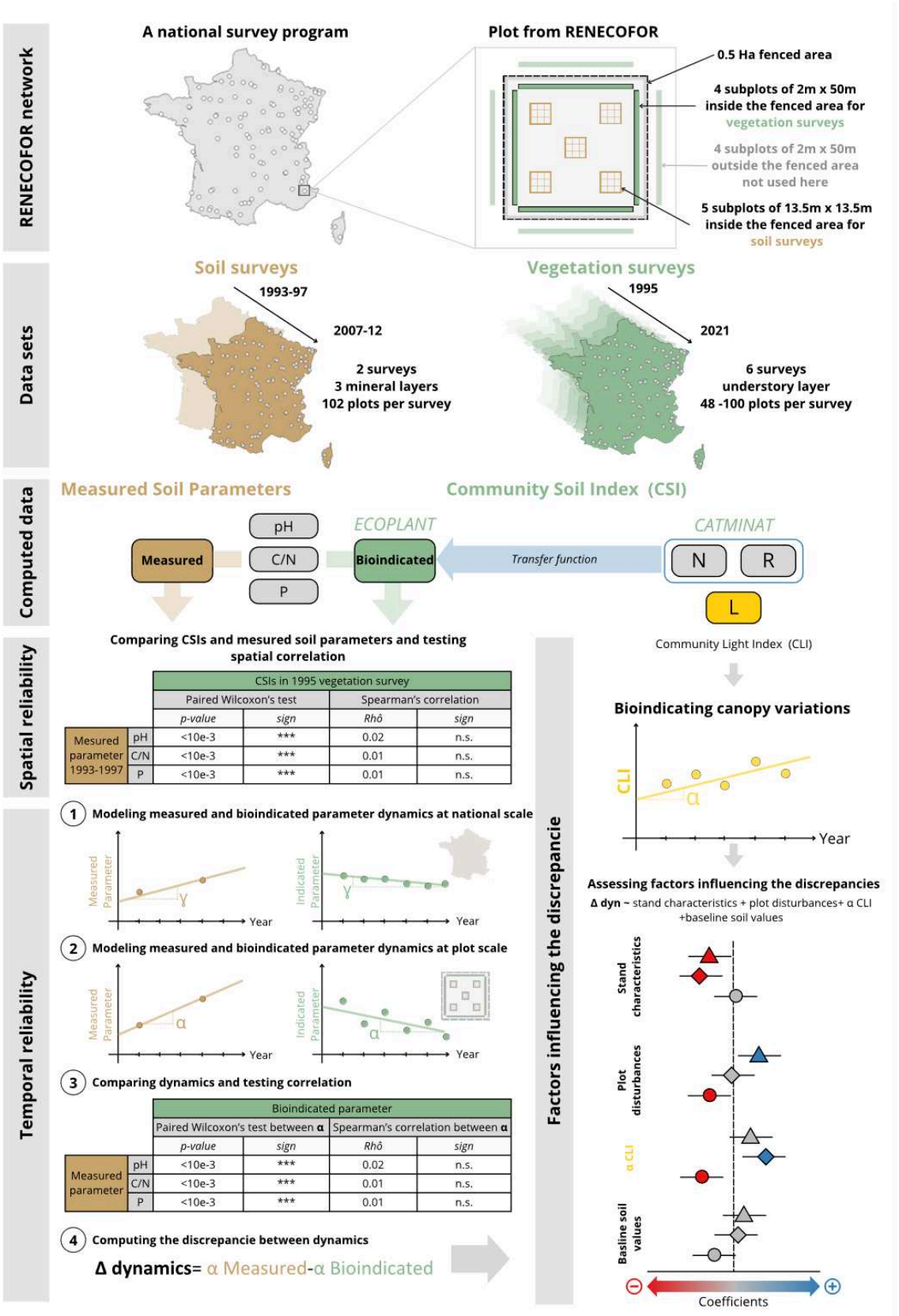


FIGURE 1 Study workflow overview.

The workflow diagram shows a map of the RENECOFOR network, highlighting the 102 plots where data were collected over two decades. It includes two datasets: soil surveys (in brown) and botanical surveys (in green). The Community Soil Index (CSI) and Community Light Index (CLI; in yellow) were calculated using the EcoPlant and CATMINAT Indicator Values databases. CSIs and measured soil parameter means were compared across the network, and correlations between them were tested. The same analyses were performed with temporal trends of CSIs and soil parameters at national and local scale. The study also examined how plot disturbances and stand characteristics influenced these dynamics and the matching between them.

2. MATERIAL & METHODS

2.1. Long-term monitoring of forest ecosystems across a national network

2.1.1 RENECOFOR

Established in 1992 by the French National Forest Office (ONF), the RENECOFOR network is a national long-term monitoring program consisting of 102 permanent plots distributed across metropolitan France. These plots represent diverse ecological contexts and include forests dominated by species such as *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea*, *Quercus robur*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra var. corsicana*, *Pinus pinaster*, *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua*, *Picea abies*, and *Abies alba* (**FIGURE I** & **TABLE S1**; Ulrich, 1995; Nicolas *et al.*, 2014). Each plot covers two hectares and is located within a mature, even-aged stand, with a 0.5-hectare fenced central zone designed to exclude large herbivores (**FIGURE I**; Boulanger *et al.*, 2018). Between 1993 and 2021, vegetation monitoring and soil sampling were carried out on these plots to track long-term changes in soil conditions and understory plant communities across France (**FIGURE S1**).

2.1.2 Vegetation monitoring

The vegetation monitoring program follows a standardized inventory protocol initiated in 1995 across 102 plots, with surveys repeated every five years until 2021, conducted twice annually (spring and summer) (**FIGURE I** & **FIGURE S1**). To minimize observer bias and ensure data consistency, all RENECOFOR botanical experts participated in calibration exercises held one year prior to each resurvey campaign (Archaux *et al.*, 2006, 2009; Camaret & Brêthes, 2004).

Vascular plant inventories were conducted in eight 2 m × 50 m subplots, equally distributed inside and outside the 0.5-hectare fenced area. Only the four subplots inside the fenced zone were used in this study, as soil measurements were restricted to this area. Analyses focused on the understory vegetation layers, defined as the herbaceous layer (herbaceous and woody plants up to 0.3 m in height) and the lower shrub layer (woody species from 0.3 to 2 m in height). Following Richard *et al.* (2021), only taxa identified to species or subspecies level were included.

Due to storm damage, sample sizes varied across the six survey campaigns after the 1995 baseline: 87 plots in 2000 (post-Lothar and Martin storms), 48 plots in 2010 (post-Xynthia storm), and 100 plots in 2005, 2015, and 2021 (**FIGURE I** & **FIGURE S1**). The final dataset comprises floristic inventories from these six campaigns (1995, 2000, 2005, 2010, 2015, and 2021), covering 2141 subplots and 835 species in total.

2.1.3 Soil sampling

For each of the 102 permanent plots, soil samples were collected during two distinct periods: between 1993 and 1997, and again between 2007 and 2012, resulting in an average interval of about 15 years per plot. Sampling was conducted during the same season for each plot to minimize seasonal variability (**FIGURE S1**).

Within the 0.5-hectare fenced central zone, three soil layers (0–10 cm, 10–20 cm, and 20–40 cm) were sampled at five 13.5 m × 13.5 m subplots located at the plot center and the four corners. For each layer and subplot, one composite sample was formed by pooling soil collected from five points arranged in a systematic 4.5 m × 4.5 m grid nested within each subplot, carefully avoiding disturbed areas (e.g., logging residues, skidder tracks) and proximity to living trees (**FIGURE I**; Saenger *et al.*, 2024).

Soil sampling involved excavating a 50 × 50 × 40 cm pit. An undisturbed soil core was taken using a Kopecky cylinder (250 cm^3) to measure bulk density, while the remaining soil was collected for chemical analyses (Saenger *et al.*, 2024). In total, 3,060 soil samples were analysed across the two sampling periods.

This study focused on soil chemical parameters that can be inferred from plant indicator values (IVs) as provided by the CATMINAT and EcoPlant databases (e.g., pH and nutrient availability). Exchangeable soil acidity was measured with a glass electrode in a 0.01 $mol \cdot L^{-1}$ $CaCl_2$ solution (pH $CaCl_2$), while active acidity was assessed as pH in water using a 1:5 (v/v) soil-to-deionized water suspension (pH H_2O).

Extractable phosphorus (P, in $g \cdot kg^{-1}$) was determined using the Dyer method for samples with pH $CaCl_2$ below 6.5, and the Joret-Hébert method for samples with pH $CaCl_2$ above 6.5. The carbon-to-nitrogen ratio (C/N) was calculated from soil organic carbon (C) and total nitrogen (N) contents. In the 0–10 cm layer, both C and N were measured by dry combustion after decarbonation. For the 10–20 cm and 20–40 cm layers, C was quantified by sulfochromic oxidation at 30°C after decarbonation (Anne method), while N was determined by the Kjeldahl method (**FIGURE I**).

2.2. Understory Community Soil Index computation

2.2.1 Computing CSIs

We inferred edaphic conditions using the community soil index (CSI) (**FIGURE I**). CSI values were calculated by averaging the indicator values (IVs) related to soil chemistry across all understory species present in a given subplot survey (with at least two species), following the classical approach (Diekmann, 2003). Because abundance-weighted calculations yielded similar results but can introduce bias, especially when comparing different vegetation types (Diekmann, 2003)—and as shown by Iseli *et al.* (2025), who demonstrated that thermophilization of alpine plant communities is more readily detected using presence-absence data rather than abundance data, we based our CSI

calculations on presence-absence data. CSI values were thus computed for each of the four vegetation subplots across all permanent plots and all six monitoring campaigns.

2.2.2 Transferring species IVs from CATMINAT to EcoPlant for extensive and quantitative indicators

Understory plant species IVs for soil chemical parameters were extracted from the CATMINAT (Julve, 1998) and EcoPlant (Gégout *et al.*, 2005) databases and combined to leverage their respective strengths.

The CATMINAT database provides plant species IVs for soil parameters, but on ordinal scales. The following IVs were used: nutrient (N), representing soil nutrient availability from hyper-oligotrophic (1) to polytrophic (9), and reactivity (R), indicating soil acidity from hyper-acidiphilic (1) to hyper-basiphilic (9). Although CATMINAT covers most species in our dataset, its unitless IVs prevent direct comparison with quantitative soil parameters.

The EcoPlant database is a national compilation of phytosociological surveys from French forests, linked to detailed environmental data, including soil analyses (physical and chemical properties from the A horizon). Species IVs for soil pH, C/N ratio, and extractable P were derived from 2,000 to 5,600 plots containing both vegetation and soil data. These IVs are expressed in units that are directly comparable to the measured soil parameters (Gégout *et al.*, 2005).

While EcoPlant provides IVs for pH measured in water (pH H_2O), this study also examines its potential to reflect pH $CaCl_2$. The soil analysis methods used in EcoPlant (Gégout *et al.*, 2001) are consistent with those of the RENECOFOR network for pH and C/N. However, for extractable phosphorus, EcoPlant applies the Duchaufour method, which is preferred over the Dyer method for non-calcareous soils. However, EcoPlant covers fewer species than CATMINAT.

To address this limitation, three transfer functions were developed to calculate CSI values for pH H_2O, C/N ratio, and extractable phosphorus. A generalized additive model (GAM) was used to convert the unitless CATMINAT CSI values, based on R and N indices, into EcoPlant CSI values compatible with soil chemical parameters. The transfer functions were calibrated using an independent dataset of 45,377 floristic surveys from the National Forest Inventory (NFI). The explained deviance, which reflects the model fit, was 81.7% for pH CSI, 74.8% for soil C/N ratio CSI, and 53.4% for soil extractable phosphorus.

This approach combines the extensive species coverage of CATMINAT with the quantitative precision of EcoPlant (**FIGURE I**; see also p. 36; Richard *et al.*, 2021, and Lenoir *et al.*, 2013 for similar methods).

2.3. Stand characteristics and disturbances

2.3.1 Collecting factors potentially influencing the correspondence between temporal changes based on measured soil parameters and temporal changes based on CSI values

In addition to soil sampling and vegetation surveys, the RENECOFOR program provided ancillary data for each of the 102 plots, including stand characteristics and disturbance history.

Stand age at the start of the botanical surveys in 1995 was considered a potential driver of mismatch, as stand aging may influence understory dynamics (Jules *et al.*, 2008). We also considered the baseline soil parameter values (pH $CaCl_2$, pH H_2O, C/N ratio, and P) for each site, i.e., the first measurement taken between 1993 and 1997 during the initial soil inventory campaign.

A distinction was also made between coniferous and deciduous stands due to their contrasting understory plant species compositions (Barbier *et al.*, 2008). Disturbance history included the cumulative number of both natural and anthropogenic events from 1995 to 2021. Natural disturbances, such as windthrow, were distinguished from anthropogenic disturbances related to forest management practices (thinning, cleaning, tree extraction). Each event was counted once regardless of intensity, resulting in two variables per plot: cumulative natural disturbances and cumulative anthropogenic disturbances. Variation in canopy openness, which affects understory composition and dynamics, was assessed using light preference indicators of understory species. The community light index (CLI) was calculated from CATMINAT values representing species shade tolerance(L), ranging from hyper-sciaphilic (1) to hyper-heliophilic (9), following the same protocol as for the CSI, but without transformation, keeping the original ordinal and unitless scale. Changes in CLI over time were used as a proxy for canopy openness variation.

2.4. Statistical analysis

2.4.1 Testing the reliability of CSI values across the entire RENECOFOR network

To test the spatial reliability of CSI values in inferring soil chemical parameters across the entire RENECOFOR network, we assessed, in paired comparisons: (1) CSI values from the 1995 floristic inventory against empirical values of the studied soil parameters as measured in each soil layer during the first soil sampling campaign (1993-1997); (2) CSI values from the 2015 floristic inventory, which is more complete than the 2010 inventory, against empirical values of the studied soil parameters as measured in each soil layer during the second soil sampling campaign (2007-2012). The choice of the most appropriate floristic inventory campaigns to be validated against actual soil measurements was guided by the need to balance temporal proximity with the soil sampling campaigns and to maximize the number of available sites for analysis at those periods.

For each soil parameter and each period, we used paired Wilcoxon signed-rank tests to compare mean values between CSI and measured data, and Spearman's rank correlations to assess

the strength of their association. These non-parametric tests were chosen due to the non-normality of the data and because vegetation and soil data were collected on the same plots.

2.4.2 Assessing the temporal dynamics of changes in soil chemical parameters and CSI values

To investigate the temporal dynamics of the empirically-measured soil parameters (pH H_2O, pH $CaCl_2$, C/N ratio, and extractable phosphorus) across soil layers (0–10 cm, 10–20 cm, and 20–40 cm), linear mixed-effects models (LMMs) were applied, using the same methodology as presented in Saenger *et al.* (2024). For each soil parameter (n = 4), soil layer (n = 3), and sampling period (n = 2; 1993-1997 and 2007-2012), measurements from the five soil subplots were averaged to obtain a single composite value per plot (n = 99-101), these values were used as the response variable. The variable "Year" was included as a continuous fixed effect variable, and not as a factor variable, enable direct comparisons between soil and vegetation surveys, with 1995 representing the initial campaign and 2010 the follow-up soil sampling campaign. Plot identity (ID; n = 98-100) was included as a random effect on both the intercept and the slope to account for the paired structure of the longitudinal data.

A similar modelling approach was used to analyse the temporal dynamic of CSI values parameters (pH, C/N ratio, and extractable phosphorus). For each of the four vegetation subplots, within each permanent plot, and for each of the six survey periods, one CSI value was available and used as the response variable. The continuous variable "Year" was included as a fixed effect. Given the higher number of observations in the vegetation dataset (i.e., we did not pool the four vegetation subplots together), a more detailed random effect structure was implemented, incorporating subplot ID nested within plot ID. The main variable of interest, "Year", represented the six vegetation monitoring campaigns (1995, 2000, 2005, 2010, 2015, and 2021), with plot ID encompassing 48, 87, or 100 levels, depending on the number of permanent plots that were available during a given vegetation monitoring campaign, and subplot ID encompassing 4 levels for the four inner vegetation subplots.

To allow for between-site variation in the temporal dynamics of both soil parameters and CSI values, we included random slope terms in our LMMs, allowing the slope of the “Year” variable to vary by level of the random effect variable (e.g., plot ID). The estimated coefficient of the “Year” variable in each model was used as a proxy for the temporal trends in soil parameters and CSI values denoted $\gamma^{Measured}$ and $\gamma^{Bioindicated}$, respectively.

Normality and homoscedasticity in model residuals were visually assessed. LMMs were fitted using Restricted Maximum Likelihood (REML), and the significance of predictors was assessed using Wald’s test after Satterthwaite's method was applied to approximate the degrees of freedom (Christensen, 2018).

2.4.3 Testing the degree of coupling between temporal changes in soil parameters and temporal changes in CSI values

To compare the dynamics of measured and bioindicated soil parameters at the plot level, separate linear models were fitted for each plot and each mineral soil layer, with both measured values and CSIs regressed against the "Year" variable. The resulting temporal trends were extracted and denoted as $\alpha^{Measured}$ for soil parameters and as $\alpha^{Bioindicated}$ for CSIs.

The average $\alpha^{Measured}$ and average $\alpha^{Bioindicated}$ across all plots were then compared using paired Wilcoxon tests, applied separately for each soil parameter and soil layer. This non-parametric test was chosen due to the non-normal distribution and the paired structure of the data.

A Spearman rank correlation test was then applied to assess the relationship between $\alpha^{Measured}$ and $\alpha^{Bioindicated}$, accounting for the non-normality of the data. In contrast to the first approach based on a single linear mixed-effects model across all plots, which estimates an overall trend while accounting for the hierarchical structure of the data, this method focuses on exploring the local dynamics specific to each plot. It allows for the direct evaluation of the concordance between vegetation and soil dynamics at a fine scale, without these being attenuated or masked by the global average produced by the mixed-effects model at large scale.

To estimate canopy openness variation at the plot scale, the dynamics of CLI values were modelled using the same approach as for CSI, resulting in the calculation of α^{CLI}, which represents the temporal trend of CLI values for each plot individually.

2.4.4 Investigating factors influencing the degree of coupling between changes in soil chemical parameters and changes in CSI values

To assess correspondence (similarity or discrepancy) between the temporal dynamics of soil parameters and CSI values within each plot, the following offset variable was computed:

$$\Delta\ dynamics = \alpha\ Measured\ -\ \alpha\ Bioindicated$$

Δ dynamics represents the difference between soil parameter changes over time ($\alpha^{Measured}$) and the associated temporal dynamic in CSI values ($\alpha^{Bioindicated}$). A positive value of Δ dynamics indicates that $\alpha^{Measured}$ is greater than $\alpha^{Bioindicated}$ while a negative value indicates the opposite. The mean and standard deviation of Δ dynamics were then computed for each soil parameter and soil layer across all RENECOFOR plots.

To investigate how stand characteristics and disturbance history influence the correspondence between measured and bioindicated soil dynamics, we fitted linear mixed-effects models (LMMs) using Δ dynamics as the response variable, separately for each soil parameter and soil layer. The following covariates were included as fixed effects: stand age in 1995, dominant tree species type (coniferous or deciduous), cumulative number of anthropogenic disturbances, cumulative number of natural disturbances, the canopy openness variation (α^{CLI}), baseline soil parameter values (pH $CaCl_2$, C/N ratio, and P; pH H_2O was excluded due to its high correlation with pH $CaCl_2$). Plot ID was

included as a random effect on the intercept to account for variability between plots across the network.

To disentangle whether these factors influenced the measured soil dynamics or the vegetation-inferred dynamics (or both) we fitted the same models using $\alpha^{Measured}$ and $\alpha^{Bioindicated}$ separately as response variables. This allowed us to assess whether stand characteristics and disturbance regimes differentially affected observed soil changes and the vegetation bioindicated response.

For each model, all possible covariate combinations were evaluated and ranked using the corrected Akaike Information Criterion (AICc). The difference in AICc values (ΔAICc) between each model and the best candidate model (i.e., the model with the lowest AICc value) was calculated. For models with ΔAICc < 3, model averaging was applied to estimate the conditional mean of each coefficient and its 95% confidence interval. All continuous predictors, except the cumulative number of anthropogenic and natural disturbances, were standardized (z-scores) to facilitate comparability and interpretation of effect sizes (Schielzeth, 2010). Predictor significance was assessed using Type III ANOVA, applied to models fitted with Maximum Likelihood (ML) estimation.

2.4.5 Statistical precision and used packages

The variance explained by each LMM was assessed using the r.squared.GLMM function from the "MuMIn" package v1.47.1 (Bartoń, 2013). Both marginal (R^2m, for fixed effects) and conditional (R^2c, for both fixed and random effects) R^2 values (Nakagawa & Schielzeth, 2013) were calculated. Results were considered statistically significant if the p-value was less than 0.05.

All statistical analyses were performed in R version 4.2.2 (The R Foundation for Statistical Computing, 2022), with models built using the "lme4" package v1.1.31 (Bates *et al.*, 2014) and the "nlme" package v3.6.160 (Pinheiro *et al.*, 2013). Data visualisation and management utilised additional packages including "ggplot2" v3.4.2 (Wickham *et al.*, 2016), "dplyr" v1.1.2 (Wickham & François, 2014).

3. RESULTS

3.1. Evaluating the reliability of understory IVs as bioindicators of soil chemistry across the broad spatial scale of the RENECOFOR network

At the national scale, community soil indexes (CSIs) were positively correlated with measured soil parameters across all soil layers and for both sampling periods (First sampling period: 1995 vegetation survey vs. 1993–1997 soil sampling; Second sampling period: 2015 vegetation survey vs. 2007–2012 soil sampling), except for extractable phosphorus concentrations (**FIGURES 2A**, **2C**, **2E**, **2G** &**TABLE I**).

CSI values for soil pH and C/N ratio showed strong positive correlations with measured values of pH H_2O and C/N ratio, respectively, across all soil layers and for both soil sampling periods (rho > 0.60, $p < 10^{-3}$; **FIGURE 2C**, **2E** & **TABLE I**). For both parameters, correlation strength decreased with depth (**FIGURES 2A**, **2C**, **2E**, **2G** & **TABLE I**). Similarly, strong correlations were found between CSI values for soil pH and measured pH $CaCl_2$ during both sampling periods in the 0-10 cm layer (rho > 0.80, $p < 10^{-3}$; **FIGURE 2A**) and in the 10-20 cm layer (rho > 0.60, $p < 10^{-3}$; **TABLE I**), while it was weaker but still significant in the 20-40 cm layer (rho < 0.50, $10^{-3} < p < 0.01$; **TABLE I**).

CSI values for extractable phosphorus concentrations were weakly but significantly correlated with measured values in the 0–10 cm layer (rho = 0.421, p = 0.001; **FIGURE 2G**), and in the 10–20 cm layer during the first sampling period (rho = 0.458, p < 0.001; **TABLE I**). No significant correlation was observed in the deeper layer during the first period, nor in any layer during the second period.

Community soil indexes (CSIs) consistently overestimated measured soil chemical parameters across all soil layers and both sampling periods, with significantly higher average values than measurements, according to paired Wilcoxon tests ($p < 0.05$; **FIGURE 3** & **TABLE S2**).

For soil pH $CaCl_2$, average measured values across the 102 plots ranged from 4.04 ± 1.00 to 4.54 ± 1.09 depending on the sampling period and soil layer, while pH CSI values ranged from 5.27 ± 0.66 to 5.28 ± 0.67. Measured pH (H_2O) values were closer to pH CSI values, ranging from 4.76 ± 0.98 to 5.18 ± 1.13 (**FIGURE 3A**, **3B** & **TABLE S2**).

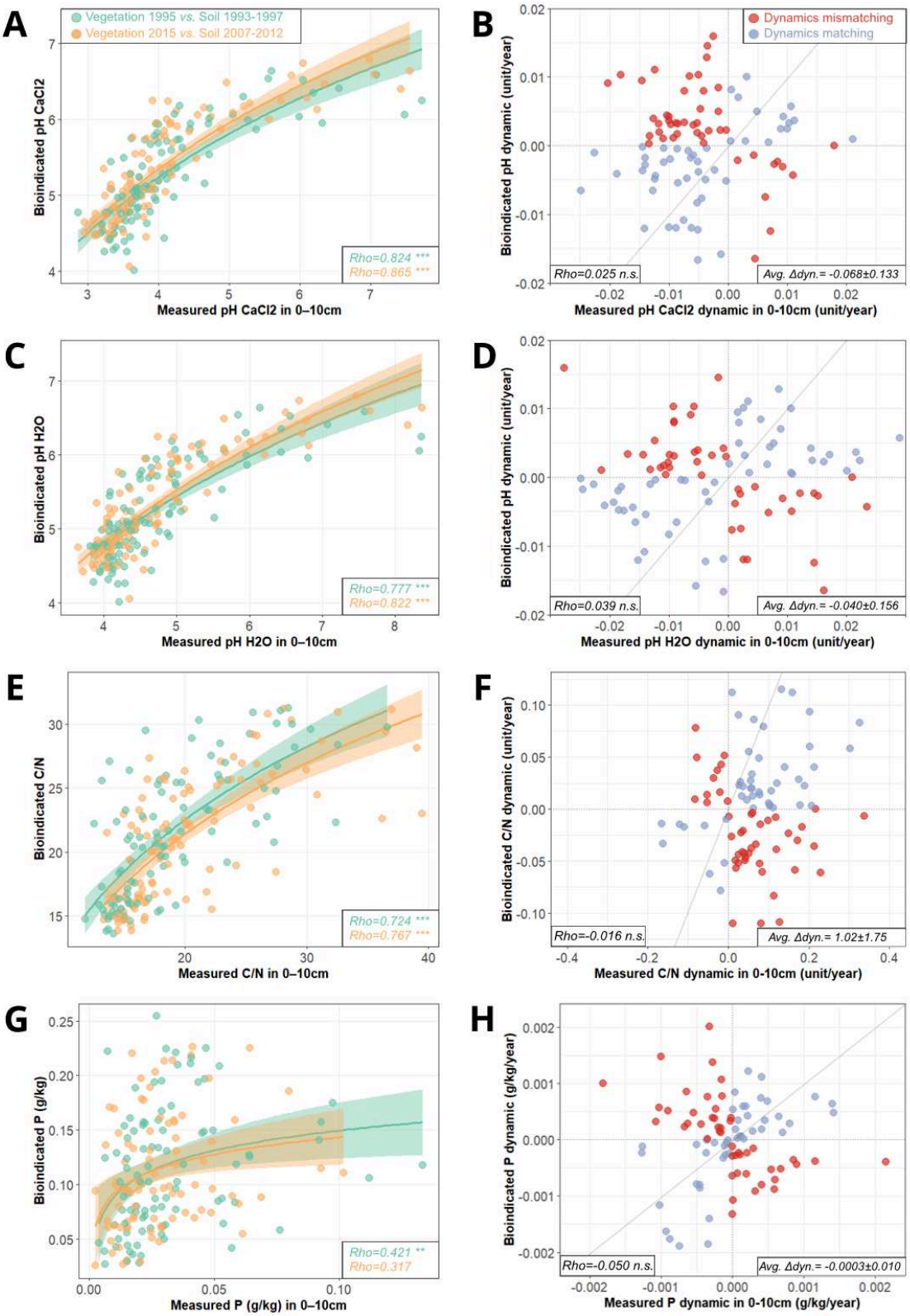


FIGURE 2 Spatial and temporal relationships between Community Soil Indices (CSIs) and measured soil values in the 0–10 cm soil layer across the RENECOFOR network.

The figure is divided into eight panels. Panels A and B depict respectively the spatial and temporal relationships between bioindicated and measured pH $CaCl_2$ values. Panels C and D show respectively the spatial and temporal relationships for bioindicated and measured pH H_2O. Panels E and F illustrate respectively the spatial and temporal relationships between bioindicated and measured C/N ratios. Finally, panels G and H present respectively the spatial and temporal relationships for bioindicated and measured extractable phosphorus (g/kg), all in the 0–10 cm soil layer. For the spatial relationships shown in panels A, C, E, and G, two comparisons are tested: vegetation surveys from 1995 versus soil sampling from 1993–1997 (displayed in green), and vegetation surveys from 2015 versus soil sampling from 2007–2012 (shown in yellow). For the temporal relationships in panels B, D, F, and H, the dynamics of bioindicated values are compared with those of measured values. Points are colored in blue when both dynamics change in the same direction (matching), and in red when they move in opposite directions (mismatching). Spearman correlation coefficients (Rho) are reported along with their significance levels, bioindicated as follows: "ns" for not significant, "." for $p < 0.1$, "" for $p < 0.05$, "" for $p < 0.01$, and "" for $p < 0.001$.

For soil C/N ratios, measured values ranged from 16.21 ± 5.87 to 20.83 ± 8.49, whereas CSI values ranged from 21.00 ± 5.11 to 21.23 ± 5.36 depending on the vegetation survey year (**FIGURE 3C** & **TABLE S2**).

For soil extractable phosphorus concentrations, measured values ranged from 0.03 ± 0.08 g/kg to 0.04 ± 0.07 g/kg across all layers and both periods, whereas CSI values were substantially higher, ranging from 0.11 ± 0.05 g/kg to 0.12 ± 0.06 g/kg. This overestimation, by a factor of two to three, is consistent across layers and periods and was expected given the different measurement methods used (**FIGURE 3D** & **TABLE S2**).

TABLE I – Results of spatial and temporal spearman's correlations between soil measured and bioindicated parameters. including significance level.

The table reports Spearman's rho correlation coefficients and significance levels, with the following symbols: p > 0.1 = "n.s".; 0.1 > p > 0.05 = "."; 0.05 > p > 0.01 = "*"; 0.01 > p > 0.001 = "**"; p < 0.001 = "***".

N=99		Spearman's correlation						Average Δ dynamics per decade
		Vegetation survey 1995 vs. Soil sampling 1993-1997		Vegetation survey 2015 vs. Soil sampling 2007-2012		$\alpha^{Measured}$ vs. $\alpha^{Bioindicated}$		
Layer	Parameter	*Rho*	*Sign.*	*Rho*	*Sign.*	*Rho*	*Sign.*	*Mean ± SD*
10-20cm	pH $CaCl_2$	0.631	***	0.667	***	0.069	ns	-0.045±0.144
	pH H_2O	0.722	***	0.786	***	0.111	ns	-0.013±0.158
	C/N	0.695	***	0.727	***	-0.028	ns	2.17±2.97
	P (m/kg)	0.458	***	0.309	ns	-0.040	ns	-0.003±0.035
20-40cm	pH $CaCl_2$	0.384	**	0.415	**	0.101	ns	-0.019±0.211
	pH H_2O	0.673	***	0.739	***	0.148	ns	0.027±0.221
	C/N	0.623	***	0.622	***	-0.065	ns	2.10±2.85
	P (m/kg)	0.162	ns	0.115	ns	-0.071	ns	-0.001±0.036

3.2. Assessing how changes in CSI values matches with soil chemistry changes over the long temporal extent of the RENECOFOR network

3.2.1 Soil national trends

Although these results have already been published (Saenger, 2024), we briefly report here the main trends in measured soil chemical parameters at the national scale, as they provide essential context for comparison with the vegetation-based soil trajectories presented in the following sections.

According to LMMs, C/N ratios in all soil layers increased significantly over the study period ($p < 10^{-3}$), ranging from 0.964 ± 0.090 per decade in the 0–10 cm layer to 1.982 ± 0.130 per decade in the 20–40 cm layer (**FIGURE 3** & **TABLE 2**). Measured pH CaCl2 significantly decreased in the 0–10 cm layer (–0.045 ± 0.010 per decade, $p < 10^{-3}$, **FIGURE 2** & **TABLE 2**), while pH H2O significantly increased in the 20–40 cm layer (0.049 ± 0.012 per decade, $p < 10^{-3}$, **TABLE 2**).

In contrast, pH CaCl2 tended to decrease in the 10–20 cm layer (–0.022 ± 0.011 per decade, p = 0.051, **TABLE 2**), and pH H2O also tended to decrease in the 0–10 cm layer (–0.017 ± 0.010 per

decade, p = 0.08, FIGURE 3 & TABLE 2). Extractable phosphorus concentrations in the 20–40 cm layer showed a non-significant increasing trend (0.002 ± 0.001 g/kg per decade, p = 0.05, TABLE 2).

3.2.2 CSIs national trends

Among the vegetation-based indicators, only the CSI values for soil C/N exhibited a significant temporal trend over the past 26 years, with a modest national-scale decrease of approximately 0.2 units (−0.0076 ± 0.0038 unit/year, p = 0.05, FIGURE 3 & TABLE 2). However, this change remained weak relative to the spatial variability observed across the network in any given year e.g. over 27 times smaller than the national standard deviation in 1995 (TABLE S2).

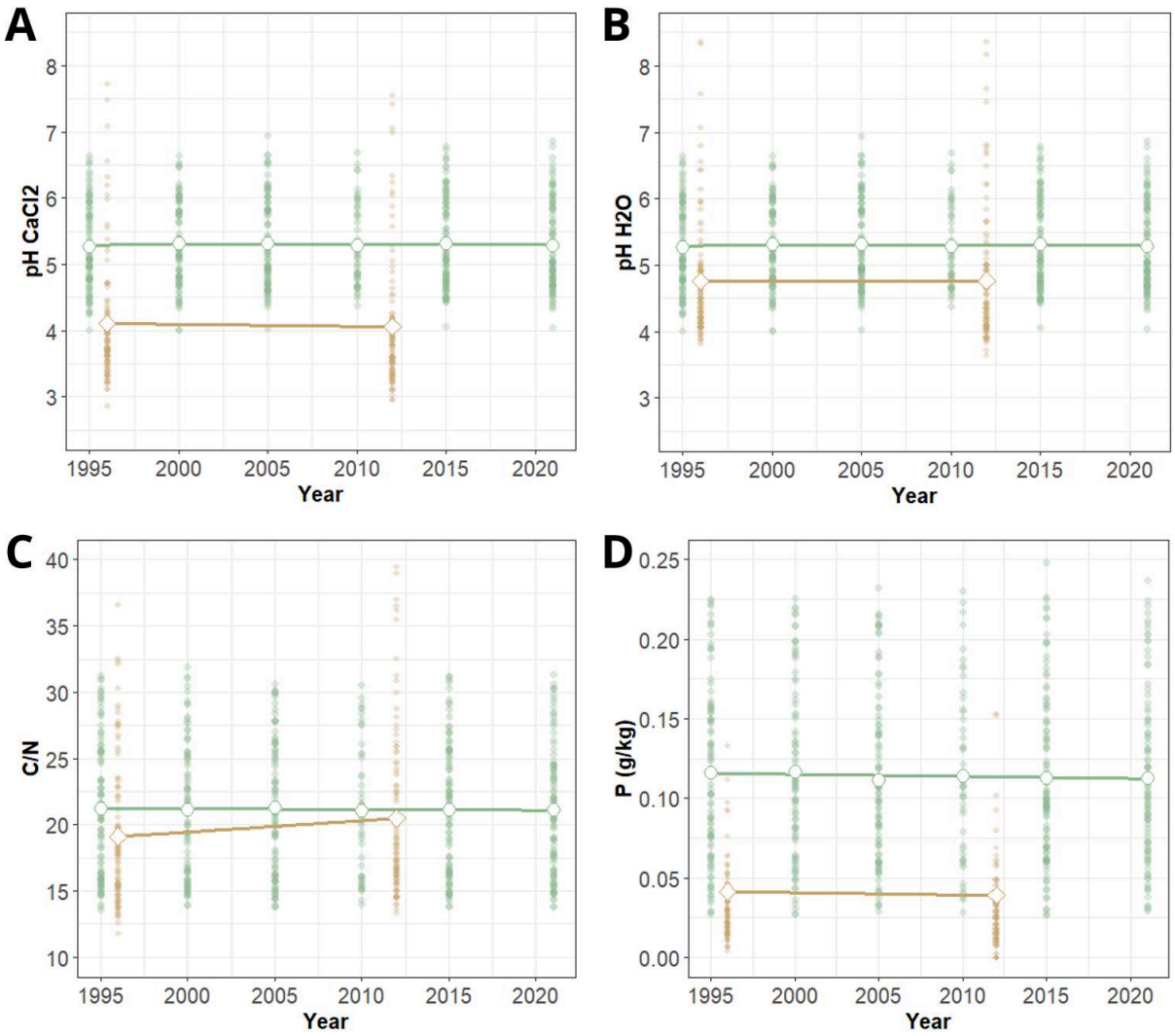


FIGURE 3 National trends of Community Soil Indices (CSIs) and measured soil values in the 0–10 cm soil layer across the RENECOFOR network between 1995 and 2021.

The figure is divided into four panels. Panel A shows measured and bioindicated pH ($CaCl_2$), Panel B presents measured and bioindicated pH (H_2O), Panel C displays measured and bioindicated C/N ratio, and Panel D depicts measured and bioindicated extractable phosphorus (g/kg). Green lines with green circles represent the national trends bioindicated by understory vegetation (bioindicated values), while brown lines with diamonds show the national trends based on soil measurements. Faded points in the background correspond to average CSI or measured soil parameter values from all RENECOFOR plots.

Across all models assessing CSI and measured soil parameter dynamics, the fixed effect of time explained only a negligible portion of the variance (R^2m ranging from $<10^{-3}$ to 0.04), while the random effects structure captured the vast majority (R^2c ranging from 0.83 to 0.94, **TABLE 2** & **S3**), emphasizing the predominance of spatial heterogeneity over temporal shifts in both measured soil parameters and their vegetation-based indicators.

3.2.3 Comparison between soil and CSIs trends

When comparing the local temporal trends of measured soil parameters ($\alpha^{Measured}$) and bioindicated CSIs ($\alpha^{Bioindicated}$) across plots, paired Wilcoxon tests revealed significant differences between the two for all soil parameters and layers ($p < 0.05$). The average local dynamics observed in soil measurements and vegetation-based indicators thus differ consistently. Furthermore, Spearman correlation tests showed no significant positive correlations between $\alpha^{Measured}$ and $\alpha^{Bioindicated}$ across parameters and layers (all p-values > 0.05; **FIGURE 2B**, **2D**, **2F**, **2H** & **TABLE I**), highlighting frequent mismatches in the direction and magnitude of local temporal changes between observed soil conditions and their vegetation-based signals. In the 0–10 cm soil layer, these mismatches were particularly common, with opposite trends observed in 57% of the plots for soil pH $CaCl_2$, 55% for soil pH H_2O, 60% for the C/N ratio, and 52% for extractable phosphorus (red dots in **FIGURE 2B**, **2D**, **2F**, **2H**).

TABLE 2 – Linear mixed model coefficients assessing the dynamics of understory CSIs, CLI, and measured soil parameters.

The table reports significance levels, as well as marginal and conditional R^2 values, which represent the proportion of variance explained by the fixed effect alone, and by both fixed and random effects, respectively. For models assessing the temporal dynamics of indicator values, the fixed effect is time, represented by the "Year" variable, while the random effect includes subplot ID nested within plot ID to account for both intra- and inter-plot variability. In models assessing the dynamics of measured soil parameters, the fixed effect remains the same, whereas the random effect includes only plot ID.

Library	Indicator Value	N		Dynamic per decade ± SD	Sign.	R^2m	R^2c
		Plot	Sub-plot	$\gamma^{Biondicated}$			
EcoPlant	C/N_{indic}	536	2241	-0.076 ± 0.038	*	$<10^{-3}$	0.90
Layer	**Parameter**			$\gamma^{Measured}$			
0-10 cm	pH $CaCl_2$	200	996	-0.045 ± 0.010	***	$<10^{-3}$	0.94
	pH H_2O	200	998	-0.017 ± 0.010	.	$<10^{-3}$	0.94
	C/N	200	998	0.964 ± 0.090	***	0.01	0.88
10-20 cm	pH $CaCl_2$	200	996	-0.022 ± 0.011	.	$<10^{-3}$	0.92
	C/N	200	998	1.941 ± 0.124	***	0.04	0.85
20-40 cm	pH H_2O	198	982	0.049 ± 0.012	***	0.001	0.93
	C/N	198	986	1.982 ± 0.130	***	0.04	0.83
	P (m/kg)	196	948	0.002 ± 0.001	.	$<10^{-3}$	0.92

The differences in local dynamics between CSIs values ($\alpha^{Bioindicated}$) and directly measured soil parameters ($\alpha^{Measured}$) referred to as *Δ dynamics*, were consistently high across all plots and soil layers in the RENECOFOR network. These *Δ dynamics* values indicate substantial mismatches between vegetation-inferred trends and actual soil changes at the plot scale.

Depending on the soil layer considered, average *Δ dynamics* ranged from -0.069 ± 0.134 to 0.027± 0.221 units per decade for soil pH ($CaCl_2$ or H_2O), from 0.974 ± 1.67 to 2.17 ± 2.97 units per decade for the C/N ratio, and from -0.001 ± 0.036 to 0.005 ± 0.036 g/kg per decade for extractable phosphorus (**TABLE 2**).

3.3. Identifying factors that influence the degree of coupling between measured changes in edaphic conditions and inferred changes from plant IVs

Given the stronger correlations between measured and bioindicated values in surface soils, the analysis of Δ dynamics and its potential drivers focused on the 0–10 cm layer (**FIGURE 4**). Results for deeper layers (10–20 cm and 20–40 cm) are available in the supplementary material (**FIGURES S2** & **S3**) but will not be detailed further here.

For soil pH $CaCl_2$, measured temporal changes increased significantly with stand age (0.324 ± 0.099 SE), as did Δ dynamics (0.294 ± 0.101 SE). For pH H_2O, measured dynamics increased with both stand age (0.245 ± 0.100 SE), baseline pH $CaCl_2$ (0.210 ± 0.100 SE) and decreased with baseline C/N (-0.210 ± 0.103 SE). These same relationships were observed for Δ pH H_2O dynamics, which rose with stand age (0.224 ± 0.100 SE) and decreased with baseline C/N (-0.233 ± 0.101 SE).

For the C/N ratio, measured dynamics decreased with stand age (–0.219 ± 0.101 SE), and increased with baseline pH $CaCl_2$ (0.369 ± 0.099 SE) and baseline C/N (0.206 ± 0.105 SE). Consequently, Δ C/N dynamics decreased with stand age (–0.287 ± 0.100 SE) and increased with baseline pH $CaCl_2$ (0.301 ± 0.097 SE). Finally, vegetation-inferred dynamics increased with changes in the community light index (0.357 ± 0.103 SE).

For extractable phosphorus, measured dynamics declined with higher baseline P levels (–0.263 ± 0.102 SE). Vegetation-inferred dynamics also decreased with baseline P (–0.336 ± 0.153 SE), cumulative anthropogenic disturbances (–0.087 ± 0.041 SE), and community light index dynamics (–0.418 ± 0.102 SE). In contrast, Δ phosphorus dynamics were positively related to community light index dynamics (0.362 ± 0.097 SE).

In the models assessing measured soil parameter dynamics, vegetation-inferred CSI dynamics, and the difference between them (Δ dynamics) in the 0–10 cm soil layer, fixed effects explained between 8% and 27% of the variance (R^2m = 0.05–0.23, **TABLE S3**), while random effects accounted for 89% to 95% of the variance (R^2c = 0.88–0.91, **TABLE S3**).

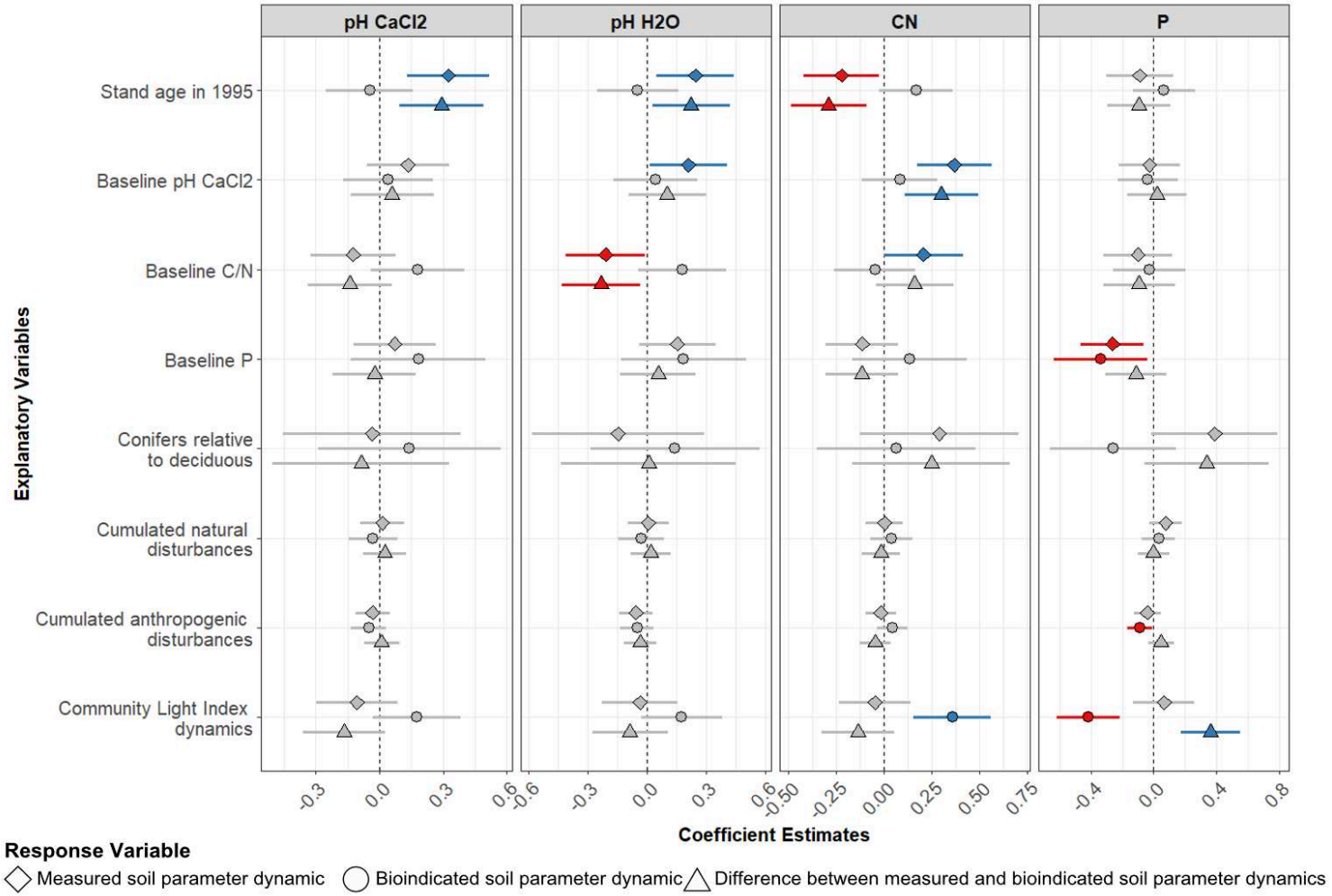


FIGURE 4 Coefficient estimates (± SD) from mixed-effects models assessing the influence of various explanatory variables on soil parameter dynamics in 0-10cm layer, both measured and bioindicated, as well as their differences.

Coefficient estimates and 95% confidence intervals extracted from linear mixed-effects models assessing the influence of various explanatory variables on soil parameter dynamics, both measured and bioindicated, as well as their differences. Shapes of the points correspond to the response variables in the models: diamonds represent measured soil parameter dynamics, circles indicate soil parameter dynamics derived from plant indicators (indicated dynamics), and triangles show the differences between measured and bioindicated dynamics. Explanatory variables are listed vertically and include: stand age in 1995; measured values in 1995 for pH $CaCl_2$, pH H_2O, C/N ratio, and soil phosphorus concentration; cumulative number of anthropogenic and natural disturbances from 1995 to 2021; and the dynamics of the CLI index. Points are colored based on the significance and direction of their effect: blue for significant positive effects, red for significant negative effects, and grey for non-significant effects.

4. DISCUSSION

This study assessed the potential of forest understory plant species IVs to reflect the observed variation in soil chemical parameters across large spatial and temporal extents, while also investigating factors influencing the degree of coupling between empirically measured and floristically inferred changes in edaphic conditions. Our main results confirm the usefulness of plant IVs in capturing spatial variation in soil chemical parameters. However, significant discrepancies between measured and inferred soil dynamics cast doubt about their reliability for monitoring long-term changes in soil chemistry. These discrepancies varied according to stand age and baseline soil parameters but appeared mostly independent of disturbance history and canopy openness.

4.1. Correlations at the RENECOFOR spatial scale support the ecological relevance of indicator values, despite consistent overestimations

This study confirms the reliability of understory vegetation IVs in reflecting spatial variations in soil chemical parameters, especially soil pH H2O, pH CaCl2 and C/N ratio. Strong positive correlations between CSIs and measured soil parameters across the RENECOFOR network support the first hypothesis: understory IVs reliably reflect soil chemistry along the large spatial extent covered by the RENECOFOR network in France which encompasses a diverse range of macroclimatic contexts. These results are consistent with former studies using Ellenberg values (Schaffers *et al.*, 2000; Ewald, 2003; Carpenter & Goodenough, 2014) or EcoPlant IVs (Gégout *et al.*, 2005, 2008; Riofrío-Dillon, 2012, 2013).

These previous assessments, which focused on topsoil parameters (0–10 cm to 0–15 cm depth), suggest that understory vegetation is a reliable indicator of topsoil properties, as root systems are concentrated in the upper 0–15 cm of soil (Hendrick & Pregitzer, 1996). The observed decline in correlation with depth in this study is consistent with this premise. A key finding, however, is that correlations for pH H2O and C/N ratios remained strong even in deeper soil layers. This likely reflects that these two parameters vary less with depth within a given site than they do between sites, so that IVs still capture meaningful spatial variation beyond the topsoil.

Despite these significant correlations, mean comparison tests revealed that CSI values were significantly higher than measured soil values. These discrepancies are consistent with previous findings by Gégout (2008), who assessed the predictive reliability of IVs from the EcoPlant database estimating soil pH and C/N ratio at a national scale. His study reported average deviations of 0.8 units for soil pH and 5 units for soil C/N ratio between empirically-measured and floristically inferred values. Thus, similar to Ellenberg IVs (Wamelink, 2002), EcoPlant IVs cannot entirely replace direct soil measurements. Nonetheless, at the spatial extent of the RENECOFOR permanent monitoring network, which encompasses a wide range of climatic conditions, the understory vegetation reliably reflects variations in soil pH (both H2O and CaCl2) as well as in the C/N ratio

Beyond these observations, our study provides the first assessment of the reliability of CSI for extractable phosphorus. The EcoPlant CSI for extractable phosphorus showed moderate reliability in the upper soil horizon during the first sampling period, but declined during the second, with values significantly higher than measured extractable phosphorus concentrations in both periods. This reduced reliability may partly result from the inherent difficulties in measuring extractable phosphorus.

Phosphorus occurs in soil as PO_4^-, PO_4^{2-} or PO_4^{3-} ions, adsorbed onto soil colloids due to their attraction to positively charged iron and aluminium hydroxides, calcium carbonate particles, or indirectly to calcium, iron, or aluminium ions bound to negatively charged clay surfaces. Assimilable phosphorus moves between these compartments via the soil solution (Bonneau *et al.*, 2003). The Duchaufour extraction method, used in the EcoPlant database for non-calcareous soils, involves two successive extractions, one in acidic and one in alkaline conditions, allowing the recovery of phosphorus bound to calcium (on clays and carbonates), phosphorus adsorbed onto aluminium hydroxides, and to a lesser extent, phosphorus retained by iron hydroxides (Bonneau *et al.*, 2003). In contrast, the Dyer method, used in the RENECOFOR network for non-calcareous soils to ensure consistency with ICP-Forests protocols, relies on a single extraction using a 2% citric acid solution (Dyer *et al.*, 1941). This method may underestimate available phosphorus in nutrient-poor soils, as it may not solubilize all forms of phosphorus bound to different soil constituents (Bonneau *et al.*, 2003). Moreover, the Duchaufour method appears to better reflect the ability of plants to access assimilable phosphorus in forest soils (Bonneau *et al.*, 2003). Since the vast majority of RENECOFOR plots are located on non-calcareous soils (pH $CaCl_2$ < 6.5), the observed discrepancy between extractable phosphorus values from EcoPlant and those measured on RENECOFOR plots likely originates from methodological differences. The EcoPlant IVs remains ecologically relevant, as it is based on a Duchaufour method that better reflects plant functioning in forests and that is strongly positively correlated with isotopic dilution techniques, which are considered the most accurate for measuring assimilable phosphorus (Achat *et al.*, 2016). It is therefore essential, when quantifying a key nutrient such as phosphorus, to adopt soil extraction methods that best reflect its biological availability to forest vegetation. Without this methodological consistency, comparisons between soil data and vegetation indicators risk being biased and misleading.

4.2. Mismatches between measured and inferred changes in soil conditions challenge the use of forest understory plant IVs for monitoring soil changes

The literature remains divided on the reliability of plant IVs for tracking soil chemical changes over time. While some studies have reported a strong similarity between floristically inferred and empirically measured changes in soil acidity or nutrient availability (Baeten *et al.*, 2009; Riofrío-Dillon *et al.*, 2013), others have highlighted substantial decoupling over time, particularly regarding trends in soil pH (Van Calster *et al.*, 2007; Dölle & Schmidt, 2009; Šebesta *et al.*, 2011). The results of our study align with the latter, as significant discrepancies were observed between temporal CSI

values and the corresponding temporal dynamics in soil chemical measurements, both through the lack of alignment between measured and bioindicated national trends (i.e., between $\gamma^{Measured}$ and $\gamma^{Bioindicated}$, *respectively*) and the absence of correlation between individual plot-level measured and bioindicated dynamics (i.e., between $\alpha^{Measured}$ and $\alpha^{Bioindicated}$, respectively). This decoupling between measured and inferred changes thereby directly contradicts the hypothesis of this study, which assumed a good match between both measured and inferred temporal dynamics.

Authors using vegetation indicator values to reflect environmental variations rely on the assumption that species respond without delay or lagging dynamics (i.e., dispersal and establishment lags) to environmental changes, thereby maintaining their ecological niche (ter Braak & Dame, 1989). However, several studies have shown that this response can be delayed. For instance, Bertrand *et al.* (2011, 2016) and Richard *et al.* (2021) reported a lagged response of understory species to climate warming, particularly to increases in annual mean temperature. This results in a "climatic debt," where the thermophilization of understory community occurs more slowly than the rise in macroclimatic temperatures. In light of such findings, the lack of similarity between the dynamics of measured soil parameters and those bioindicated by the understory vegetation (both at national and local scales, as described in the present study) may stem from differing lagged responses between aboveground and belowground compartments. In other words, plant communities might respond with a temporal delay to edaphic changes, but conversely, soil conditions could also evolve more slowly than vegetation composition, for example under the influence of long-term nitrogen deposition. This difference in lagging dynamics could explain the observed mismatch between vegetation-based indicators and measured soil changes over time.

However, it is necessary to put the magnitude of environmental changes and their ecological effects into perspective. Across the RENECOFOR network, mean annual temperature increased by 0.22 to 0.28°C per decade between 1995 and 2015—an increase substantial enough to drive ecological shifts such as the thermophilization of plant communities (Richard *et al.*, 2021). In contrast, changes in edaphic conditions, while statistically significant, appear far less pronounced. For example, the pH $CaCl_2$ measured in the 0–10 cm soil layer decreased only slightly, from 4.11 to 4.04 in 15 years. Similarly, pH H_2O marginally declined from 4.78 to 4.76 in the same layer. These shifts are considerably smaller than those reported by Baeten *et al.* (2009), who documented a 0.7-unit decrease in pH H_2O over 47 years in the top 0–15 cm soil layer, and a slight but significant decline in the understory community Ellenberg IV for soil acidity in the Meerdal forest, Belgium. In comparison, soil acidification trends observed within the RENECOFOR network appear too limited in magnitude to trigger a significant response from the understory vegetation. Furthermore, although the increase in the C/N ratio from 19.07 to 20.51 in the 0–10 cm soil layer represents the most pronounced edaphic change observed across RENECOFOR in this layer (Saenger *et al.*, 2024), this shift does not necessarily imply a significant alteration of soil trophic conditions. Indeed, the C/N ratio remains within the 15–25 range, a value typical of moder humus forms (Jabiol *et al.*, 2007), and thus does not indicate a marked trophic transition likely to trigger a strong floristic response. MacDonald *et al.*

(2002) suggest that the C/N ratio must exceed 25 units in forest soils for nitrogen availability to decline, significantly reducing the abundance of nitrophilous species. Comparable with those depicted across the RENECOFOR, increases in the C/N ratio have been observed during stand rotations in beech forests (Hedde *et al.*, 2008) and oak-hornbeam forests (Trap *et al.*, 2009), with changes of 1.5 and 1.9 units, respectively. In these silvicultural contexts, understory communities do not undergo significant species turnover but rather adjustments in the relative abundance of existing species (Aubert *et al.*, 2003, 2004; Archer *et al.*, 2007). In light of these findings, the absence of a floristic response to the C/N ratio increase or the soil pH decrease at RENECOFOR sites appears consistent, and suggests that the sensitivity of IVs to environmental change may be relatively low, meaning that the magnitude of variation in an environmental parameter required to produce a significant shift in IVs is higher than the soil changes observed so far in this network.

4.3. Factors influencing measured and bioindicated soil dynamics differ, explaining the mismatches

The difference between the weak pH shift measured in the RENECOFOR network and the significant decrease reported by Baeten *et al.* (2009) can be explained by two main factors. First, the temporal window: our study covers approximately 15 years of soil chemical analysis and 26 years of vegetation-inferred, much shorter than the 47 years analysed by Baeten *et al.* (2009), while forest soils acidify gradually over decades, notably due to litter accumulation (Knoepp *et al.*, 1994). Extending the survey over time could reveal plots that cross edaphic thresholds, prompting a shift toward acidophilous or more oligotrophic species. Second, the spatial scale: Baeten *et al.* (2009) studied a small set of plots in a relatively homogeneous forest, while RENECOFOR encompasses diverse edaphic conditions nationally, complicating the detection of a uniform trend. This heterogeneity justifies partitioning the network to better capture soil chemistry dynamics, as proposed by Saenger *et al.* (2024), who classified plots by trophic soil levels and showed that the most acidic sites experience the strongest acidification and greatest increases in C/N ratio.

Although we did not partition the network by trophic soil levels but analysed each site individually at the plot scale, our results are consistent with this pattern: the higher the baseline pH, the smaller the pH decrease; likewise, the higher the baseline C/N ratio, the greater the tendency to increase. Thus, edaphic dynamics measured in the 0–10 cm soil layer strongly depend on initial pH, C/N ratio, phosphorus concentration values, and stand age at the beginning of the monitoring. Marginal R^2 values (considering fixed effects only) explain about 20% of soil dynamics variation, which is substantial. However, these initial site characteristics have no significant effect on CSI dynamics, i.e., vegetation response. Therefore, baseline site properties increase the mismatch intensity by influencing soil dynamics without affecting vegetation.

Understory CSI dynamics are mainly influenced by cumulative anthropogenic disturbances (thinning, cleaning, tree extraction) and canopy openness, bioindicated by increases in CLI values. These disturbances correlate with decreased bioindicated phosphorus dynamics and increased

bioindicated C/N dynamics, contrary to literature suggesting canopy openings reduce soil carbon content and increase nutrient availability (Tong *et al.*, 2024), which would favor species with low soil C/N index and high extractable phosphorus index. This highlights that understory vegetation and soil compartments respond to different drivers: vegetation reacts directly to environmental disturbances, whereas soil dynamics depend more on initial site conditions.

Ultimately, only baseline extractable phosphorus concentration similarly affects both measured and bioindicated dynamics, thus not contributing to the mismatch. However, given challenges in accurately measuring soil phosphorus, the weak spatial correlation between measured and bioindicated values, and the lack of correlation in their temporal dynamics, this finding remains difficult to interpret.

5. CONCLUSION

This study provides a comprehensive assessment of the reliability of understory vegetation as a bioindicator of soil chemistry at both spatial and temporal scales in French forests. While synthetic indices (CSI) derived from vegetation exhibit strong correlations with soil chemical parameters at the spatial scale, they fail to accurately track temporal changes. At the national scale, vegetation-based dynamics do not reflect the long-term trends observed in directly measured soil properties. At the plot level, these discrepancies are even more pronounced, with no significant correlation between bioindicated and measured changes over time. These inconsistencies arise from distinct processes driving vegetation and soil dynamics, as well as the limited sensitivity of vegetation indices to the minor variations in soil parameters observed within the network. Therefore, although understory indicator values remain valuable tools for estimating spatial variation in soil properties, their use for monitoring temporal changes in edaphic conditions should be approached with caution.

To improve the sensitivity of bioindication, future approaches should move beyond mean ecological optima and instead consider species ecological thresholds, the environmental limits beyond which species appear or disappear from communities. Such threshold-based metrics could better capture early or subtle ecosystem changes. Long-term forest monitoring would also benefit from consistent soil analysis methods and the development of indicators tailored to temporal responsiveness, while accounting for forest structural attributes that influence vegetation–soil coupling. These improvements will strengthen our ability to detect, understand, and anticipate ecological change in temperate forests.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge all the people who participated in the RENECOFOR network since the onset of the monitoring programme, especially those who contributed to setting up and maintaining the permanent plots or to data collection. Many thanks to: A. Aidoud, F. Archaux, V. Badeau, S. Barbier, P. Behr, A. Bernard, A. Blanc, J. Bodin, J-M Boissier, F. Bonne, L. Bourjot, A. Brêthes, S. Chauchard, A. Chevalier, R. Chevalier, P. Coquillard, G. Corriol, S. Daviller, J-F. Dobremez, Y. Dumas, G. Dumé, F. Elie, F. Elie, M. Forêt, F. Forgeard, M. Gallet, C. Gauberville, F. Gérémia, J. Gueugnot, P. Heuzé, S. Huet, C. Kieffer, X. Lassudrie-Duchêne, M. Legay, M. Lembke, L. Malzieu, S. Malécot, V. Malécot, P. Margerie, H. Martin, L. Malzieu, N. Metral, W. Mirlyaz, P. Montpied, E. Pares, T. Paul, J-F. Picard, E. Quibel, P. Raimbault, F. Richard, D. Rittié, V. Rousselet, P. Saliou, J-M. Savoie, R. Schipfer, A. Schmitt, L. Seytre, J. Timbal, J. Touffet, M. Trémolières, , E. Thirion and A. Weitner for their invaluable contribution to the floristic surveys of the RENECOFOR network since 1995. We would like to thank the University of Rouen Normandy for Robinson Ribémont's PhD grant and the French National Forest Office (ONF) for financial support for this study and for the management of the RENECOFOR network.

Chapter 2

From dark to clear: dark diversity improves the temporal and spatial bioindication of edaphic conditions in French ICP Forests

Authors

Robinson Ribémont[1], Simon Chollet[2], Manuel Nicolas[3], Estelle Langlois[1] & Michael Aubert[1]

Authors' affiliations

[1] ECODIV USC INRAE 1499, Université de Rouen Normandie, France

[2] ECOBIO UMR 6553 UR-CNRS, Rennes, France

[3] Office National des Forêts, Département RDI, Fontainebleau, France

Abstract

Reliable bioindication requires that understory plant communities accurately reflect local soil conditions. However, observed vegetation often responds slowly to environmental change: many species persist despite being maladapted to new conditions, while others remain absent even though they are ecologically suitable. This creates a mismatch between vegetation-based indicators and actual soil properties. To address this limitation, we integrated the concept of dark diversity—the set of species absent from a site but potentially able to occur there based on ecological suitability—into forest bioindication frameworks. The aim was to improve the reliability of soil fertility bioindication by accounting for species absences that are ecologically meaningful but result from stochastic or historical constraints.

We used floristic surveys and topsoil measurements from 99 permanent plots of the French long-term forest monitoring network RENECOFOR (ICP Forests), covering the period 1995–2015. Dark diversity was estimated using a probabilistic hypergeometric co-occurrence method, allowing us to define two complementary assemblages: (i) the dark diversity itself and (ii) the site-specific species pool, formed by the union of observed and dark diversity. For each assemblage, we computed community-weighted C/N indicator values and modelled their spatial and temporal dynamics, comparing them with measured soil C/N ratios. In addition, species turnover analyses between 1995 and 2015 distinguished persistent species from those gained or lost within and between assemblages.

Results show that incorporating dark diversity and site-specific species pools significantly improves bioindication accuracy across both spatial and temporal scales. Notably, dark diversity successfully captured the marked increase in soil C/N ratio over the two decades, while observed vegetation alone suggested stability. Turnover analyses revealed that changes in indicator values were primarily driven by exchanges between observed and dark diversity, rather than by net species gains or losses within the total pool.

Overall, these findings demonstrate that combining dark diversity with turnover-based analysis provides a robust framework for restoring coherence between vegetation-based indicators and measured soil properties, thereby enhancing the monitoring and interpretation of long-term ecological change in forest ecosystems.

I. INTRODUCTION

Over the past decades, global change drivers have strongly reshaped temperate forest ecosystems. Atmospheric nitrogen deposition peaked in Europe and North America during the 1980s and 1990s and has since remained, despite reductions, at levels high enough to influence soil nutrient dynamics and plant communities (Wang *et al.*, 2022). In contrast, sulfur deposition has markedly decreased over the last twenty to thirty years, partially alleviating soil acidification (Karlsson *et al.*, 2023). Together with ongoing climate warming, these trends have modified forest soil chemistry and nutrient cycling, including base saturation, acid–base buffering, and nutrient availability (de Vries *et al.*, 2014, 2019). Such changes cascaded to forest biodiversity and ecosystem functioning. For example, plant species richness declined in eastern North America (Gilliam and Roberts, 2003; Gilliam, 2007) and oligotrophic and acidophilic plant specialists became less frequent in Germany as soils became richer in nutrients (Bernhardt-Römermann *et al.*, 2015). In France, rather than shifting northward in response to climate change, understory species more often moved westward or eastward, following spatial patterns of nitrogen deposition (Sanczuk *et al.*, 2024).

Given the sensitivity of understory vegetation to local soil conditions, bioindication, which uses species ecological affinities to infer environmental conditions, provides a powerful tool to assess forest ecosystem changes (Diekmann, 2003). Shifts in species composition and abundance offer indirect but valuable insights into site conditions and their temporal dynamics (Thimonier *et al.*, 1994; Bertrand *et al.*, 2011; Richard *et al.*, 2021). Plant bioindication relies on Indicator Values, which assign species numerical scores reflecting preferences along environmental gradients such as soil pH, nutrient availability, or light. Originally developed by Ellenberg (1973) for Central European vegetation and later adapted to regional floras, IV systems such as CATMINAT (Julve, 1998) and EcoPlant (Gégout, 2005) now provide robust, calibrated references for metropolitan French forests.

Despite their widespread use, few studies have tested the consistency of IVs with measured environmental changes across broad spatial and temporal scales. Existing evaluations often reveal discrepancies between IVs and measured dynamics, challenging their reliability for tracking environmental trends. Analyses from the French ICP Forests Level II network (also known as RENECOFOR), which combines long-term data from 102 permanent plots on soil chemistry, foliar nutrients, meteorology, and understory composition, highlight such inconsistencies. Richard *et al.* (2021) found that community-based temperature indicators responded three times more slowly than actual warming, while Ribémont *et al.* (2025, in prep.) observed no correlation in topsoil carbon to nitrogen ratios and vegetation-based nutrient indicators during the last 30 years. In the latter case, the understory community indicated a stable edaphic C/N ratio despite a marked increase (from 19 to 20.5) in topsoil C/N between 1993 and 2012 (Saenger *et al.*, 2024). These results suggest that plant communities may not fully reflect current environmental conditions in real time, raising concerns about the temporal reliability of IVs.

Delayed responses of plant communities to environmental changes are well documented (Bertrand *et al.*, 2016; Talluto *et al.*, 2017; Alexander *et al.*, 2018). Shifts in community composition

require time for species to disappear or establish, giving rise to the concepts of extinction debt and colonization credit (Jackson and Sax, 2010). Species corresponding to extinction debt persist locally despite unsuitable conditions, with extinction delayed by the survival of existing individuals (Hishe *et al.*, 2022). Species corresponding to colonization credit are absent but could establish if conditions improve, with arrival limited by dispersal constraints, landscape fragmentation (Tilman *et al.*, 1994) or local physical conditions. These processes may explain why change in community composition is often delayed relative to environmental changes.

As a result, species present at a given time may not fully represent current site conditions. Some species persist despite changing environments, while others suited to the site have yet to arrive. This mismatch has led scientists to consider not only observed species but also those absent yet environmentally suitable. Pärtel *et al.* (2011) formalized this as dark diversity, defined as the set of regional species absent from a site but capable of surviving under its abiotic and biotic conditions. Species in the dark diversity pool belong to the regional species pool, which reflects the biogeographical and historical assembly of the community (Keddy *et al.*, 1992; Lortie *et al.*, 2004). These species possess the traits necessary to establish under the abiotic and biotic conditions of a given site but may be locally absent due to dispersal limitations or stochastic disturbances. Most studies on dark diversity have focused on species richness (Ronk *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2016; Pärtel *et al.*, 2025) or functional traits (Miličić *et al.*, 2020; Morel *et al.*, 2022; Trindade *et al.*, 2021), but its application to plant bioindication remains largely unexplored. Despite their absence, species from dark diversity are environmentally suitable, and their indicator values could provide valuable insights into a site's ecological state. Thus, including species from the extinction debt and colonization credit into species turnover studies may help explain lags between vegetation-inferred and measured soil condition changes and capture a more complete ecological signal.

Trindade *et al.* (2020) proposed a method to decompose species turnover between the regional species pool, defined as the set of species occurring in a region that can potentially inhabit a site under suitable local conditions (Zobel *et al.*, 2016), and the observed species composition of a site, by introducing the site-specific species pool (SSP). The SSP includes all species from the regional pool that are environmentally suitable at a site, whether present or absent. By combining observed and dark diversities, the SSP thus provides a more complete representation of a site's species community. Conceptually similar to the habitat species pool of Beleya *et al.* (1999), the SSP specifically focuses on the ecological conditions of the inventory site.

When considering only the regional pool and the observed site diversity, species have four possible fates between two periods: remain present, remain absent, leave the site, or arrive on the site. This coarse view, however, does not distinguish whether a species disappears because it is no longer suited to local conditions or due to stochastic events, nor whether regional species have become suitable for the site but have not yet established. By incorporating the SSP, these dynamics can be interpreted more mechanistically. Species "paying" extinction debt are those shifting from the observed community to exclusion from the SSP, reflecting a loss of local suitability following

environmental changes. Conversely, species "taking" colonization credit are newly added to the SSP from the regional pool but still absent from the site, reflecting gains in suitability without yet establishing (Trindade *et al.*, 2020). Therefore, the indicator values of these species become relevant for detecting environmental changes.

Monitoring exchanges between observed and dark diversity also provides valuable insights. Because species in both pools are inherently suited to site ecological conditions, transfers from observed to dark diversity (and vice versa) likely reflect local disturbances or stochastic events (Trindade *et al.*, 2020). Analysing the indicator values of species switching between observed and dark diversities may therefore help explain why observed vegetation sometimes fails to capture edaphic changes.

Building on these frameworks, the present study aims at assessing the added value of incorporating dark diversity analysis into the long-term monitoring of forest soil changes bio-indicated by plant communities. We used floristic inventories and soil chemical data (C/N) acquired over the period 1993–2015 on the 102 permanent forest sites of the RENECOFOR monitoring program (French part of the European International Co-operative Programme on the Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests established in 1985 - ICP Forests, http://icp-forests.net). ICP Forests has tracked and monitored key indicators of forest ecosystem health using standardized data collection at different frequency levels, from continuous monitoring to decadal assessments.

We address three objectives: (i) to estimate dark diversity at the scale of the RENECOFOR, characterizing its species richness, composition and indicator values relative to soil C/N, and to compare these with observed diversity and soil properties in order to validate the ecological relevance of dark diversity for plant bioindication; (ii) to assess whether including dark diversity improves the coherence between vegetation-based indicator values and temporal changes in topsoil C/N ratios and (iii) to evaluate whether species turnover between the regional pool and the SSP and the species exchanges between observed and dark diversities explain temporal changes in indicator values.

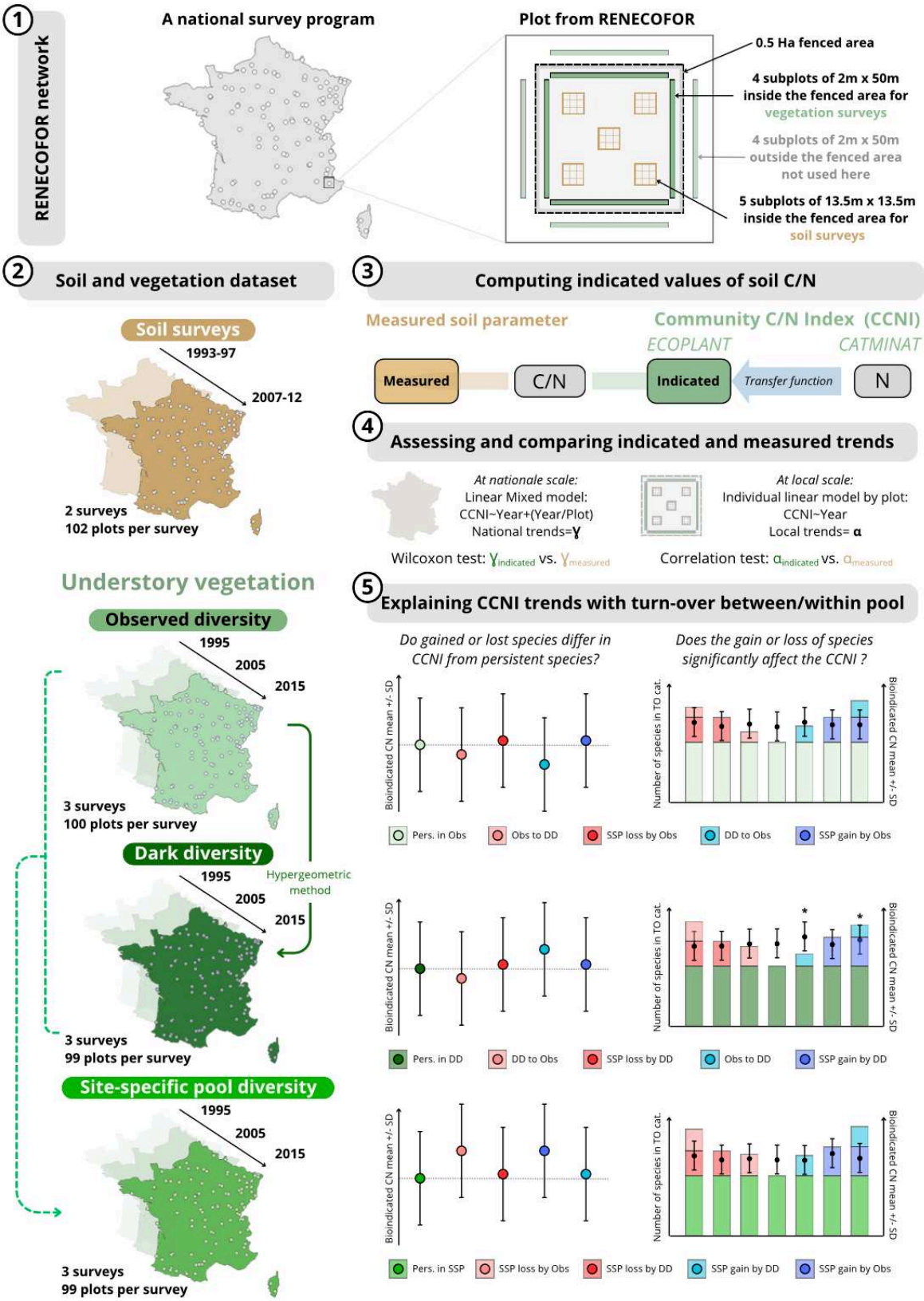


FIGURE 1 Study workflow overview.

This diagram illustrates the main steps of the study, starting with the RENECOFOR network map highlighting the forest plots monitored over two decades. Two types of datasets were collected: soil surveys (brown) and botanical surveys (green). Observed plant composition (light green) was used to estimate Dark diversity (dark green), and their combination defined the site-specific species pools (turquoise green). The Community C/N Index (CCNI) was calculated from species composition using the ECOPLANT and CATMINAT indicator value databases. Trends in CCNI were compared with measured trends in topsoil C/N ratios across the network, at both national and local scales. Finally, changes in CCNI over time were interpreted by categorizing species pools according to their turnover between 1995 and 2015, by (i) comparing the CCNI of turnover species with that of persistent species, and (ii) assessing how species gains and losses in each pool contributed to CCNI trends.

2. MATERIAL & METHODS

2.1. Study area and data collection

To address these objectives, we used floristic inventories and soil data collected between 1993 and 2015 across 102 forest sites in the French ICP Forests network. The RENECOFOR network established in 1992 by the French National Forest Office (ONF) within the ICP Forests program, provides a unique long-term monitoring framework across metropolitan France. It consists of 102 permanent 2-hectares plots representing a wide variety of temperate French forest types within mature, even-aged stands (Ulrich, 1995; Nicolas *et al.*, 2014; Boulanger *et al.*, 2018). To eliminate browsing pressure from large herbivores, a 0.5-hectare fenced core area is installed inside each 2 hectares plot (**FIGURE 1.1**).

Understory vegetation surveys followed a standardized protocol conducted every five years between 1995 and 2015 (Archaux *et al.*, 2006, 2009). Four permanent 2 × 50 m subplots within the fenced area recorded presence/absence data of all vascular plants up to 2 m in height, including herbaceous and low shrub layers. Survey effort varied somewhat due to storm-related access constraints: for example, only 87 plots were surveyed in 2000 after storms Lothar and Martin (1999), and 48 in 2010 following following budget restrictions; other years generally included about 100 plots (**FIGURE 1.1**).

To ensure data consistency and reliability for estimating dark diversity, our analyses focus on three key surveys conducted in 1995, 2005, and 2015. Each survey includes 100 plots, resulting in a total of 300 plot observations across the three years, and together these surveys encompass 857 vascular plant species, providing a robust dataset for assessing long-term understory vegetation dynamics in relation to environmental changes (**FIGURE 1.2**).

Mineral soil sampling (0–10 cm layer) was conducted during two campaigns (1993–1997 and 2007–2012). Within the fenced core of each of the 100 plots, five systematically spaced subplots were established on a 4.5 × 4.5 m grid to ensure representative sampling while avoiding disturbance artefacts such as skidder tracks or logging residues (Saenger *et al.*, 2024, **FIGURE 1.1**). Composite samples were analysed for chemical properties, with this study focusing on the carbon-to-nitrogen (C/N) ratio derived from organic carbon and total nitrogen concentrations measured by dry combustion after decarbonation (**FIGURE 1.3**).

2.2. Constructing regional pool, site-specific species pool and dark diversity

Dark diversity was estimated for each RENECOFOR plot and survey year using the hypergeometric method, which infers species suitability from co-occurrence patterns (Carmona *et al.*, 2019). For a given year, a species absent from a plot is included in its dark diversity if it frequently co-occurred with species present in that plot across the dataset. Compared to other co-occurrence approaches such as the Beals index or Favorability correction (Beals, 1984; Lewis *et al.*, 2016), the hypergeometric method provides improved accuracy and precision (Carmona *et al.*, 2019).

To strengthen co-occurrence estimates, we relied on an independent dataset of 45,377 floristic surveys from the French National Forest Inventory covering the same period as RENECOFOR monitoring. While large-scale datasets increase statistical power, they may overestimate dark diversity by including species not typical of local biogeographical contexts (Chollet *et al.*, 2025). To address this, co-occurrence matrices were computed separately for each of the 47 forest ecological regions *i.e.* spatial units defined as areas whose homogeneous environmental conditions shape forest species composition (IGN, https://inventaire-forestier.ign.fr). Each ecological region's matrix incorporated between 857 and 2,000 surveys, ensuring that dark diversity estimates reflected ecologically relevant, localized species pools. In this context, each forest ecological region effectively represents the regional species pool for the RENECOFOR plots located within it.

Species probabilities of belonging to the dark diversity were estimated using the DarkDiv R package with the hypergeometric method (Carmona *et al.*, 2019). For each species absent from a site, this method compares the observed number of co-occurrences with the number expected under a random distribution, that is, in the absence of species associations. Probabilities are derived from the hypergeometric probability mass function, which quantifies the likelihood that an absent species co-occurs a given number of times with the species observed in the region (Carmona *et al.*, 2019). Following previous studies to link a species to the dark diversity pool, we tested probability thresholds ranging from 0.85 to 0.90 according to those of Trindade *et al.* (2023) and Chollet *et al.* (2025). Absent species with probabilities above the selected threshold were considered part of the dark diversity, whereas those below were excluded. Lower thresholds (e.g., 0.5) tend to capture noise, including rare species or species from transitional habitats, whereas higher thresholds indicate stronger, non-random associations between observed and absent species (Carmona *et al.*, 2019).

We ultimately selected a conservative threshold of 0.87, which limited plots without any dark diversity to just 1% of the dataset (**FIGURE S1**). Among the 100 RENECOFOR sites, 99 plots contained dark diversity, and all subsequent analyses therefore focused on these 99 plots. Consequently, the number of available plots was reduced to 99 for both soil data (initially 102) and vegetation data (initially 100).

For each plot and survey year, the site-specific species pool (SSP) was defined by combining the observed species (Obs) with those inferred to belong to the dark diversity (DD) (**FIGURE 1.2**).

Thus, for each of the 99 RENECOFOR plots and three survey years, species diversity can be described using four nested conceptual pools. The regional species pool includes all species occurring within the forest ecological region of the plot, representing those that could potentially inhabit the site under suitable environmental conditions. Within this regional pool, the site-specific species pool (SSP) comprises species environmentally suitable for the plot, including both those observed (Obs) and those expected but absent (DD). The observed diversity (Obs) corresponds to species recorded at the plot during a given survey year, whereas the dark diversity (DD) includes species absent from the plot but predicted to occur there based on regional co-occurrence patterns.

2.3. Investigating species turnover within and between the different pools: observed species, dark diversity, site-specific species pool

To investigate species turnover in understory communities over the RENECOFOR floristic inventory period, we focused on the first and last available surveys, that is, between 1995 and 2015. For each site, we examined species turnover through the lens of three conceptual community pools: (i) observed diversity (Obs; species recorded during a given year in given plot), (ii) dark diversity (DD; species expected yet absent in given year from a given plot), and (iii) the site-specific species pool (SSP; the union of observed and dark diversity in given year in given plot, **FIGURE 2A**).

We assigned each species to one of nine turnover categories based on its presence or absence in 1995 and 2015 (**FIGURES 2A–B**). These categories include species that persisted in the observed diversity (Pers. in Obs), remained consistently in the dark diversity (Pers. in DD), or shifted between these two pools, either from observed to dark diversity (Obs to DD) or from dark to observed diversity (DD to Obs). Additional categories reflect species losses from the site-specific species pool (SSP), either through the observed diversity, representing species "paying extinction debt" (SSP loss by Obs), or through the dark diversity (SSP loss by DD). Species gains into the SSP are described similarly, either through the observed diversity (SSP gain by Obs) or through the dark diversity, representing species "taking colonization credit" (SSP gain by DD). Finally, a ninth category groups species that remained within the SSP across both surveys, whether persisting in observed (Pers. in Obs) or dark diversities (Pers. in DD) or shifting between them (Pers. in SSP).

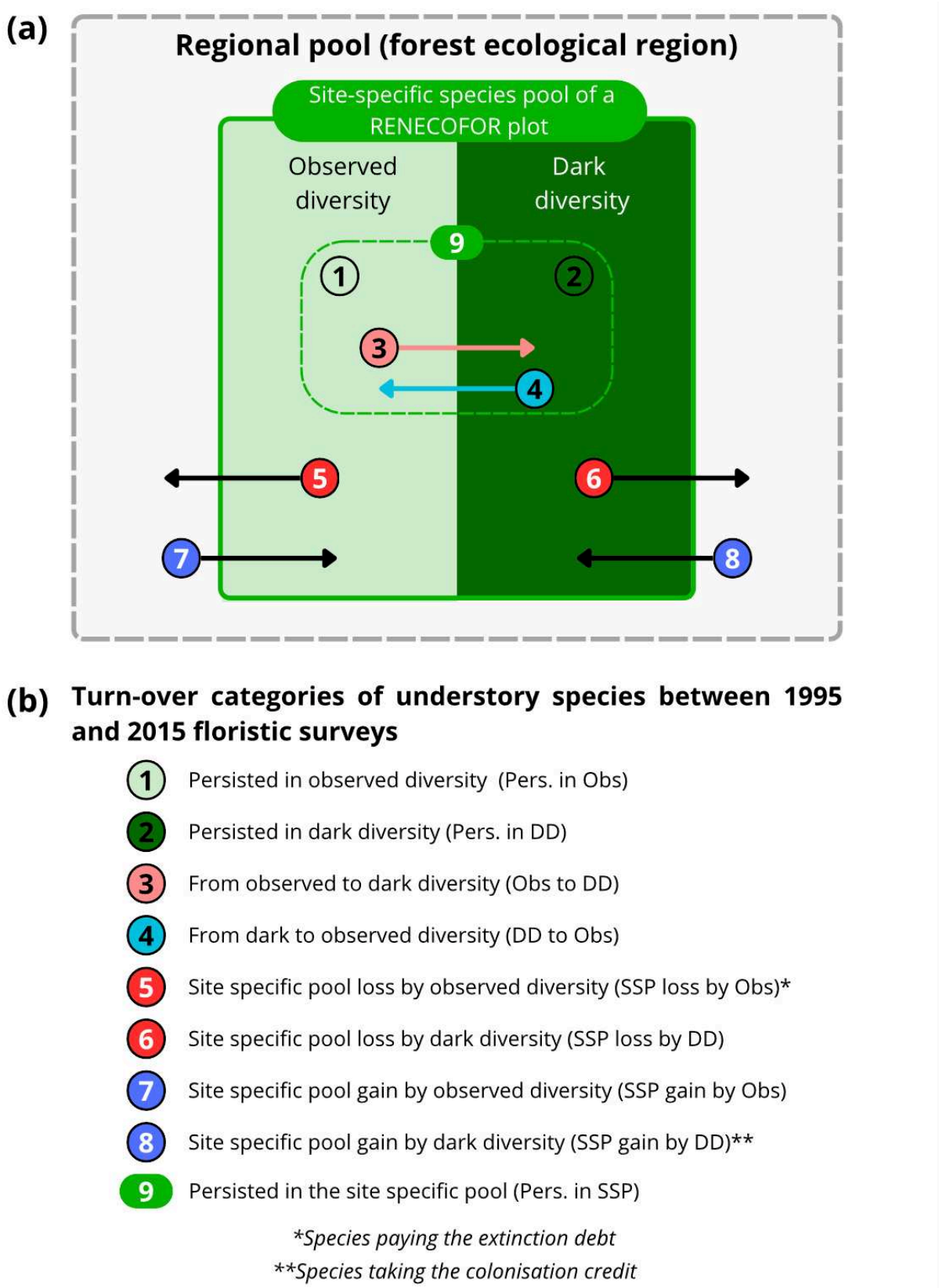


FIGURE 2 Schematic representation of species turnover between and within three conceptual species pools from 1995 to 2015: observed diversity, dark diversity and site-specific species pool.

(a) Diagram illustrating the three conceptual pools: observed diversity (light green), dark diversity (dark green), and their combination, referred to as the site-specific pool at the plot scale (medium green). Species are represented by circles sized according to their abundance. Arrows indicate turnover from 1995 to 2015, pointing from each species' origin pool in 1995 to its destination pool in 2015. The external pool corresponds to the species pool of the forest ecological region to which the plot belongs. (b) Legend presenting the nine turnover categories, with their abbreviations in parentheses.

2.4. Computing the understory community C/N Index

To estimate topsoil (0–10 cm) C/N ratios from species assemblages, the Community C/N Index (CCNI) was calculated for each subplot survey j (**FIGURE 1.1**) by averaging the species-specific C/N indicator values (**FIGURE 1.3**) of all present understory species i, conditional on having at least two species ($S_j \geq 2$):

$$CCNI_j = \frac{\sum_{i=1}^{S_j} CN_{indicated}\, Sp_i}{S_j}$$

Presence/absence data were used to ensure that all species, either rare or common, contributed equally to the calculation. This approach aligns with the binary structure of the dark diversity dataset, which records species only as present or absent of this species pool. CCNI values were computed for each plot and each vegetation monitoring year across the three RENECOFOR campaigns (1995, 2005, 2015), and separately for the three community pools (observed diversity, dark diversity, and the site-specific species pool). In addition, within each plot, CCNI values were calculated for each of the nine turnover categories defined in the previous section.

Initially, CCNI values were computed using nutrient indicator values from CATMINAT (Julve, 1998), which assigns species nutrient preferences on an ordinal scale from 1 (hyper-oligotrophic) to 9 (polytrophic). Although CATMINAT covers a broad range of species, its ordinal soil nutrient IVs prevent direct comparison with measured soil values. In contrast, EcoPlant (Gégout *et al.*, 2005) provides quantitative soil C/N indicator values that are directly comparable to measured soil parameters, although its species coverage is narrower. To reconcile these differences, we developed a transfer function using a Generalized Additive Mixed Model (GAMM), allowing CATMINAT-derived CCNI values to be converted into EcoPlant-equivalent CCNI. The model was calibrated using an independent dataset of 45,377 floristic surveys from the French National Forest Inventory and explained 74.8% of the deviance in measured soil C/N ratios. This approach thus combines the taxonomic breadth of CATMINAT with the quantitative precision of EcoPlant, enabling reliable community-level bioindication of soil C/N ratios (**FIGURE 1.3**; cf. Richard *et al.*, 2021; Lenoir *et al.*, 2013).

2.5. Statistical analysis

2.5.1 Estimating and characterizing dark diversity in the RENECOFOR network

Mean species richness and standard deviations at the national scale were obtained by averaging species richness across all RENECOFOR plots for each of the three conceptual species pools (observed diversity, dark diversity, and site-specific species pool), separately for 1995 and 2015. These calculations were also performed for each turnover category to describe temporal changes in species richness. Paired Wilcoxon signed-rank tests were then used to assess differences in species richness

between observed and dark diversity within each pool and turnover category, accounting for the non-normal distribution of paired site data. When appropriate, the same test was applied to evaluate significant differences in species richness between years or between categories.

To characterize the composition of observed and dark diversity, we focused on the ten most frequent species across the RENECOFOR network for 1995 and 2015. Selecting ten species, though arbitrary, highlights the most common species while providing a concise overview of community composition. The same analysis was applied to each turnover category to identify species most frequently gained, lost, or persisting over time.

2.5.2 Assessing the spatial coherence between vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity

Prior to using Dark Diversity to assess temporal changes in soil, we first tested its reliability for inferring edaphic C/N at RENECOFOR spatial scale. National means of the Community C/N Index (CCNI) for each species pool (observed diversity, dark diversity, and SSP) were compared with the mean topsoil C/N ratio across all plots for 1995 and 2015 separately. We used pairwise Wilcoxon signed-rank tests to assess significant differences among these values within each year. This non-parametric test was chosen because of the non-normal distribution and paired structure of the site-level data. This approach enabled us to determine whether dark diversity, like observed diversity, provides a bioindication signal consistent with measured soil nitrogen status at the national scale.

2.5.3 Assessing the temporal coherence between vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity

To determine temporal dynamics of the Community C/N Index (CCNI) for each species pool between 1995 and 2015, analyses were conducted at two spatial scales: national and local (plot). Applied separately to observed and dark diversities and site-specific pools, this two-scale strategy integrates broad patterns with local heterogeneity, capturing both overall trends and fine-scale vegetation–soil concordance that would otherwise be masked by global averages. At the national scale, linear mixed-effects models (LMMs) were fitted with CCNI as the response variable, separately for observed and dark diversities and site-specific pools. The variable "Year" (floristic survey date: 1995, 2005, 2015) was included as a fixed effect, standardizing the temporal dimension across surveys and enabling direct comparison of trends between measured and bioindicated soil C/N. Plot identity was included as a random effect to account for spatial structure and repeated measurements. This hierarchical structure enabled the estimation of temporal trends in CCNI by extracting the coefficient associated with "year" from each model hereafter referred to as $y^{bioindicated}$, and comparing it with temporal trends in topsoil C/N, noted $y^{measured}$ (**FIGURE 1.4**).

Prior to model fitting, residuals were visually inspected to verify the assumptions of normality and homoscedasticity. Models were fitted using restricted maximum likelihood (REML), and the

significance of the year effect was tested using Wald tests with Satterthwaite's approximation for degrees of freedom.

At the local scale, temporal trends in CCNI were estimated separately for each species pool by fitting, for each plot, individual linear regressions of CCNI against the variable "year" (floristic survey date: 1995, 2005, 2015). This yielded slope coefficients $\alpha^{bioindicated}$ describing plot-specific temporal dynamics, which were then compared to local trends in topsoil C/N, $\alpha^{measured}$. This plot-level approach complements the national-scale mixed models by capturing site-specific temporal variation that may be obscured by broader-scale averaging (**FIGURE 1.4**).

The average $\alpha^{bioindicated}$ and $\alpha^{measured}$ cross plots were then compared using paired Wilcoxon signed-rank tests, applied separately for each species pool. At the plot scale, Spearman rank correlations were used to assess concordance between $\alpha^{bioindicated}$ and $\alpha^{measured}$ for each pool. These non-parametric tests were chosen due to the paired structure of the data and deviations from normality, allowing detection of synchrony or divergence in nutrient-related community dynamics across sites (**FIGURE 1.4**).

2.5.4 Analysing species turnover among biodiversity pools and its impact on indicator value dynamics

To test whether turnover dynamics reflected an increase in soil C/N ratios, we compared the Community C/N Index (CCNI) values of persistent species between 1995 and 2015 with those of species gained or lost within each pool (Obs, DD, SSP) for each plot. Specifically, we assessed whether newly gained species had higher CCNI values than persistent species and whether lost species had lower values. Pairwise Wilcoxon signed-rank tests were applied, as CCNI values were not normally distributed and data were paired within sites. This approach allowed us to evaluate whether species turnover indicated a shift toward higher soil C/N ratios across all pools (**FIGURE 1.5**).

To better understand which components of species turnover drive changes in community capacity to bioindicate edaphic C/N variation, we examined how species gains and losses influenced CCNI at the plot level between 1995 and 2015. For each pool, we calculated average CCNI values across plots for seven configurations designed to isolate the contributions of persistence, species losses, and species gains to temporal changes in CCNI. **TABLE 1** summarizes the turnover categories included in each configuration for observed diversity (Obs), dark diversity (DD), and the site-specific species pool (SSP), along with the purpose of each configuration and guidance for interpretation.

Differences between configurations were assessed using paired Wilcoxon signed-rank tests across plots, accounting for the non-normal distribution of CCNI values and the paired structure of the data. Analyses were conducted separately for the three conceptual community pools. By combining these configurations with turnover categories, this approach identifies which species categories (persistent, lost, or gained) drive temporal changes in the community's ability to bioindicate soil C/N (**FIGURE 1.5**).

2.5.5 Statistical precision and used packages

The variance explained by each linear mixed-effects model (LMM) was quantified using the r.squared.GLMM function from the MuMIn package (v1.47.1; Barton, 2019). Both marginal R^2 (R^2m, representing variance explained by fixed effects) and conditional R^2 (R^2c, representing variance explained by fixed and random effects) were calculated following Nakagawa and Schielzeth (2013). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

All analyses were conducted in R version 4.2.2 (R Foundation for Statistical Computing, 2022). Models were fitted using the lme4 package (v1.1.31; Bates *et al.*, 2015) and the nlme package (v3.6.160; Pinheiro *et al.*, 2019). Data management and visualization relied on additional R packages, including ggplot2 (v3.4.2; Wickham *et al.*, 2016), dplyr (v1.1.2; Wickham *et al.*, 2014).

TABLE 1 Turnover class configurations for isolating the effects of species persistence, losses, and gains on CCNI in observed diversity, dark diversity, and the site-specific species pool.

The table summarizes the seven turnover configurations ($CCNI_1$–$CCNI_7$) used to assess how species persistence, losses, and gains contribute to temporal changes in CCNI. For each species pool (observed diversity, dark diversity, and site-specific species pool), the first column lists the turnover classes included in the CCNI calculation, and the second column explains the rationale or interpretation of each configuration.The colors used correspond to those shown in Figures 1, 5, 2, and 3.

	Observed diversity		Dark diversity		Site-specific species pool	
CCNI	*Turnover classes for Obs*	*Interpretation for Obs*	*Turnover classes for DD*	*Interpretation for DD*	*Turnover classes for SSP*	*Interpretation for SSP*
$CCNI_1$	Pers. in Obs + SSP loss by Obs + Obs to DD	Obs in 1995	Pers. in DD + SSP loss by DD + DD to Obs	DD in 1995	Pers. in SSP + SSP loss by DD + SSP loss by Obs	SSP in 1995
$CCNI_2$	Pers. in Obs + SSP loss by Obs	Isolate effect of Obs to DD	Pers. in DD + SSP loss by DD	Isolate effect of DD to Obs	Pers. in SSP + SSP loss by DD	Isolate effect of SSP loss by Obs
$CCNI_3$	Pers. in Obs + Obs to DD	Isolate effect of SSP loss by Obs	Pers. in DD + DD to Obs	Isolate effect of SSP loss by DD	Pers. in SSP + SSP loss by Obs	Isolate effect of SSP loss by DD
$CCNI_4$	Pers. in Obs	Overall effect of species loss from Obs	Pers. in DD	Overall effect of species loss from DD	Pers. in SSP	Overall effect of species loss from SSP
$CCNI_5$	Pers. in Obs + DD to Obs	Isolate effect of DD to Obs	Pers. in DD + Obs to DD	Isolate effect of Obs to DD	Pers. in SSP + SSP gain by DD	Isolate effect of SSP gain by DD
$CCNI_6$	Pers. in Obs + SSP gain by Obs	Isolate effect of SSP gain by Obs	Pers. in DD + SSP gain by DD	Isolate effect of SSP gain by DD	Pers. in SSP + SSP gain by Obs	Isolate effect of SSP gain by Obs
$CCNI_7$	Pers. in Obs + SSP gain by Obs + DD to Obs	Net effect of turnover in Obs, Obs in 2015	Pers. in DD + SSP gain by DD + Obs to DD	Net effect of turnover in DD, DD in 2015	Pers. in SSP + SSP gain by Obs + SSP gain by DD	Net effect of turnover in SSP, SSP in 2015

3. RESULTS

3.1. Estimating and characterizing dark and observed plant diversity in the RENECOFOR network

In 1995, the site-specific species pool (SSP) comprised on average 58.7 ± 36.3 understorey species (herbaceous and low-shrub), evenly split between observed diversity (28.6 ± 16.9) and dark diversity (30.1 ± 26.9; p = 0.334). By 2015, this balance had shifted significantly toward observed diversity, which became richer than dark diversity (33.1 ± 19.3 vs. 27.1 ± 25.2; p = 0.001; **TABLE 2**), with a total average richness of 60.2 ± 35.6 species. Species losses from the SSP between 1995 and 2015 (11.9 ± 8.86 species on average) were primarily from dark diversity (8.05 ± 7.60) rather than from observed diversity (4.84 ± 4.90; p = 0.002). Conversely, species gains in the SSP over the same period (13.4 ± 10.6 species) were sourced almost equally from observed diversity (8.03 ± 7.81) and dark diversity (6.95 ± 7.26; p = 0.182, **TABLE 2**).

Most species persisted in the SSP over time (47.4 ± 32.7 species). Persistent species were more abundant in the observed diversity (21.6 ± 12.3, approximately 75% of observed species in 1995) than in dark diversity (19.3 ± 20.7, approximately 64% of dark diversity species in 1995; p = 0.001), indicating greater temporal stability of the observed pool. Species turnover between pools remained limited: on average, 5.55 ± 5.49 species (18% of dark diversity species in 1995) transitioned from dark to observed diversity, while 3.72 ± 4.41 species (13% of observed species in 1995) shifted in the opposite direction (**TABLE 2**).

TABLE 2 Mean number of species and associated standard deviation for each species pool — observed diversity, dark diversity, and site-specific pool — in 1995 and 2015.

The table also reports the mean and standard deviation of species numbers within turnover categories (gains, losses, and persistent species). Mean comparisons between observed and dark diversity were assessed using a paired Wilcoxon signed-rank test.

	Site specific pool (n=99)	Observed diversity (n=99)	Dark diversity (n=99)	Wilcoxon comparison test Obs vs DD	
Pool by Year / Turn-Over categories	Mean number of species +/- SD			p value	Sig.
1995	58.7 ± 36.3	28.6 ± 16.9	30.1 ± 26.9	0.334	
2015	60.2 ± 35.6	33.1 ± 19.3	27.1 ± 25.2	0.001	***
SSP lost by	11.9 ± 8.86	4.84 ± 4.90	8.05 ± 7.60	0.002	**
SSP gained by	13.4 ± 10.6	8.03 ± 7.81	6.95 ± 7.26	0.182	
Persistent		21.6 ± 12.3	19.3 ± 20.7	0.001	***
DD to Obs	47.4 ± 32.7	5.55 ± 5.49			
Obs to DD		3.72 ± 4.41			

The balance between observed and dark diversity shifted over time in favour of the observed diversity. Species losses from the SSP were mainly drawn from dark diversity, and observed diversity was more stable than dark diversity, as reflected by its higher number of persistent species across the two dates. The ten most frequent species in each diversity pool and turnover category between 1995 and 2015 are listed in TABLE 3, providing a partial descriptive overview of species composition and turnover.

TABLE 3 List of the ten most represented species in the observed and dark diversity pools in 1995 and 2015, as well as in the turnover categories between these two dates.

Species are identified by their Latin names, and the number of occurrences within each group is indicated. This presentation highlights the dominant species contributing to each diversity pool and turnover category, illustrating species persistence, loss and gain dynamics over time.

Observed diversity in 1995	N	Observed diversity in 2015	N	Dark diversity in 1995	N	Dark diversity in 2015	N
Rubus fruticosus	75	*Rubus fruticosus*	85	*Teucrium scorodonia*	28	*Poa nemoralis*	28
Fagus sylvatica	69	*Fagus sylvatica*	76	*Hypericum pulchrum*	28	*Hypericum pulchrum*	27
Hedera helix	55	*Hedera helix*	64	*Fragaria vesca*	27	*Teucrium scorodonia*	25
Pteridium aquilinum	48	*Ilex aquifolium*	50	*Viola reichenbachiana*	26	*Veronica officinalis*	24
Deschampsia flexuosa	42	*Quercus petraea*	50	*Epilobium montanum*	26	*Stachys sylvatica*	23
Ilex aquifolium	41	*Dryopteris carthusiana*	49	*Mycelis muralis*	25	*Veronica chamaedrys*	23
Lonicera periclymenum	41	*Pteridium aquilinum*	48	*Veronica chamaedrys*	25	*Lysimachia nemorum*	22
Quercus petraea	41	*Lonicera periclymenum*	46	*Veronica officinalis*	24	*Stellaria holostea*	22
Carex pilulifera	40	*Carex pilulifera*	43	*Ajuga reptans*	24	*Mycelis muralis*	22
Carpinus betulus	35	*Athyrium filix-femina*	42	*Viola riviniana*	24	*Ajuga reptans*	22
Persistent in observed diversity	N	**Persistent in dark diversity**	N	**From observed to dark diversity**	N	**From dark to observed diversity**	N
Rubus fruticosus	73	*Teucrium scorodonia*	19	*Poa nemoralis*	8	*Mycelis muralis*	8
Fagus sylvatica	67	*Hypericum pulchrum*	19	*Urtica dioica*	8	*Viola reichenbachiana*	8
Hedera helix	54	*Poa nemoralis*	19	*Veronica officinalis*	7	*Prunus avium*	8
Pteridium aquilinum	45	*Stachys sylvatica*	18	*Mycelis muralis*	7	*Betula pendula*	8
Lonicera periclymenum	40	*Paris quadrifolia*	17	*Potentilla sterilis*	6	*Moehringia trinervia*	8
Deschampsia flexuosa	38	*Stellaria holostea*	16	*Veronica montana*	6	*Dryopteris carthusiana*	8
Ilex aquifolium	37	*Viola riviniana*	16	*Carex pilulifera*	6	*Fragaria vesca*	7
Quercus petraea	33	*Epilobium montanum*	16	*Fragaria vesca*	5	*Salix caprea*	7
Carpinus betulus	33	*Veronica chamaedrys*	16	*Carex sylvatica*	5	*Geum urbanum*	7
Sorbus aucuparia	31	*Lysimachia nemorum*	16	*Rubus idaeus*	5	*Dryopteris dilatata*	7
Site specific pool loss by observed diversity	N	**Site specific pool loss by dark diversity**	N	**Site specific pool gain by observed diversity**	N	**Site specific pool gain by dark diversity**	N
Cytisus scoparius	9	*Agrostis capillaris*	9	*Juncus effusus*	17	*Geranium robertianum*	8
Juncus effusus	9	*Deschampsia cespitosa*	9	*Quercus petraea*	15	*Juncus effusus*	6
Viola riviniana	9	*Fragaria vesca*	9	*Dryopteris carthusiana*	15	*Veronica chamaedrys*	6
Hypericum pulchrum	9	*Viola reichenbachiana*	7	*Quercus robur*	13	*Silene vulgaris*	6
Agrostis capillaris	9	*Holcus mollis*	7	*Agrostis capillaris*	11	*Prunella vulgaris*	6
Taraxacum officinale	9	*Tussilago farfara*	7	*Agrostis stolonifera*	10	*Galium odoratum*	6
Quercus petraea	8	*Ranunculus repens*	6	*Abies alba*	10	*Carex pallescens*	5
Luzula multiflora	8	*Teucrium scorodonia*	6	*Carex pallescens*	9	*Ilex aquifolium*	5
Epilobium angustifolium	7	*Epilobium montanum*	6	*Carex pilulifera*	9	*Holcus mollis*	5
Anthoxanthum odoratum	7	*Luzula pilosa*	6	*Salix caprea*	8	*Hypericum pulchrum*	5

When comparing the mean CCNI values of the observed diversity, dark diversity, and site-specific species pool to the measured topsoil C/N (TABLE 2), pairwise Wilcoxon signed-rank tests followed by post-hoc analyses revealed significant differences between groups. In 1995, the CCNI of the observed diversity (20.9 ± 5.08) was significantly higher than that of the dark diversity (18.4 ± 5.66), the SSP (19.6 ± 5.20), and the measured soil C/N (18.9 ± 5.29). Conversely, the CCNI of the dark diversity and the SSP did not differ significantly from the measured soil C/N, although the SSP showed a slightly higher value than the dark diversity (TABLE 4)

TABLE 4 Annual average values of the Community C/N Index (CCNI) and topsoil C/N ratios, along with comparisons between them and linear mixed model coefficients assessing their temporal dynamics from 1995 to 2015.

Annual average comparisons were assessed using a paired Wilcoxon signed-rank test, followed by a post hoc test for multiple comparisons between years. The table reports significance levels as well as marginal and conditional R^2 values, representing the proportion of variance explained by the fixed effect alone, and by both fixed and random effects, respectively. In models assessing the dynamics of indicator values, the fixed effect is time (the "Year" variable), and the random effect accounts for inter-plot variability (Plot ID). For models of measured soil parameters, the fixed and random effects are structured similarly.

Indicator Value	Vegetation type	N	Average CSI ± SD per year				Dynamic/year ± SD ɣ Indicated	p-value	Sig.	R^2m	R^2c
		Plot	*1995*	*Pairwise Wilcoxon test sign*	*2015*	*Pairwise Wilcoxon test sign*					
C/N_{indic}	Observed	99	20.9 ± 5.08	a	20.5 ± 4.87	a	-0.0119 ± 0.0094	0.205		$<10^{-3}$	0.93
	Dark diversity		18.4 ± 5.66	b	19.1 ± 6.06	b	0.0386 ± 0.0165	0.020	*	$<10^{-3}$	0.84
	Site-specific species pool		19.6 ± 5.20	c	19.9 ± 5.19	C	0.0132± 0.0102	0.197		$<10^{-3}$	0.92
Soil Layer	**Parameter**		**Average measured soil parameter ± SD per year**				**ɣ Measured**	$<10^{-3}$	***	0.01	0.88
			1993-1997	bc	*2007-2012*	bc					
0-10 cm	C/N		18.9 ± 5.29		19.9 ± 5.34		0.0964 ± 0.0090				

In 2015, the same pattern persisted: the CCNI estimated on the base of the observed diversity (20.5 ± 4.87) remained significantly higher than both the dark diversity (19.1 ± 6.06), the SSP (19.9 ± 5.19), and the measured soil C/N (19.9 ± 5.34). Again, the CCNI of the dark diversity and SSP were statistically similar to the soil C/N, with the SSP having a slightly higher value than the dark diversity (**TABLE 4**).

3.2. Assessing the coherence between temporal changes in vegetation indicator values and soil properties considering dark diversity and the two dates

According to linear mixed-effects models (LMMs), the CCNI derived from observed species remained stable over time, showing a slight, non-significant decreasing trend (−0.119 ± 0.094 per decade, $p = 0.205$; $R^2m < 0.001$; $R^2m = 0.93$), with mean values declining from 20.9 ± 5.12 in 1995 to 20.7 ± 4.90 in 2015. The trend diverged from the increasing pattern observed in measured topsoil C/N (**TABLE 4**).

In contrast, the CCNI based on dark diversity increased significantly over the study period (+0.386 ± 0.165 per decade, $p = 0.020$; $R^2m > 0.001$; $R^2c = 0.84$), with mean values rising from 18.4 ± 5.63 in 1995 to 19.1 ± 6.05 in 2015. These dynamics closely mirrored the significant increase in measured topsoil C/N (+0.964 ± 0.090 per decade, $p < 0.001$; $R^2m = 0.01$; $R^2c = 0.88$), suggesting a coherent signal between soil conditions and the vegetation-based indicator relying on dark diversity (**TABLE 4**).

The CCNI calculated from the site-specific species pool also exhibited no significant trend over time, with a slight positive slope (0.132 ± 0.102 per decade, p = 0.197; $R^2m < 0.001$; $R^2c = 0.92$), and mean values increasing from 19.7 ± 5.62 to 19.9 ± 5.19. Although statistically stable, the CCNI values derived from this pool were closer to those of the dark diversity pool, and its temporal trend appeared more consistent with the increase observed in measured topsoil C/N than the trend based on observed species (**TABLE 4**).

TABLE 5 Summary of comparisons between the national-scale dynamics of measured and indicated soil C/N ratios.

The table includes (i) mean comparisons between trends in measured and indicated soil C/N at national scale, along with their significance levels; (ii) Pearson's correlation coefficients assessing the relationship between measured and indicated soil C/N trends at the plot scale.

Soil Layer (n=99)	Vegetation type (n=99)	Paired Wilcoxon's test α Measured v. α Bioindicated		Pearson's correlation α Measured v. α Bioindicated		
		p-value	*Sign.*	*Rho*	*p-value*	*Sig.*
0-10cm	Observed	$<10^{-3}$	***	-0,027	0,790	
	Dark diversity	$<10^{-3}$	***	0.195	0.051	*
	Site-specific species pool	$<10^{-3}$	***	0.175	0.081	.

Despite the apparent coherence between the CCNI national trend based on dark diversity ($\gamma^{bioindicated}$) and the measured C/N trend ($\gamma^{measured}$), Wilcoxon signed-rank tests revealed that the average of CCNI site-level trends ($\alpha^{bioindicated}$) differed significantly from the average of CCNI site-level trends in measured topsoil C/N ($\alpha^{measured}$) for all three species pools ($p < 0.001$, **TABLE 5**).

However, Pearson correlation analyses revealed a significant positive relationship between site-level CCNI trends based on dark diversity ($\alpha^{bioindicated}$) and site-level trends in measured topsoil C/N ($\alpha^{measured}$) (rho = 0.195, p = 0.051). No such relationship was found for the observed diversity pool (rho = −0.027, p = 0.790), while a weak and non-significant positive correlation was detected for the site-specific species pool (rho = 0.175, p = 0.081, **TABLE 5**).

3.3. Analysing plant species turnover among species diversity pools and its impact on indicator value dynamics

When assessing whether CCNI differed between persistent species in the observed diversity and those involved in turnover, Wilcoxon tests showed that only species gained from the dark diversity had significantly lower CCNI values (CCNI of "DD to Obs" = 18.2 ± 5.99) compared to persistent species (CCNI of "Pers. in Obs" = 21.0 ± 5.25, p = 0.001). By contrast, species lost to the dark diversity ("Obs to DD"), gained from outside the site-specific pool ("SSP gain by Obs"), or lost from it ("SSP loss by Obs" i.e species paying the extinction debt) did not differ significantly from persistent species (all p > 0.05, **FIGURE 3A**).

When investigating which turnover categories contributed to changes in the CCNI of observed diversity between 1995 and 2015, Wilcoxon comparisons revealed no significant differences between the 1995 baseline ($CCNI_1$: Pers. in Obs + Obs to DD + SSP loss by Obs) and most alternative compositions for 2015 ($CCNI_2$: Pers. in Obs + SSP loss by Obs; $CCNI_3$: Pers. in Obs + Obs to DD; $CCNI_4$: Pers. in Obs; $CCNI_5$: Pers. in Obs + DD to Obs; $CCNI_6$: Pers. in Obs + SSP gain by Obs; $CCNI_7$: Pers. in Obs + DD to Obs + SSP gain by Obs, i.e., Obs in 2015). The only near-significant trend was between $CCNI_1$ and $CCNI_2$ (p = 0.082), with $CCNI_2$ slightly higher, suggesting that the loss of observed species to the dark diversity may have tended to increase the CCNI of observed diversity over time (**FIGURE 3B**).

When assessing whether CCNI differed between persistent species in the dark diversity and those involved in turnover, Wilcoxon tests showed that only species gained from the observed diversity had significantly higher values (CCNI of "Obs to DD" = 20.1 ± 8.02) compared to persistent species (CCNI of "Pers. in DD" = 18.8 ± 6.2, p = 0.029). By contrast, species lost to the observed diversity ("DD to Obs"), gained from outside the site-specific pool ("SSP gain by DD" i.e. species taking colonisation credit), or lost from it ("SSP loss by DD") did not differ significantly from persistent species (all p > 0.05, **FIGURE 3C**).

To evaluate which turnover categories contributed to changes in the CCNI of dark diversity between 1995 and 2015, we compared a 1995 baseline ($CCNI_1$: Pers. in DD + DD to Obs + SSP loss by DD) with alternative compositions for 2015. $CCNI_5$ (Pers. in DD + Obs to DD) and $CCNI_7$ (Pers. in DD + Obs to DD + SSP gain by DD, i.e., DD in 2015) were significantly higher than $CCNI_1$ ($CCNI_1$ = 18.4 ± 5.63; $CCNI_5$ = 19.1 ± 6.33, p = 0.033; $CCNI_7$ = 19.1 ± 6.05, p = 0.04). This indicates that the gain of species from observed diversity significantly increased the CCNI of dark diversity over time, in line with the dynamics highlighted by our national model. Other turnover configurations did not differ significantly from $CCNI_1$ (**FIGURE 3D**).

When assessing whether CCNI differed between persistent species in the site-specific species pool (SSP) and those involved in turnover, Wilcoxon tests showed that species gained in the SSP by the observed diversity had significantly higher CCNI values than persistent species (CCNI of "SSP gain by Obs" = 21.3 ± 6.02 vs. CCNI of "Pers. in SSP" = 20.0 ± 5.51, p = 0.022). Species lost from the SSP through the observed diversity also tended to have higher CCNI values, though the difference was only marginal (CCNI of "SSP loss by Obs" = 21.3 ± 6.66 vs. CCNI of "Pers. in SSP" = 20.0 ± 5.51, p = 0.063). By contrast, turnover categories involving the dark diversity did not differ significantly from persistent species (all p > 0.05, **FIGURE 3E**).

To determine which turnover categories drove changes in the CCNI of the SSP between 1995 and 2015, we compared the 1995 baseline ($CCNI_1$: Pers. in SSP + SSP loss by DD + SSP loss by Obs) with alternative configurations for 2015. $CCNI_3$ (Pers. in SSP + SSP loss by Obs) and $CCNI_6$ (Pers. in SSP + SSP gain by Obs) were both significantly higher than $CCNI_1$ ($CCNI_1$ = 19.7 ± 5.20; $CCNI_3$ = 20.0 ± 5.33, p = 0.011; $CCNI_6$ = 20.1 ± 5.22, p = 0.028). These results suggest that both the loss of species from the SSP to the dark diversity and the gain of species from the observed diversity contributed to an increase in SSP CCNI. However, these effects were counterbalanced by opposite turnover processes (gains from the dark diversity and losses to the observed diversity), resulting in an overall stability of SSP CCNI between 1995 and 2015 (**FIGURE 3F**).

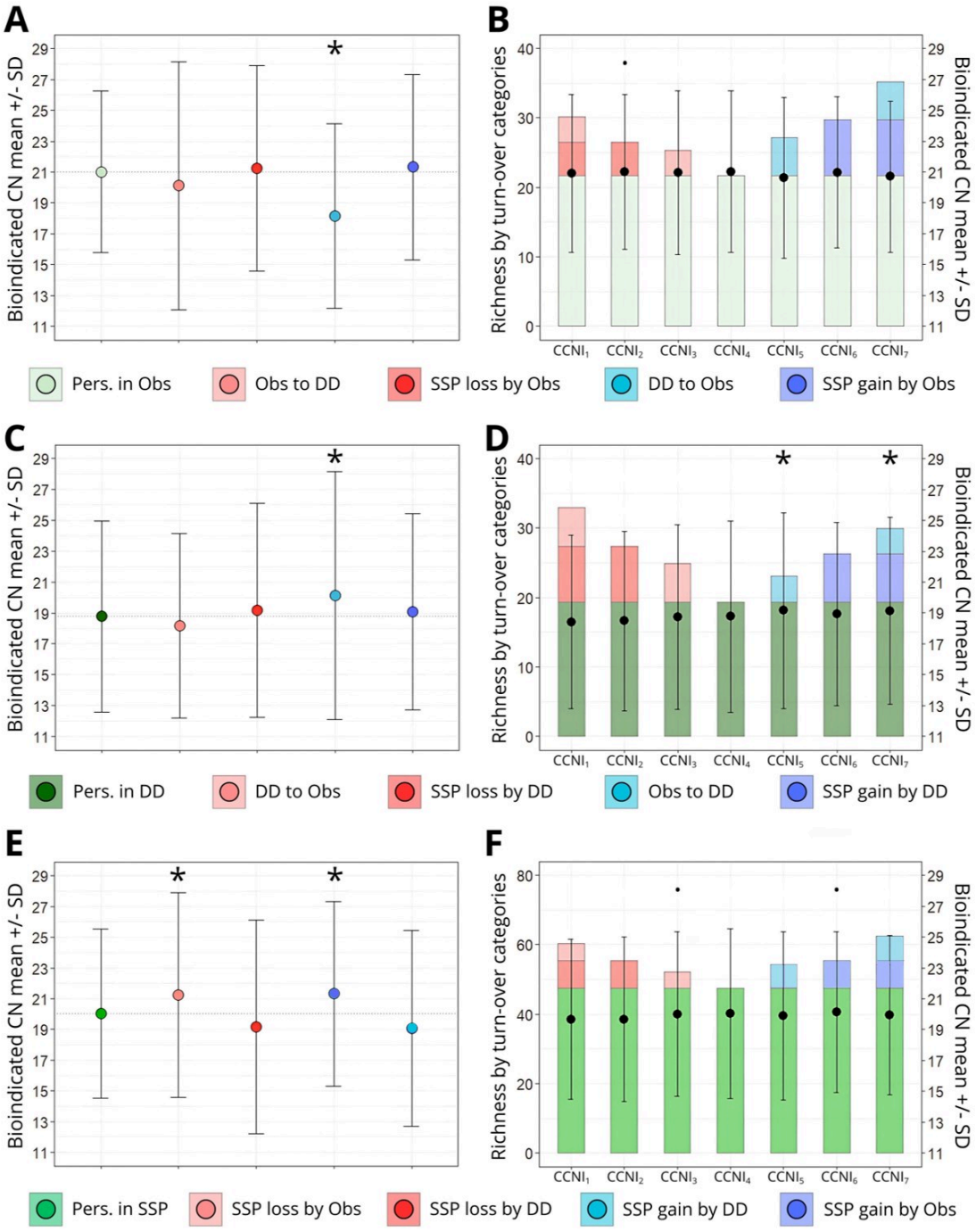


FIGURE 3 Community C/N Index (CCNI) means and standard deviations according to turnover categories and alternative turnover group compositions for each conceptual species pool.

Panels A and B correspond to observed diversity, panels C and D to dark diversity, and panels E and F to the site-specific pool. Panels A, C and E show the CCNI means ± SD for each turnover category within each pool. Categories correspond to persistent species and turnover events (e.g., species lost or gained between 1995 and 2015). A paired Wilcoxon test compares the CCNI of persistent species to that of other turnover categories. Significant differences are indicated by "".*

Panels B, D and F represent two types of information for seven turnover group compositions ($CCNI_1$ to $CCNI_7$). Barplots (left axis) show the number of species in each turnover category within the composition, with colors corresponding to turnover categories. Dots and error bars (right axis) represent the CCNI means ± SD for the same compositions.

The compositions are as follows: $CCNI_1$ includes all species present in the pool in 1995 (Persistent + Loss 1 + Loss 2); $CCNI_2$ includes Persistent + Loss 1; $CCNI_3$ includes Persistent + Loss 2; $CCNI_4$ includes Persistent only; $CCNI_5$ includes Persistent + Gain 1; $CCNI_6$ includes Persistent + Gain 2; and $CCNI_7$ includes all species present in the pool in 2015 (Persistent + Gain 1 + Gain 2). Paired Wilcoxon tests compare $CCNI_1$ with each alternative composition. Significance is noted by a "." when $p < 0.1$ and "" when $p < 0.05$.*

Legend colors indicate the origin of turnover. Light green represents persistent species in the pool. Red and pink shades represent species lost from the pool, while blue shades represent species gained in the pool. Category labels refer to the conceptual pools where gains or losses occurred (Obs = Observed diversity, DD = Dark diversity, SSP = Site-specific pool).

4. DISCUSSION

Dark diversity estimated at the RENECOFOR scale showed spatial patterns of indicator values consistent with observed vegetation and soil C/N gradients, confirming its ecological relevance for plant bioindication. Integrating dark diversity into bioindication frameworks also improved the temporal coherence between vegetation-based indicator values and measured changes in topsoil C/N, with stronger relationships observed when dark diversity species were included, either alone or within the site-specific pool (SSP). Finally, species turnover analyses between the regional, observed and dark diversity pools (**FIGURE 2**) revealed that shifts in indicator values between 1995 and 2015 were largely driven by exchanges between observed and dark diversity species. Altogether, these findings show that accounting for both observed and potential species pools enhances the spatial accuracy, temporal consistency and ecological interpretability of vegetation-based bioindication.

4.1. Relevance of dark diversity for bioindication of soil properties in French forests

Our results emphasize the importance of considering ecologically suitable but absent species when assessing biodiversity. On average, observed species represented only 49% of the site-specific species pool in 1995 and 55% in 2015. In other words, nearly half of the potential species pool (27 to 30 species) remained unobserved but ecologically compatible. Ignoring dark diversity therefore overlooks a substantial part of the biodiversity signal shaped by environmental conditions.

In comparison with other dark diversity forest understorey studies, Morel *et al.* (2022) found much lower dark diversity relative richness in Brittany's oak and beech-dominated forests with only 23% of the site-specific species pool, or fewer than three species per plot. This contrasts sharply with our findings, which reveal that a large portion of the potential pool remains unobserved. These differences may stem from methodological and spatial factors. Morel *et al.* (2022) worked on a small dataset (32 plots within a single region) and used Beals Index to estimate dark diversity, whereas we applied a hypergeometric approach over a broader dataset. These choices strongly influence estimates. For instance, Carmona *et al.* (2020) used more than 700 Swiss forest floristic surveys and showed that hypergeometric methods predict 25–35 species in dark diversity, a range consistent with our estimates, while Beals Index predicts only 10–15 species, likely underestimating the DD species pool.

In our study, the most frequent species occurring in the dark diversity pool were mainly pioneer or edge herbaceous species, such as *Teucrium scorodonia*, *Poa nemoralis*, *Fragaria vesca* and *Hypericum pulchrum*. Similar species has been reported in the dark diversity by Morel *et al.* (2022). These species exhibit intermediate strategies, neither strictly ruderal nor fully competitive, and are usually associated with semi-open habitats subject to moderate disturbance (edges, clearings, recent cuts) (Grime, 1998, 2007; Pierce *et al.*, 2017). Their occurrence in the dark diversity suggests that, although the local environmental conditions (such as soil and climate) are suitable, the specific habitat features they require (like occasional disturbance or semi-open microhabitats) are often lacking in the

RENECOFOR plots. In other words, the site is within their ecological niche, but current low-disturbance conditions prevent their establishment.

By contrast, frequently observed understory species, including *Rubus fruticosus* and *Pteridium aquilinum*, are strongly competitive or stress-tolerant (Pierce *et al.*, 2017). These species rapidly expand when canopy openings occur following moderate disturbances. Although species from the dark diversity pool also depend on such disturbances, their lower competitive ability prevents them from exploiting these openings. In other words, even when disturbances create opportunities, faster or more competitive species occupy the available niches.

Furthermore, many species belonging to the dark diversity across the RENECOFOR network are also Ancient Woodland Indicator Species (AWIS), including *Stellaria holostea*, *Hypericum pulchrum*, *Viola reichenbachiana*, *Viola riviniana*, *Dryopteris carthusiana* and *Stachys sylvatica*. AWIS are strongly associated with long-established woodlands: they persist for several centuries and are slow to colonize new sites due to limited dispersal (Kimberley *et al.*, 2013). Because of these dispersal constraints, they often fail to establish even when suitable habitats exist, which makes them likely members of the dark diversity.

Interpretations of our observations are consistent with previous studies suggesting that dark diversity may be shaped by dispersal limitation and disturbance regimes (Belinchón *et al.*, 2020; Moeslund *et al.*, 2017; Fløjgaard, 2020). Testing this hypothesis would require linking species' dispersal traits (e.g., seed size, dispersal mode) and functional strategies (e.g., ruderal vs. competitive, disturbance tolerance) to site-specific disturbance regimes.

When analysing the community C/N index (CCNI) associated with the dark diversity and the site-specific species pool (SSP), we observe that for both years studied (1995 & 2015), the bioindicated values from the dark diversity alone or the full SSP are closed, at the national scale, to the measured topsoil values. In contrast, considering only the observed diversity, the CCNI were on average higher than the measured soil values. Thus, dark diversity is a more reliable bioindicator of edaphic conditions at a given time than the observed species pool: incorporating the entire SSP further refines this bioindication.

These results support the conceptual definition of dark diversity by Pärtel *et al.* (2011) and Trindade *et al.* (2020), who describe it as the set of regional species whose ecological requirements are met by the site. Hence, dark diversity provides a consistent signal of local environmental conditions, despite species absence. A surprising result is that while dark diversity reflects local soil conditions, with CCNI values close to measured C/N, it remains significantly lower than the national mean CCNI of the observed vegetation. For example, in 1995, the CCNI of the observed plant species assemblages was significantly higher (20.9 ± 5.08) than that of the dark diversity (18.4 ± 5.66). We expected that dark diversity would not only provide accurate spatial bioindication but also exhibit CCNI values similar to those of the observed vegetation, since species in both pools occupy similar

ecological niches (Pärtel *et al.*, 2011) and should therefore reflect comparable environmental conditions. Although the difference is statistically significant, it is relatively small compared with the standard deviations. Ecologically, this difference suggests that the observed vegetation occurs on soils with slightly higher C/N ratios than the dark diversity, but the magnitude of this difference is modest, indicating that the ecological distinction between the two pools is limited.

A possible explanation involves the effects of past community assembly processes, as described by Fukami (2015). Current observed communities may reflect the conditions under which dominant understory species originally established, rather than the present soil environment. Many dominant understory species could have established when soils were poorer in nitrogen, with higher C/N ratios. These species persist today due to competitive advantages and ecological inertia, despite soil enrichment over time (Sanczuk *et al.*, 2024). In contrast, species in the dark diversity are likely adapted to the current edaphic C/N conditions but cannot establish due to stochastics disturbances or dispersal limitations. Thus, although dark diversity better reflects present nutrient status, legacy effects of long-established species in observed communities create a mismatch between species composition and current environmental conditions.

Our analysis of the community C/N index (CCNI) associated with dark diversity confirms its strong relevance as a spatial bioindicator of soil conditions at the national scale in French forests.

4.2. Integrating dark diversity restores coherence between vegetation and soil C/N changes

To our knowledge, this is the first study to apply the concept of dark diversity to bioindication, assessing its ability to track environmental changes over time. By including species absent from local observations but ecologically suited to the habitat, we tested whether dark diversity improves the detection of edaphic C/N dynamics through vegetation-derived indicator values. Beyond this novel application, our study is also the first to operationalize the framework of Trindade *et al.* (2020) in a long-term monitoring context, which analyses temporal fluxes among three conceptual species pools: observed diversity, dark diversity, and the site-specific species pool (SSP).

Our results confirm those of Ribémont *et al.* (2025, in prep.): between 1995 and 2015, changes in topsoil C/N and those inferred from the observed vegetation were not aligned. The understory community indicated stable edaphic C/N despite a marked increase in topsoil C/N from 18.9 to 19.9 (Saenger *et al.*, 2024), mainly due to rising organic carbon rather than declining nitrogen. Higher C/N slows nitrogen availability by increasing the energetic cost of mineralization for soil decomposers, yet the CCNI of observed flora remained largely stable (20.9 to 20.5) and changes in soil C/N and observed CCNI were uncorrelated, indicating a lack of temporal coherence between CCNI and measured topsoil C/N.

The CCNI derived from the dark diversity pool increased significantly from 18.4 to 19.1 over 20 years, closely following the soil trend. Locally, changes in soil C/N and dark diversity CCNI were

positively correlated, showing that dark diversity captures both spatial gradients and temporal dynamics. The SSP CCNI also increased, though not significantly at the national scale; local correlations with soil C/N approached significance, suggesting that including all site-specific species (observed and expected yet absent) enhances coherence between vegetation and soil nutrient dynamics.

Dark diversity consequently provides not only a snapshot of nutrient status but also a sensitive detector of environmental change. Integrating dark diversity into bioindication frameworks for forest soil seems to restore temporal coherence between understory communities and their abiotic environment, offering a more accurate and responsive assessment of forest ecosystem change.

4.3. CCNI dynamics are not explained by extinction debt or colonization credit but by local turnover between observed and dark diversity

Analysing species turnover between the three conceptual pools allows to assess whether changes in the site-specific species pool and the exchanges between observed and dark diversity explain temporal shifts in vegetation-derived indicator values. By tracking species fluxes between observed and dark diversities, and the SSP, one can determine how these turnovers contribute to changes in the Community C/N Index (CCNI) over time. Surprisingly, the temporal dynamics of CCNI within these pools cannot be explained by extinction debt or colonization credit processes. As defined in the introduction, these correspond to species disappearing from observed diversity directly outside the SSP without passing through dark diversity (paying the extinction debt; SSP loss by Obs) or species entering the SSP via dark diversity (taking the colonization credit; SSP gain by DD). However, species in these categories did not show CCNI values significantly different from those persisting in observed or dark diversity, respectively.

According to Trindade *et al.* (2020), such extinction debt and colonization credit turnovers are indicative of major environmental shifts, strong enough to reshape site suitability and the potential community. The absence of these dynamics in our results suggests that the observed increase in soil C/N ratio, although significant (from 18.9 to 19.9 over ~15 years), was not sufficient to trigger a regional-scale restructuring of the SSP regarding this soil metric. As C/N values remained within the typical range for moder humus forms (15–25; Jabiol *et al.*, 2007) and below the critical threshold (~25) above which nitrophilous species tend to decline sharply (MacDonald *et al.*, 2002), no major extinction or colonization events linked to edaphic C/N variation occurred during the monitoring period. Thus, although C/N topsoil evolved, it likely remained within the ecological tolerance of most species, leading to shifts in species prevalence (observed vs. dark diversity) rather than outright changes in species suitability.

The CCNI of the SSP also showed no significant change between 1995 and 2015, although its national trend was positive and approached significance. This trend was mainly driven by the loss of species from the SSP via dark diversity (SSP loss by DD), which had lower CCNI than persistent species (Pers. in SSP), and the gain of species into the SSP from the observed pool (SSP gain by Obs),

which had higher CCNI than persistent species. In other words, species indicative of lower soil C/N were no longer suitable and left the SSP, while species indicative of higher C/N entered, reflecting the overall tendency for edaphic C/N to increase.

The positive dynamic in dark diversity CCNI was driven by local turnover between observed and dark diversity. Species lost from observed diversity and gained by dark diversity between 1995 and 2015 had significantly higher CCNI values than species persisting in dark diversity, raising the mean CCNI of the dark diversity pool. These same species had lower CCNI values than those persisting in observed diversity, so their disappearance also tended to slightly increase the observed CCNI over time. Conversely, species moving from dark to observed diversity did not differ significantly in CCNI from the species that remained in dark diversity. Their CCNI was slightly lower than that of species persisting in observed diversity, and their arrival did not significantly influence the temporal trend of the observed CCNI.

We initially expected that exchanges between dark diversity and observed diversity could blur the vegetation-based bioindication of increasing soil C/N. However, this signal does not exist: observed species lost to or gained from the regional pool (SSP loss by Obs; SSP gain by Obs) had CCNI values similar to those persisting in the observed diversity, indicating that their disappearance or appearance is clearly not linked to the C/N gradient.

The few species shifting from observed to dark diversity (those with lower CCNI values for the observed pool, but still higher than the dark diversity average) drove the positive trend in dark diversity CCNI.

This significant temporal shift in dark diversity may also be amplified by the relative sizes of the species pools. On average, 3.72 ± 4.41 species per plot shifted from observed diversity to dark diversity between 1995 and 2015, but this occurred within a dark diversity pool whose size slightly decreased over time, from 30.1 ± 26.9 to 27.1 ± 25.2 species. Such a reduction could enhance the relative contribution of each newly added species from the observed to the dark diversity pool to the mean CCNI, maximizing the chance of detecting a significant effect. In contrast, the observed diversity pool increased over the same period, from 28.6 ± 16.9 species in 1995 to 33.1 ± 19.3 species, potentially diluting the influence of these lost species on the overall CCNI trend.

Among the species transitioning from observed to dark diversity, *Poa nemoralis*, *Urtica dioica*, *Potentilla sterilis*, *Veronica officinalis*, *Mycelis muralis*, *Carex pilulifera*, and *Fragaria vesca* are usually associated with semi-open or moderately disturbed habitats. According to the CSR framework (Grime, 1998) and Pierce *et al.* (2017), these species exhibit intermediate strategies, balancing moderate competitive ability with some tolerance to disturbance. Over time, reduced local disturbance or increased canopy closure in mature forests can limit the availability of the semi-open microhabitats they require. As a result, despite suitable soil and climatic conditions, these species may fail to establish or persist locally, shifting from observed diversity to dark diversity. Some of these species, such as *Carex pilulifera*, also bioindicate high edaphic C/N (C/N = 24.9 in the Ecoplant

database; Gegout *et al.*, 2005). Therefore, their transition from observed to dark diversity in the RENECOFOR plots might be related to changes in disturbance regimes, although we did not directly test this hypothesis. Similarly, the observed increase in dark diversity CCNI may partly be incidental rather than a direct ecological signal. Examining the relationship between disturbance and dark diversity dynamics in future studies would help clarify these patterns and test these hypotheses.

In conclusion, the CCNI dynamics of dark diversity and the site-specific species pool (SSP) mirror those measured in the topsoil, unlike the observed vegetation. The lack of temporal coherence between observed vegetation and soil measurements cannot be explained by interactions with dark diversity, but reflects the absence of any detectable effect of the soil C/N increase on the observed vegetation. Species involved in extinction debt or colonization credit do not reflect this increase. The positive trend in the SSP is mainly driven by species gained from the regional pool, with higher C/N values, and by the loss of species from dark diversity, with lower C/N values—consistent with the measured increase in soil C/N. In dark diversity, the rise in CCNI is less straightforward, as the contributing species originate from observed communities and appear more linked to low disturbance than to edaphic change.

4.4. Limitations and perspective

The main limitation of applying the dark diversity concept lies in its estimation. Identifying potential but currently unobserved species remains a major challenge. In this study, we selected the most robust approach to date; methods based on species co-occurrence patterns rather than ecological niche modeling (Lewis *et al.*, 2014). Within this framework, we used the hypergeometric method (Carmona *et al.*, 2020), shown to be more accurate than the Beals index (Carmona *et al.*, 2021). All these methods share a common drawback: the subjective choice of a probability threshold to assign species to the dark diversity. Here, we aimed for a compromise threshold to minimize false positives (Carmona *et al.*, 2020; Chollet *et al.*, 2025) while preventing sites devoid of dark diversity, which would be ecologically unrealistic. This threshold choice critically influences dark diversity estimates. If the concept is to be used in conservation or management, standardized thresholds—or at least clear guidelines—are essential.

Co-occurrence-based methods are also highly data-demanding. We used a large, independent dataset to maximize the reliability of inferred species associations, but such datasets are not always available. Moreover, without defining coherent regional species pools, false positives increase (Chollet *et al.*, 2025). Thus, estimating dark diversity remains a matter of methodological choices and trade-offs, requiring ongoing refinement. Plus, co-occurrence approaches remain indirect proxies of environmental suitability, primarily reflecting biotic constraints (e.g., species interactions) and only indirectly accounting for abiotic filters. New methods integrating both biotic and abiotic factors more explicitly are currently being developed (Fujinuma & Pärtel, 2023).

Beyond estimation challenges, interpreting species membership in dark diversity is complex. Species absence from suitable sites results from multifactorial causes such as dispersal limitation,

colonization dynamics, competition strategies, and species-specific ecology. In dynamic studies like ours, disentangling these mechanisms demands complementary traits and ecological analyses. This complexity currently limits broader application of the concept.

Despite these limitations, our study shows that dark diversity can function as a dynamic bioindicator responsive to environmental changes, here illustrated by soil C/N ratio dynamics in forests. This opens promising perspectives for monitoring plant community responses to global change. Future research should integrate dynamics of observed and dark diversities and the site-specific species pool with functional trait data. Incorporating dispersal, colonization, and competitive traits will help elucidate ecological mechanisms driving species turnover across these pools. Extending this framework to other critical environmental gradients (especially climatic variables) is also essential. Richard *et al.* (2021) demonstrated an extinction debt linked to warming, reflecting a delayed vegetation response to increasing temperatures in French forests. Since temperature increases often surpass changes in C/N ratios, applying our framework to climate gradients could reveal whether extinction debts and colonization credits better explain such lagged community response.

Chapter 3

Leaf economics spectrum traits outperform traditional indicator values in detecting soil nutrient gradients

---

Authors

Robinson Ribémont[1], *Claire Barel, Evelyne Blanchard*[1], *Sylvaine Buquet*[1], *Philippe Delporte*[1], *Pierre Simonot*[1], *Manuel Nicolas*[2], *Estelle Langlois*[1] *& Michaël Aubert*[1]

Authors' affiliations

[1] ECODIV USC INRAE 1499, Université de Rouen Normandie, France

[2] Office National des Forêts, Département RDI, Fontainebleau, Franc

Abstract

Understory plant species are widely used as bioindicators of soil fertility, yet traditional indicator values (IVs) often fail to detect subtle spatial or temporal variations in edaphic conditions because they primarily reflect interspecific species turnover. In contrast, functional traits from the Leaf Economics Spectrum (LES) offer a mechanistic and integrative alternative, as they capture both interspecific differences and intraspecific variability in plant resource-use strategies. Traits such as Specific Leaf Area (SLA), Leaf Dry Matter Content (LDMC), and leaf carbon and nitrogen concentrations reflect the trade-off between resource acquisition and conservation, providing a direct functional link to nutrient availability and potentially offering finer sensitivity to soil fertility gradients.

To test this hypothesis, we analysed plant samples from 22 long-term forest monitoring sites from temperate French forests (RENECOFOR and BEF networks) encompassing wide gradients of soil C/N ratio and extractable phosphorus. We adopted a dual-scale approach, combining intraspecific trait measurements on three widespread understory species (Rubus fruticosus agg., Carex pilulifera, and Lonicera periclymenum) with community-level assessments of dominant understory assemblages. Foliar LES traits were compared with conventional indicator values to evaluate their relative ability to reflect variations in soil nutrient status.

Our results demonstrate that LES traits consistently capture acquisitive–conservative strategies across both intra- and interspecific levels. These strategies varied systematically along soil nutrient gradients, with conservative traits predominating in nutrient-poor soils and acquisitive traits in nutrient-rich conditions. At the community scale, variation in LES traits was driven almost equally by species turnover and intraspecific trait variability, underlining the importance of both components in shaping plant responses to edaphic constraints. Compared to traditional IVs, trait-based indicators revealed clearer, more continuous, and more sensitive responses to soil nutrient availability.

Overall, this study highlights the strong potential of functional traits to refine bioindication, improve the sensitivity of ecosystem monitoring, and support adaptive management of temperate forest ecosystem.

I. INTRODUCTION

Plant species are highly responsive to local ecological conditions, especially to soil nutrient availability (Grime, 1979; Inouye & Tilman, 1988). This sensitivity underpins their widespread use as bioindicators of environmental gradients (Diekmann, 2003). In temperate forests, understory vegetation responds strongly to soil properties (e.g. humidity, texture, fertility), making it a valuable tool for assessing site fertility and other edaphic conditions (Gilliam, 2007; Diekmann & Dupré, 1997). Traditional bioindication approaches rely on Indicator Values (IVs), which assign to each species a numerical score reflecting its ecological preference along environmental gradients. Well-known examples include Ellenberg values for Central Europe (Ellenberg, 1972), the French CATMINAT database (Julve, 1998), EcoPlant, which links species responses directly to measured soil parameters in metropolitan France (Gégout, 2005), and European Indicator Values, which harmonize national datasets (EIVs; Dengler, 2023).

Although IVs effectively capture spatial variation (Wamelink, 2002; Gégout *et al.*, 2008; Carpenter & Goodenough, 2014), long-term studies indicate that they often fail to detect temporal changes in environmental conditions (Van Calster *et al.*, 2007; Dölle & Schmidt, 2009; Ribémont *et al.*, 2025, submitted). This limitation stems from their conceptual basis: each species is assigned a single value representing its ecological optimum (Ellenberg, 1972; Julve, 1998; Gégout, 2005). As a result, IVs neglect species ecological amplitude, defined as the full range of conditions a species can tolerate (Whittaker, 1953). This amplitude often depends on phenotypic plasticity, whereby individuals of the same species express different morphological and physiological characteristics depending on their environment (Violle *et al.*, 2012). Such plasticity enables individuals to adjust to local conditions and supports population persistence across heterogeneous environments (Albert *et al.*, 2011). At the community level, shifts in mean IVs occur only when species turnover is substantial. Consequently, environmental changes that do not induce floristic turnover remain undetected in community-averaged IVs. IV-based approaches therefore lose sensitivity under moderate environmental variation, emphasizing the importance of accounting for ecological amplitude and intraspecific variability in bioindication frameworks.

In contrast, functional traits may provide a more sensitive lens on vegetation–environment relationships as environmental changes influence ecosystem functioning through both species' turnover and intraspecific trait variation (Pescador *et al.*, 2015; Silo *et al.*, 2019). Defined as measurable morphological, physiological, phenological, or behavioral characteristics at individual level (Violle *et al.*, 2007), traits reflect ecological strategies shaped by environmental constraints (Lavorel & Garnier, 2002; Reich, 2014). Some functional traits can be considered "response traits", when they respond consistently to changes in each set of biotic or abiotic factors, thus illustrating how plants adjust to changes (Grime, 2001; Craine, 2009). For example, specific leaf area (SLA) and leaf nitrogen concentration (LNC) generally increase with soil fertility (Wright *et al.*, 2004; Ordoñez *et al.*, 2009), whereas plant height often decreases under nutrient or light limitation (Díaz *et al.*, 2016).

Analyzing multiple traits simultaneously allows the identification of plant strategies, defined as coherent combinations of morphological, physiological, and phenological characteristics that determine growth, reproduction, and resource exploitation under specific conditions (Reich, 2003). These strategies reflect trade-offs among growth, reproduction, defence, and organ longevity (Grime, 2001; Craine, 2009). The Plant Economics Spectrum (PES) provides a conceptual framework for whole-plant strategies, describing how plants manage water, nitrogen, light, phosphorus, sulfur and carbon along a continuum from conservation to acquisition (Freschet *et al.*, 2010; Reich, 2014) and integrating coordination of traits across organs including leaves, stems, and roots.

Within the PES, the Leaf Economics Spectrum (LES) focuses on leaf traits along an acquisitive–conservative continuum. SLA, leaf dry matter content (LDMC), leaf nitrogen and phosphorus concentrations reflect resource-use strategies: acquisitive species grow fast, recycle nutrients rapidly, and have short-lived tissues, whereas conservative species invest in long-lived tissues that develop through slower growth (Wright *et al.*, 2004; Shipley *et al.*, 2006; Grime, 2001; Craine, 2009; Freschet *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2014). Plant height provides an additional axis, indicating competitive ability and resource-acquisition potential (Wright *et al.*, 2004; Weigelt *et al.*, 2021). Linked to soil nutrient gradients, LES traits may reveal vegetation responses to edaphic variation, mostly soil fertility. Some traits, such as SLA and leaf chlorophyll content, are also sensitive to light availability and canopy openness (Garnier & Navas, 2004), reflecting the combined influence of nutrient and light conditions on plant strategies.

The LES is widely used to investigate shifts in plant strategies along soil nutrient gradients, most often at the community level rather than the species level. In such studies, trait values are aggregated across species and weighted by their relative abundance to produce community-weighted means (CWMs), which summarize the functional composition of the assemblage, also referred to as community functional structure (Díaz *et al.*, 2007; Ackerly & Cornwell, 2007). This approach allows comparisons among communities and helps identify environmental drivers of community assembly. For instance, Pérez-Ramos *et al.* (2012) showed that in Mediterranean rangelands, community functional structure was largely influenced by nutrient limitation, while Delpiano *et al.* (2020) found that leaf traits shifted along a soil nutrient gradient, with communities moving from more acquisitive to more conservative strategies as nutrient limitation increased in the Atacama Desert.

Changes in community functional structure may result from species turnover (interspecific variation), shifts in traits within species (intraspecific variation - ITV), or both (Garnier *et al.*, 2004; Delpiano *et al.*, 2020). Ignoring intraspecific variation underestimates species' functional plasticity and may misrepresent community responses (Albert *et al.*, 2011). Empirical studies confirm this. Fajardo *et al.* (2018) found that intraspecific variation accounted for 40–60% of community-level leaf trait variation along nutrient gradients. Within-species shifts in traits such as SLA and leaf nitrogen mirrored community-level patterns. Niinemets *et al.* (2015) showed that individual-level LES traits in *Quercus ilex* varied substantially along nutrient and light gradients, sometimes diverging from community averages, revealing relationships that CWMs alone would not capture. These findings

demonstrate that trait-based bioindication can account for both species turnover and intraspecific variability, while IV-based approaches only reflect turnover.

This distinction is particularly relevant where IVs fail to detect temporal changes in soil C/N and P availability at large scales, such as in French forest understories (Ribémont *et al.*, 2025, submitted). Measured at the individual level and on several species, traits directly reflect how plants adjust to their immediate environment, integrating inter- and intraspecific variability. This capacity to capture functional adjustments rather than static optima may make trait-based approaches more sensitive to subtle or gradual environmental variation. An open question remains as to whether LES traits outperform IVs in bioindicating soil C/N and P long term variations in temperate forest understories and highlighting their potential to improve bioindication in this communities.

In this study, we evaluated the ability of functional traits provide a robust and sensitive alternative to traditional plant-based indicator values for assessing soil nutrient availability in temperate forest understories. Specifically, we asked whether (i) leaf functional traits capture the acquisitive–conservative spectrum at both individual and community levels, (ii) this spectrum shifts consistently along soil nutrient gradients (C/N ratio and P), and (iii) trait-based indicators respond more strongly than IVs to variations in soil fertility. We hypothesized that LES-linked traits integrated into a clear acquisitive–conservative axis, shift predictably along nutrient gradients, and may outperform IVs by capturing both intraspecific plasticity and community-level functional adjustments.

To test these ideas, we used a French network of 22 temperate forest monitoring sites spanning broad gradients of soil C/N ratio and extractable phosphorus. We adopted a dual-scale approach: at the intraspecific level, we quantified acquisition–conservation strategies within widespread understory species, and at the community level, we assessed the most dominant species within the assemblages. While our focus was on soil fertility, we also accounted for canopy openness, since light availability may influence certain LES traits alongside soil resources.

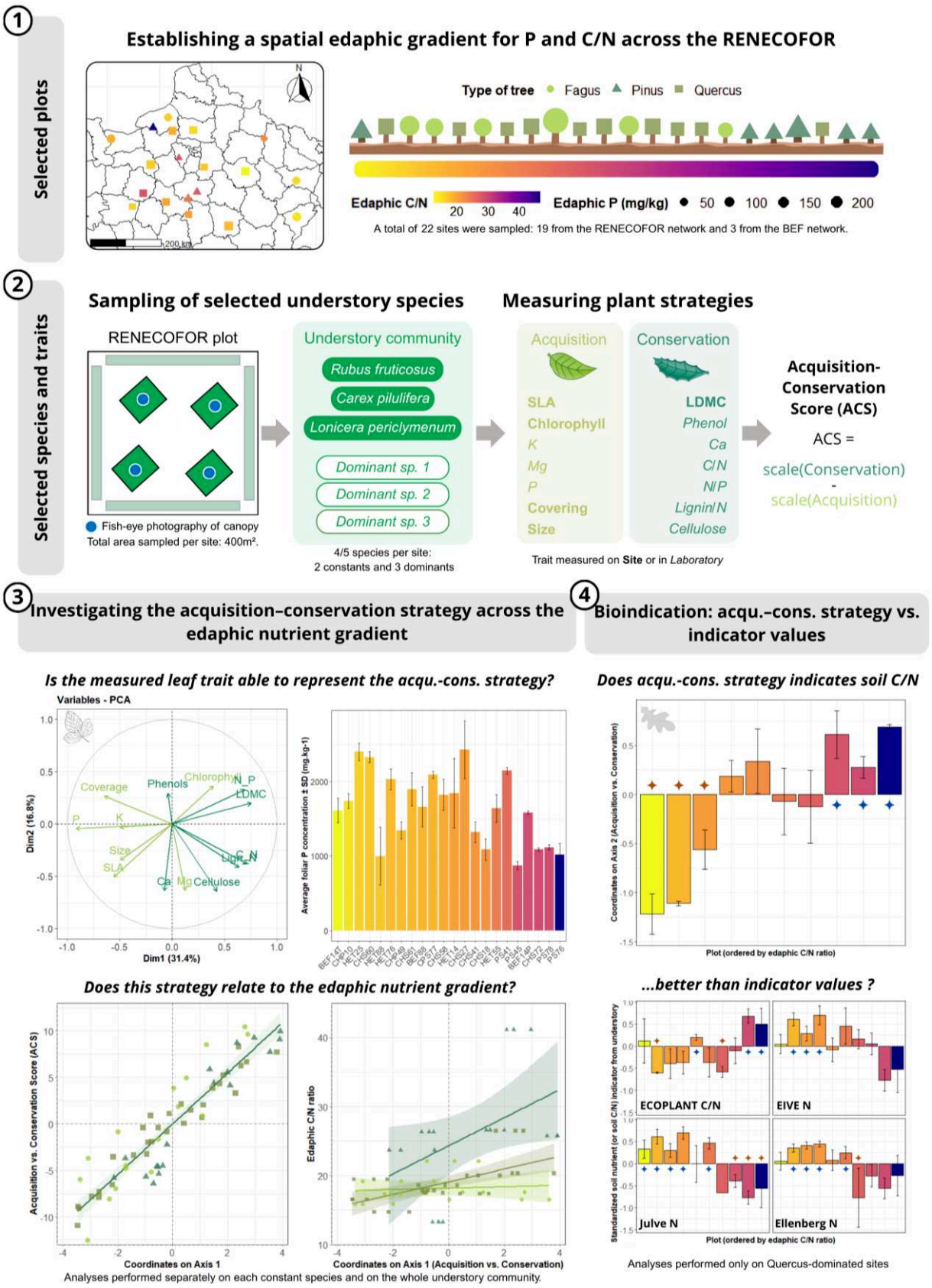


FIGURE 1 Study workflow overview.

The first part illustrates the geographic distribution of sites in the northern half of France and the construction of the environmental gradient using the 22 selected sites from the RENECOFOR and BEF networks. The edaphic C/N gradient is represented using a viridis color palette, and the edaphic P gradient is represented by point size; site dominance is indicated by shape: Quercus = square, Pinus = triangle, Fagus = circle. The second part shows the selected species, the functional traits measured, and the field survey design. The final two parts summarize the statistical analyses: first, the trait-based PCA and other analyses at the species and dominant understory community scales; second, the testing of trait-based indicators against indicator values to bioindicate soil fertility, here using edaphic C/N.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Study area, traits, and species selection

2.1.1 Site selection and edaphic gradient construction

This study was conducted within the French forest network RENECOFOR (Réseau National de suivi à long terme des Écosystèmes Forestiers), established in 1992 by the French National Forest Office (ONF) as a nationwide program for long-term monitoring of forest ecosystems (the French part of the Paneuropean ICP Forests monitoring network). The network comprises 102 permanent plots across metropolitan France, encompassing a wide range of ecological contexts and stand types. Dominant tree species include *Fagus sylvatica* (20% of plots), *Quercus petraea* and/or *Q. robur* (30%), and *Pinus sylvestris* (15%), among others (Ulrich, 1995). Between 1993 and 2021, vegetation surveys and soil sampling were conducted on these plots to track long-term changes in soil conditions and understory plant communities (RENECOFOR network inventories, Saenger *et al.*, 2024).

Data from the second RENECOFOR soil inventory campaign (2007–2012), and more specifically those collected on the 0–10 cm layer, were used to construct national edaphic gradients of extractable phosphorus (P) and C/N ratio. Within each plot, five subplots (13.5 × 13.5 m) were established, one at the center and four at the corners. For each subplot, a composite soil sample was created by combining material from five systematically arranged sampling points (4.5 × 4.5 m grid). This procedure captures local variability while avoiding disturbed areas (e.g., harvest residues, skid trails) and proximity to living trees. Organic carbon (C) and total nitrogen (N) were measured by dry combustion after decarbonation, and the C/N ratio was calculated (Saenger *et al.*, 2024). Extractable phosphorus (P) was determined using the Duchaufour method (Achat *et al.*, 2016). Subplot values were then averaged to produce a single value per plot for each parameter, which were subsequently used to rank all 102 plots independently along the C/N and P gradients.

Plots above 750 m elevation, with shifts in dominant tree species, or affected by severe disturbance (>50% basal area loss) were excluded. From this ranking, 19 RENECOFOR plots were selected to maximize coverage of both gradients while minimizing confounding effects related to stand structure, management history, or environmental context (e.g. Mediterranean climate). The selected plots are distributed across the northern half of France, from crystalline oceanic regions in the west to semi-continental lowlands in the east, including semi-oceanic forests of central-northern France. They represent ecosystems dominated by the three most widespread tree species in the RENECOFOR network and share at least one common understory species, enabling intraspecific trait comparisons along environmental gradients. (**FIGURE 1.1**).

To extend the edaphic C/N and P gradients in high values (especially for plots with the same dominant tree species), three additional sites were selected from the long-term liming experiment network of the INRAE BEF (Biogeochemistry of Forest Ecosystems) research unit. The BEF network comprises 32 sites designed to study the long-term effects of mineral liming on forest ecosystem

compartments, including soil and tree species. For this study, sites were chosen to cover contrasting phosphorus availability, including unfertilized controls and plots receiving P_2O_5 amendments. These additional sites (two dominated by *Fagus sylvatica* and one by *Pinus sylvestris*) represent the extremes of the phosphorus gradient, thereby strengthening coverage of the edaphic nutrient spectrum.

Following this selection, the final dataset comprised 22 sites: 10 dominated by Quercus petraea and/or Q. robur, 6 by Fagus sylvatica, and 6 by Pinus sylvestris (**FIGURE 1.1**). These sites span a wide range of edaphic and structural conditions, with soil C/N ratios ranging from 13.29 to 41.13 and extractable phosphorus concentrations from 10.04 to 243.75 $mg \cdot kg^{-1}$. Overall, the selection provides broad coverage of edaphic conditions while ensuring balanced representation of the dominant tree species across the gradients (**FIGURE S1**).

2.1.2 Leaf Economic Spectrum trait-linked

To link plant functional variation to soil nutrient gradients, we focused on traits associated with the Leaf Economics Spectrum (LES), which captures trade-offs between rapid resource acquisition and resource conservation (Wright *et al.*, 2004; Garnier & Navas, 2013). Traits were selected based on their relevance to nutrient uptake, tissue investment, and growth rate, all of which are expected to vary along gradients of soil C/N and extractable phosphorus (**FIGURE 1.2**).

Quantifying these LES-linked traits across the edaphic gradients allows us to assess how plant strategies shift between acquisition and conservation in response to soil nutrient availability, in a temperate context. Leaf and plant traits were grouped according to the strategy they reflect (**TABLE 1**). Traits associated with resource conservation, such as leaf dry matter content (LDMC), tannins, calcium (Ca), C/N ratio, N/P ratio, lignin/N, and cellulose, indicate slow tissues and organs turnover, high structural investment, and resistance to herbivory or decomposition, and are expected to increase under nutrient-poor conditions. In contrast, traits associated with resource acquisition, such as specific leaf area (SLA), chlorophyll content, potassium (K), magnesium (Mg), phosphorus (P), leaf area coverage, and vegetative size or internode length, reflect rapid growth and efficient nutrient capture, a rapid organ turn over and are expected to increase under nutrient-rich conditions (**FIGURE 1.2**).

2.1.3 Selection of constant species and construction of the dominant species assemblage in the understory

Based on the last floristic inventories at the 22 selected sites, three taxa were consistently present: *Rubus fruticosus* agg. (22/22 sites), *Carex pilulifera* (14/22), and *Lonicera periclymenum* (12/22). *Rubus fruticosus* agg. represents an assemblage of closely related species sharing similar ecological traits. These taxa were chosen because their broad distribution across the sites allows for robust analysis of intraspecific trait variability in relation to soil nutrient gradients (**FIGURE 1.2**).

These three taxa span contrasting ecological life forms, a shrubby angiosperm (*R. fruticosus* agg.), an herbaceous sedge (*C. pilulifera*), and a climbing angiosperm (*L. periclymenum*), and differ in resource acquisition strategies, tissue structure, and growth patterns. Measuring LES-linked traits (e.g., SLA, LDMC, leaf nutrient content) on these species provides insight into how plants modulate their acquisition–conservation strategies along gradients of C/N and phosphorus availability.

To complement the intraspecific approach, at each site, we also measured the LES-linked traits of the dominant species of the understory here after named the dominant assemblage of the understory. Within each selected site, a 400 m² sampling area was delineated. Two 10 × 20 m quadrats were established within this area, and within each quadrat the three most abundant species were identified based on their measured abundance. Combined with the constant species, these 2–3 most abundant species formed a group of 4–5 species, which we defined as the dominant community of the understory (**FIGURE 1.2**). This species-level grouping allows us to assess whether LES-linked traits and acquisitive–conservative strategies vary not only within species but also among the dominant understory species along the C/N and phosphorus gradients. In total, we measured functional traits on 21 species (**TABLE S1**).

TABLE 1 List of leaf and whole-plant functional traits related to acquisition–conservation strategies, their relationships with a soil fertility gradient, and associated bibliographic references.

Strategy	Trait	Functional relevance	Increase in	References
Conservation	LDMC	Dense leaf tissues; slow resource turnover	Poor soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4
	Polyphenols (%)	Secondary compounds; protect against herbivory, slow decomposition	Poor soils	Hernes & Hedges, 2004
	Ca	Structural mineral; leaf toughness	Poor soils	Delian *et al.*, 2014 ; Habbasha *et al.*, 2015
	C/N	Higher ratio indicates slower nutrient cycling	Poor soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4
	N/P	High values indicate P limitation	Limited in P soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4
	Lignin/N	Structural investment; slows decomposition	Poor soils	Talbot & Treseder, 2012
	Cellulose (%)	Structural carbon; low decomposability	Poor soils	Zhang *et al.*, 2008
Acquisition	SLA	High specific leaf area indicates rapid growth	Rich soils	Garnier & Navas, 2013
	Chlorophyll	Photosynthetic capacity	Openned canopy	Lopez-Cantarero *et al.*, 1994
	K (mg/kg)	Key nutrient for growth	Rich soils	Du *et al.*, 2023
	Mg (mg/kg)	Component of chlorophyll; linked to photosynthesis	Rich soils	Bakshi *et al.*, 2022
	P (mg/kg)	Leaf phosphorus; key for growth	Rich soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4
	Coverage (%)	Species coverage; resource capture	Rich soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4
	Size and inter-node	Vegetative height or maximum size; competitive ability	Rich soils	Garnier & Navas, 2013, Chap. 4

2.2. Field and lab measurements

2.2.1 Field measurements

Within each 400 m² sampling area, ten individuals per selected species were marked for trait measurements. From each individual, a mature, healthy, and fully exposed leaf was collected to measure chlorophyll content, leaf area, and fresh leaf mass. Chlorophyll content was measured in situ using a SPAD-502Plus meter, which provides a unitless index typically ranging from 0 to 100. Higher SPAD values indicate higher chlorophyll content, reflecting greener, more photosynthetically active leaves. Leaf area was measured in the field using a CanoScan LiDE 300 scanner. For each leaf, five readings were taken at different points and averaged. Within each 400 m² area, the percentage cover of each selected species was also recorded. This metric was treated as a functional trait at the species level, capturing relative abundance and spatial dominance within the understory community.

Canopy openness was measured at the locations of sampled individuals using a fisheye lens camera. Five photographs per plot were analysed with the R package hemispheR (Chianucci & Macek, 2023) to estimate mean canopy openness via pixel analysis. Canopy openness values ranged from 6.5% to 24.1% across sites. This measurement ensured that observed variations in foliar traits were not confounded by differences in light availability, which could co-vary with soil nutrient content and influence trait expression.

2.2.2 Lab measurements

Leaf samples were oven-dried at 40°C until constant mass was reached (usually 4–5 days). Dry mass was measured to calculate specific leaf area (SLA, $mm^2 \cdot mg^{-1}$) as the ratio of leaf area to dry mass, and leaf dry matter content (LDMC, $mg \cdot g^{-1}$) as the ratio of dry mass to fresh mass.

For each species within a plot, three replicate batches of 20 g of leaves were prepared to capture within-plot variability and to provide sufficient material for foliar chemical analyses. Samples were dried and ground in two steps: first using a blade grinder to <1 mm, and then a ball mill to <250 µm (3 minutes at 25 Hz). The resulting powder was then split for the different chemical analyses.

Foliar carbon and nitrogen were measured using a CHN pyrolysis micro-analyser (Flash 2000 Series, Thermo Scientific). Phosphorus, calcium, magnesium, potassium, and sodium were determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (iCAP™ 7200 ICP-OES, Thermo Scientific) after nitric acid digestion of 0.5 g samples in a microwave digestion system (ETHOS One, Milestone, Italy; Zarcinas *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1997). Plant fiber contents were measured through sequential chemical digestion using a fiber analyzer (FIWE 6, VELP Scientifica) following the van Soest protocol (Van Soest & Wine, 1967). Total phenolics were extracted from 0.1 g of material in 70% acetone for 1 h and quantified colorimetrically with the Folin–Ciocalteu reagent, using tannic acid as a standard (Bärlocher & Graça, 2005).

2.3. Statistical analysis

2.3.1 Data organization

First, field-measured traits were combined with laboratory-derived measurements. In the field, traits were recorded on ten individuals per species, whereas in the laboratory, chemical traits were analysed on three batches per species. To harmonize the number of replicates between field and laboratory data, nine of the ten field-measured individuals were randomly pooled into three groups, creating three "field" replicates that could be paired with the three laboratory batches, which were also assigned randomly.

This procedure generated a dataset in which each column corresponds to a measured trait, and each row represents a single replicate of a species within a given plot. This "trait dataset" allows for intraspecific trait analyses for *Rubus fruticosus* agg., *Carex pilulifera*, and *Lonicera periclymenum*, as well as for the dominant community of the understory.

In parallel, a "site dataset" was compiled, containing plot-level information such as dominant tree species, soil C/N ratio, and extractable phosphorus (P) measured in the 0–10 cm layer between 2007 and 2012 for RENECOFOR plots, and between 2010 and 2016 for BEF plots, and the canopy openess. This dataset provides the edaphic context necessary to link trait variation to soil nutrient gradients.

2.3.2 Can the measured leaf traits represent the acquisition-conservation strategy?

To evaluate whether the measured leaf traits capture the acquisition–conservation strategy, we first computed an Acquisition–Conservation Score (ACS) for each replicate of each species at each plot. Traits were previously classified, based on the literature, as either acquisition-related or conservation-related. The ACS was calculated as:

$$\text{ACS} = \sum(\text{scaled conservation traits}) - \sum(\text{scaled acquisition traits})$$

where trait values were standardized (scaled) across all observations. A low ACS indicates a species leaning toward an acquisition strategy, whereas a high ACS indicates a conservative strategy (**FIGURE 1.2**).

Next, the trait dataset was used to perform a Principal Component Analysis (PCA) for each constant species and for the dominant community of the understory. For the PCA of the dominant community only, we further tested whether functional strategies segregated by plant types by grouping centroids of individual scores according to life form (angiosperm, graminoid, fern) and vegetation stratum (herbaceous, liana, shrub-like), with differences assessed using PERMANOVA. PCA scores for the main axes were then extracted, yielding one coordinate per replicate per species per plot. Pearson correlations between the Acquisition–Conservation Score (ACS) index and PCA axis scores were performed to confirm that the PCA axes reliably captured species positions along the acquisition–conservation spectrum (**FIGURE 1.3**).

2.3.3 Does the acquisition-conservation strategy vary along the nutrient edaphic gradient?

For each constant species and dominant community species, PCA-derived scores were used as response variables in linear mixed-effects models (LMMs), with standardized edaphic C/N ratio, extractable phosphorus (P), and canopy openness included as fixed effects. A random intercept was included to account for variation among plots due to the dominant tree species. For *Lonicera periclymenum*, no random effect was included because the dataset was too limited to reliably estimate plot-level variation (**FIGURE 1.3**).

For the dominant community of the understory, after extracting PCA coordinates for all species replicates, the arithmetic mean of coordinates was calculated for each site, to obtain a single value per site. This mean represents the average position of dominant community species in PCA space and was not weighted by species abundance, as all selected species are already dominant and intended to contribute equally to the community-level metric.

This modeling approach allows testing whether the measured traits—both at the species and community scales—adequately represent the acquisition–conservation strategy, and whether this strategy varies along soil nutrient gradients or with canopy openness. Normality and homoscedasticity of model residuals were visually assessed. LMMs were fitted using Restricted Maximum Likelihood (REML), and the significance of predictors was assessed using Wald's test with Satterthwaite's method to approximate degrees of freedom (Christensen, 2018).

2.3.4 Does the acquisition-conservation strategy indicate soil C/N better than indicator values?

To evaluate whether the acquisition–conservation strategy provides a finer and more reliable proxy of soil C/N variation than traditional plant-based indicator values (IVs), the analysis was restricted to the 10 *Quercus*-dominated sites, all belonging to the RENECOFOR network. Focusing on these sites ensured sufficient sample size while minimizing potential confounding effects from differences in overstory tree species and reducing variation in other environmental conditions.

For each site, community-level values were calculated for the dominant understory species (the three constants species plus the 2–3 most abundant species per site) using two types of indicators. First, PCA coordinates representing the acquisition–conservation spectrum was averaged across the three trait measurement replicates per species, yielding a community-level estimate of functional strategy. Second, traditional IVs reflecting soil nutrient status (including the Ecoplant C/N IV, Ellenberg N, CATMINAT N, and the European baseline EIVE N) were derived from the 2015 RENECOFOR floristic inventories, ensuring consistency with the soil C/N measurements (RENECOFOR 2007–2012). Within each plot, IVs were averaged across the four inner subplots (2 × 50 m), providing a mean IV per subplot. This procedure created pseudo-replication analogous to the three trait replicates per species, allowing consistent comparison between PCA-based and IV-based indicators at community scale (**FIGURE 1.4**).

Simple linear models were then fitted to relate each response variable to the edaphic C/N ratio, and the proportion of explained variance (R^2) was compared across models. All response variables were standardized prior to analysis to facilitate direct comparison of effect sizes. Finally, one-sample t-tests ($\mu = 0$) were applied along the soil C/N gradient to identify threshold points where each indicator shifted from significantly negative to significantly positive values (or vice versa), testing whether the PCA-based acquisition–conservation proxy could detect ecologically meaningful transitions more clearly than traditional IVs (**FIGURE 1.4**).

To quantify compositional dissimilarity among *Quercus*-dominated sites, we calculated pairwise Jaccard indices based on species presence–absence data (ranging from 0 for complete similarity to 1 for maximum dissimilarity). The reference site CHS72, which exhibited the highest soil C/N ratio, was compared to the nine other *Quercus* sites ranked according to their soil C/N. This approach allowed us to visualize how understory species composition varied along the soil fertility gradient.

To assess the relative contributions of species turnover and intraspecific trait variability (ITV) to functional variation among communities across the 10 *Quercus*-dominated sites, we followed the approach of Fajardo *et al.* (2018) and calculated community means (CMs) of the PCA axis representing the acquisitive–conservative strategy. Two types of CMs were computed: CM_{fixed}, using the mean trait value of each species across all plots, which captures variation due solely to species turnover, and $CM_{specific}$, using the trait value measured locally for each species in each plot, capturing both turnover and ITV. The intraspecific component was then calculated as $CM_{intra} = CM_{specific} - CM_{fixed}$, isolating the effect of ITV.

Separate linear models were fitted for each CM type (specific, fixed, or intraspecific) against the environmental variables of interest (light or soil nitrogen). From each model, the sum of squares (SS) explained by the predictor was extracted: SS_{fixed} represents variance attributable to turnover, SS_{intra} represents variance attributable to ITV, and $SS_{specific}$ represents the total variance explained by both components.

3. RESULTS

3.1. Leaf traits variation reflects an acquisitive–conservative strategy

3.1.1 *Rubus fruticosus* agg.

The PCA of functional traits measured on *Rubus fruticosus* agg. along the edaphic nutrient gradient revealed two main axes, explaining 31.4% (axis 1) and 16.8% (axis 2) of the total trait variance (**FIGURE 2A**). Traits related to resource acquisition (light green in **FIGURE 2A**).), such as foliar C/N ratio and LDMC, were negatively correlated with axis 1 (accounting for 11.65% and 12.99% of the variance along this axis, respectively, **TABLE S2**). In contrast, traits related to resource conservation (dark green), such as foliar phosphorus concentration, were positively correlated with axis 1 (19.13% of the variance). Along axis 2, foliar calcium and magnesium concentrations contributed negatively (17.27% and 17.12% of the variance, respectively) (**FIGURE 2A**; **TABLE S2**). The distribution of individuals along these axes is presented in **FIGURE S2B**.

Substantial intraspecific variability was observed for the traits contributing most to axis 1. Traits associated with acquisitive strategies, such as foliar phosphorus, ranged from 0.72 to 2.86 $g \cdot kg^{-1}$ across sites (**FIGURE 2B**; **TABLE S3**), whereas traits associated with more conservative strategies, such as foliar C/N ratio, varied from 10.6 to 25.1 (**FIGURE S3A**; **TABLE S3**).

For *Rubus fruticosus*, individual PCA axis 1 scores were strongly correlated with the Acquisition–Conservation Score (ACS; r = 0.93; **FIGURE 2C**), confirming that axis 1 reliably captures individual positions along the acquisitive–conservative strategy.

3.1.2 Carex pilulifera

The PCA of functional traits measured on *Carex pilulifera* along the edaphic nutrient gradients identified two main axes, with axis 1 explaining 25% of the variance and axis 2 explaining 14.9%. Traits associated with resource conservation generally had positive contributions to axis 2, including total phenolics (explaining 23.23% of variance along axis 2) and LDMC (9.33% of the variance along axis 2), whereas traits linked to resource acquisition contributed negatively, such as foliar K (explaining 12.79% of the variance along axis 2, **TABLE S2**). Some exceptions were observed: foliar N/P ratios, typically considered conservation traits, had a negative contribution to axis 2 (20.41%), while acquisition traits such as foliar P content and internode length were aligned along axis 1 (explaining 12.27% and 14.99% of variance along axis 1, respectively) (**FIGURE 3A**; **TABLE S2**). The distribution of individuals along these axes is presented in **FIGURE S2B**.

Substantial intraspecific variability was observed for the traits contributing most to axis 2. Foliar K, associated with more acquisitive strategies, ranged from 12.69 to 28.42 $g \cdot kg^{-1}$ (**TABLE S3**), whereas foliar phenols and LDMC, associated with more resource-conservative strategies, varied from 2.09 to 6.57% and 0.26 to 0.82, respectively, across sites (**FIGURE 3B**; **FIGURE S3B**; **TABLE S3**). LDMC showed the largest intraspecific variability for this trait among the three constants species (**TABLE S3**).

For *Carex pilulifera*, PCA axis 2 scores were less strongly correlated with the Acquisition–Conservation Score (ACS; r = 0.58; FIGURE 3C) than for *Rubus*, but still supported its use as a proxy for the acquisitive–conservative strategy.

3.1.3 *Lonicera periclymenum*

The PCA of functional traits measured on *Lonicera periclymenum* identified two main axes, explaining 26.6% (axis 1) and 18.3% (axis 2) of the total trait variance. In contrast to *Rubus* and *Carex*, trait associations were less clearly structured along these axes, with most traits contributing to both rather than predominantly to one. LDMC was positively associated with both axes (12.42% of the variance along axis 1; 8.46% along axis 2), while foliar P concentration was negatively associated with both axes (13.39% along axis 1; 15.27% along axis 2). Internodes size and coverage was primarily associated with a single axis, contributing positively to axis 2 (13.42%) (FIGURE 4A; TABLE S2). The distribution of individuals along these axes is shown in FIGURE S2C.

Substantial intraspecific variability was observed for traits contributing most to axis 1. Foliar P concentration, reflecting more acquisitive strategies, ranged from 0.81 to 2.23 $g \cdot kg^{-1}$ across sites (FIGURE 4B; TABLE S3), whereas LDMC, reflecting more resource-conservative strategies, ranged from 0.14 to 0.35 (FIGURE S3C; TABLE S3).

For *Lonicera periclymenum*, PCA axis 1 scores were moderately correlated with the Acquisition–Conservation Score (ACS; r = 0.53; FIGURE 4C), indicating that this axis provides a weaker proxy of the acquisitive–conservative strategy compared with *Rubus fruticosus* and *Carex pilulifera*.

3.1.4 The dominant community of the understory

The PCA performed on the dominant understory community, including the three consistently present species together with two to three additional dominant species per site, identified two main axes explaining 24.3% (axis 1) and 20.1% (axis 2) of the total trait variance. Traits associated with resource acquisition generally aligned negatively with axis 2, whereas conservation traits aligned positively. Foliar C/N ratio and foliar P concentration were both negatively correlated with axis 2, accounting for 21.14% and 18.94% of the variance, respectively. Along axis 1, cellulose and calcium were the main contributors, negatively correlated with each other and explaining 25.89% and 19.76% of the variance, respectively (FIGURE 5A; TABLE S2).

Individuals exhibited clear functional segregation according to life form. Angiosperms (green dots in FIGURE 5B) were predominantly positioned on the positive side of axis 1, while ferns (blue dots) and graminoids (yellow dots) occupied the negative side. Similarly, herbaceous species (circles) clustered mostly on the negative side of axis 1, whereas lianas (triangles) and shrub-like species (squares) were mostly positive along this axis (FIGURE 5B). PERMANOVA confirmed that segregation

by life form and vegetation stratum was significant ($p = 0.001$, $R^2 = 0.34$; $p = 0.001$, $R^2 = 0.40$), supporting the observed PCA pattern.

Substantial interspecific variability was observed for the traits contributing most to axis 2. Foliar C/N ratio ranged from 10.6 to 47.3 across sites (**TABLE S3**), while foliar P concentration ranged from 0.67 to 4.08 $g \cdot kg^{-1}$ (**TABLE S3**).

For the dominant understory species, PCA axis 2 scores were moderately correlated with the Acquisition–Conservation Score (ACS; $r = 0.68$; **FIGURE 5C**), supporting its use as a proxy for positioning individuals and species along the acquisitive–conservative spectrum.

3.2. The acquisitive–conservative strategy varies along the edaphic nutrient gradient and with canopy openness

3.2.1 *Rubus fruticosus* agg.

For *Rubus fruticosus* agg., linear mixed-effects models using PCA coordinates as response variables revealed significant positive effects of edaphic C/N ratio (1.026 ± 0.239 SE, $p < 10^{-3}$) and negative effects of canopy openness (-0.595 ± 0.241 SE, $0.01 < p < 0.05$; **TABLE 2**). No significant differences in intercepts among dominant tree species were detected. Marginal and conditional R^2 values were both 0.28, indicating that the fixed effects accounted for most of the observed variation in PCA axis 1 coordinates. As illustrated in **FIGURE 2D**, axis 1 scores for *Rubus* increased with site C/N, with a slightly stronger relationship observed in *Pinus*-dominated sites.

3.2.2 *Carex pilulifera*

For *Carex pilulifera*, linear mixed-effects models indicated positive effects of edaphic P (0.671 ± 0.212 SE, $0.001 < p < 0.01$) and canopy openness (1.014 ± 0.231 SE, $p < 10^{-3}$; **TABLE 2**) on PCA axis 2 coordinates. Marginal and conditional R^2 were 0.39 and 0.43, respectively, suggesting that the fixed effects explained most of the observed variation. As shown in **FIGURE 3D**, axis 2 scores for *Carex* increased with canopy openness at Pinus- and Quercus-dominated sites, whereas a negative trend was observed at Fagus-dominated sites.

3.2.3 *Lonicera periclymenum*

For *Lonicera periclymenum*, due to the limited sample size, simple mixed linear models were used. PCA axis 1 coordinates responded positively to edaphic C/N (1.240 ± 0.269 SE, $p < 10^{-3}$; $R^2 = 0.44$), whereas axis 2 coordinates responded negatively to edaphic C/N (-0.439 ± 0.097 SE, $0.001 < p < 0.01$), edaphic P (-1.461 ± 0.095 SE, $p < 10^{-3}$), and canopy openness (-1.114 ± 0.199 SE, $p < 10^{-3}$; **TABLE 2**). **FIGURE 4D** illustrates the strong positive relationship between PCA axis 1 scores for *Lonicera* and site C/N values.

3.2.4 The dominant community of the understory

For the dominant community (composed of the three consistently present species plus 2–3 additional dominant species per site), linear mixed-effects models indicated that PCA axis 2 coordinates responded positively to edaphic C/N (0.341 ± 0.092 SE, 0.001 < p < 0.01; **TABLE 2**), with no detectable effect of dominant tree species ($R^2m = R^2c = 0.19$). As shown in **FIGURE 5D**, considering C/N alone, the relationship between site C/N and axis 2 coordinates was positive in *Quercus*- and *Pinus*-dominated sites, but negative in *Fagus*-dominated sites.

TABLE 2 Estimate coefficients (+/- SD) from linear mixed models relating PCA axis scores of traits from *Rubus fruticosus*, *Carex pilulifera*, *Lonicera periclymenum*, and the dominant species of understory to environmental gradients (edaphic C/N, edaphic P [mg/kg], and canopy openness [%]).

*Significance is indicated as *, **, *** corresponding to p < 0.05, p < 0.01, and p < 0.001, respectively. Marginal (R^2m) and conditional (R^2c) coefficients of determination are reported.*

Response variable		Explanotory variable						Model quality	
Species	PCA axes	Edaphic C/N		Edaphic P		Canopy openness		R^2m	R^2c
Rubus fruticosus	Axe 1	1.026+/- 0.239	***	-0.317+/- 0.005	ns	-0.595+/- 0.241	*	0.28	0.28
	Axe2	-0.127+/- 0.193	ns	-0.096+/- 0.197	ns	0.510+/- 0.181	**	0.11	0.40
Carex pilulifera	Axe 1	-0.543+/- 0.338	ns	0.328+/- 0.287	ns	0.486+/- 0.327	ns	0.10	0.44
	Axe2	-0.079+/- 0.227	ns	0.671+/- 0.212	**	1.014+/- 0.231	***	0.39	0.43
Lonicera peryclemenum	Axe 1	1.240+/- 0.269	***	0.039+/- 0.299	ns	-0.474+/- 0.280	ns	0.44	
	Axe2	-0.439+/- 0.195	*	-1.461+/- 0.212	***	-1.114+/- 0.199	***	0.59	
Dominant species of understory	Axe 1	-0.042+/- 0.097	ns	0.006+/- 0.099	ns	-0.062+/- 0.092	ns	0.01	0.31
	Axe2	0.341+/- 0.092	**	-0.009+/- 0.095	ns	-0.036+/- 0.093	ns	0.19	0.19

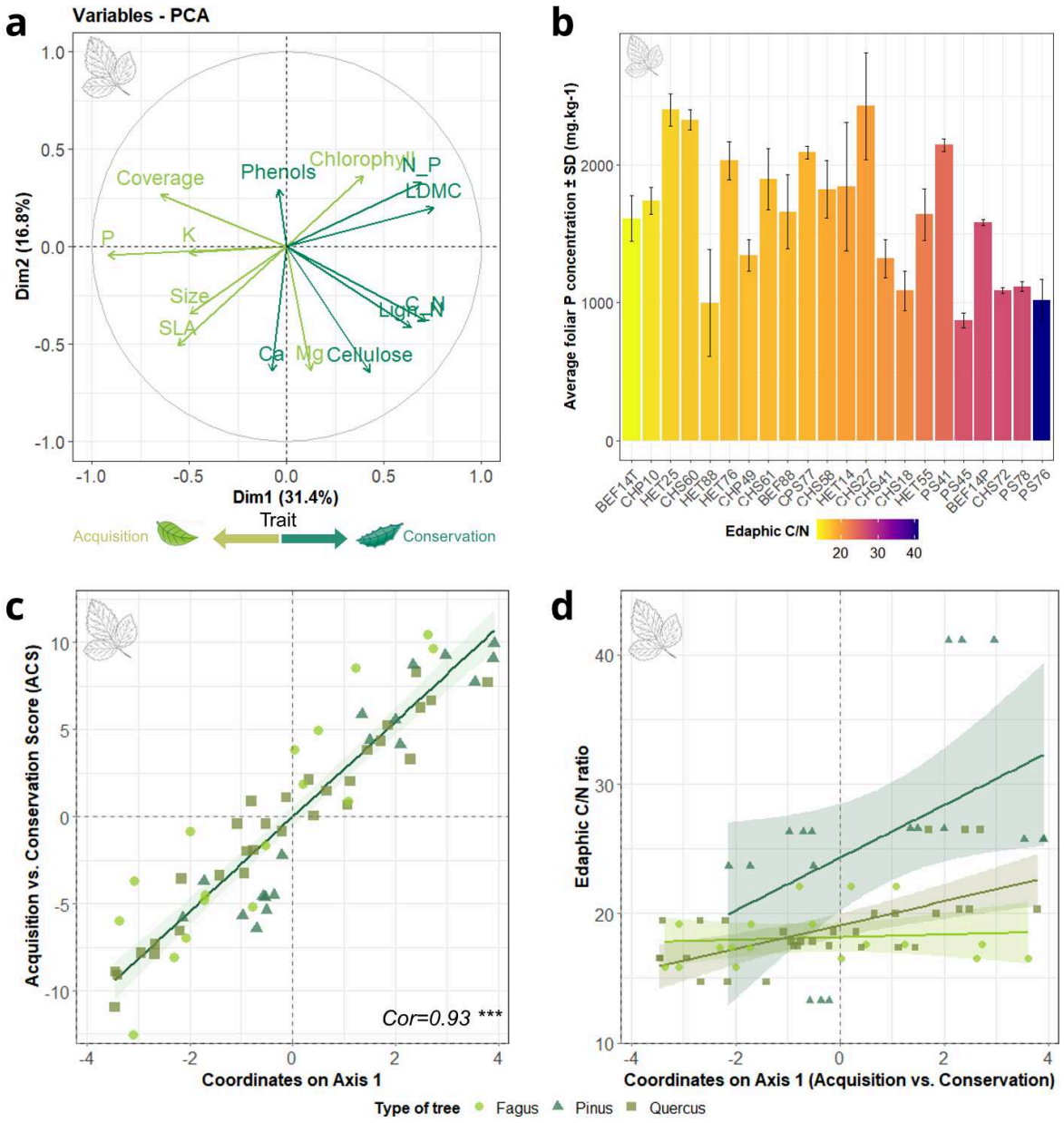


FIGURE 2 Leaf economic spectrum proxy from *Rubus fruticosus* along fertility gradients.

(a) PCA variable scores showing the contribution of each trait to the principal components. Variables correspond to selected leaf and plant functional traits.

(b) Representation of intraspecific variability in key traits contributing to the acquisition–conservation spectrum. The most responsive trait is shown in relation to its main environmental driver: Rubus fruticosus (22 sites) – LDMC vs. soil C/N ratio.

(c) Correlation between PCA Axis 1 scores and the acquisition–conservation index, calculated from literature trait values to validate Axis 1 as a proxy for the leaf economic spectrum (LES).

(d) Relationship between PCA Axis 1 scores and soil C/N ratio, with points colored and shaped according to dominant overstory type: Quercus (green squares, intermediate), Fagus (light green circles), and Pinus (dark green triangles), highlighting how LES variation aligns with soil fertility gradients.

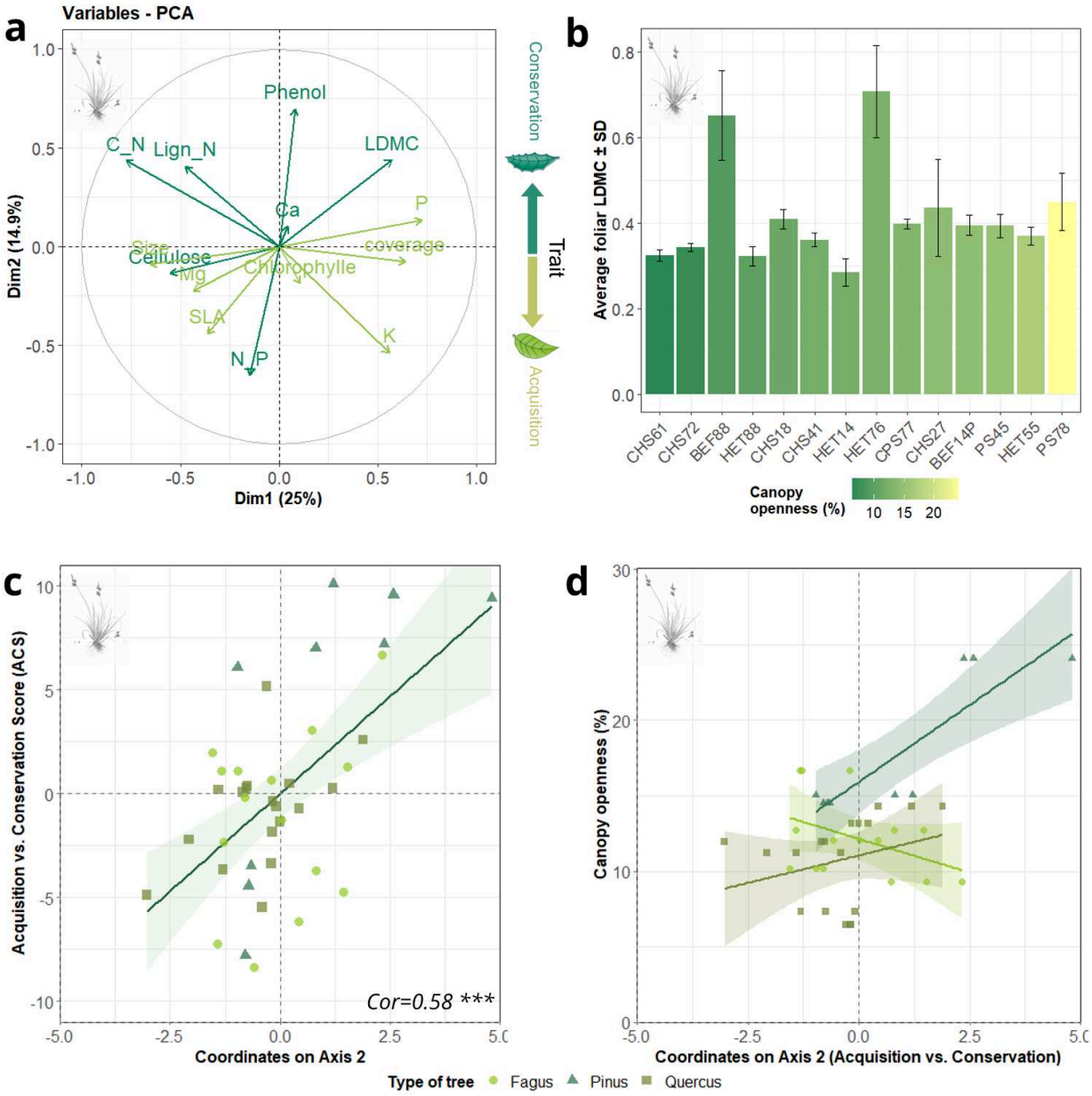


FIGURE 3 Leaf economic spectrum of *Carex pilulifera* along a soil fertility gradient.

(a) PCA variable scores showing the contribution of each trait to the principal components. Variables correspond to selected leaf and plant functional traits.

(b) Representation of intraspecific variability in key traits contributing to the acquisition–conservation spectrum. The most responsive trait is shown in relation to its main environmental driver: Carex pilulifera (14 sites) – foliar LDMC vs. canopy openness.

(c) Correlation between PCA Axis 1 scores and the acquisition–conservation index, calculated from literature trait values to validate Axis 1 as a proxy for the leaf economic spectrum (LES).

(d) Relationship between PCA Axis 1 scores and soil C/N ratio, with points colored and shaped according to dominant overstory type: Quercus (green squares, intermediate), Fagus (light green circles), and Pinus (dark green triangles), highlighting how LES variation aligns with soil fertility gradients.

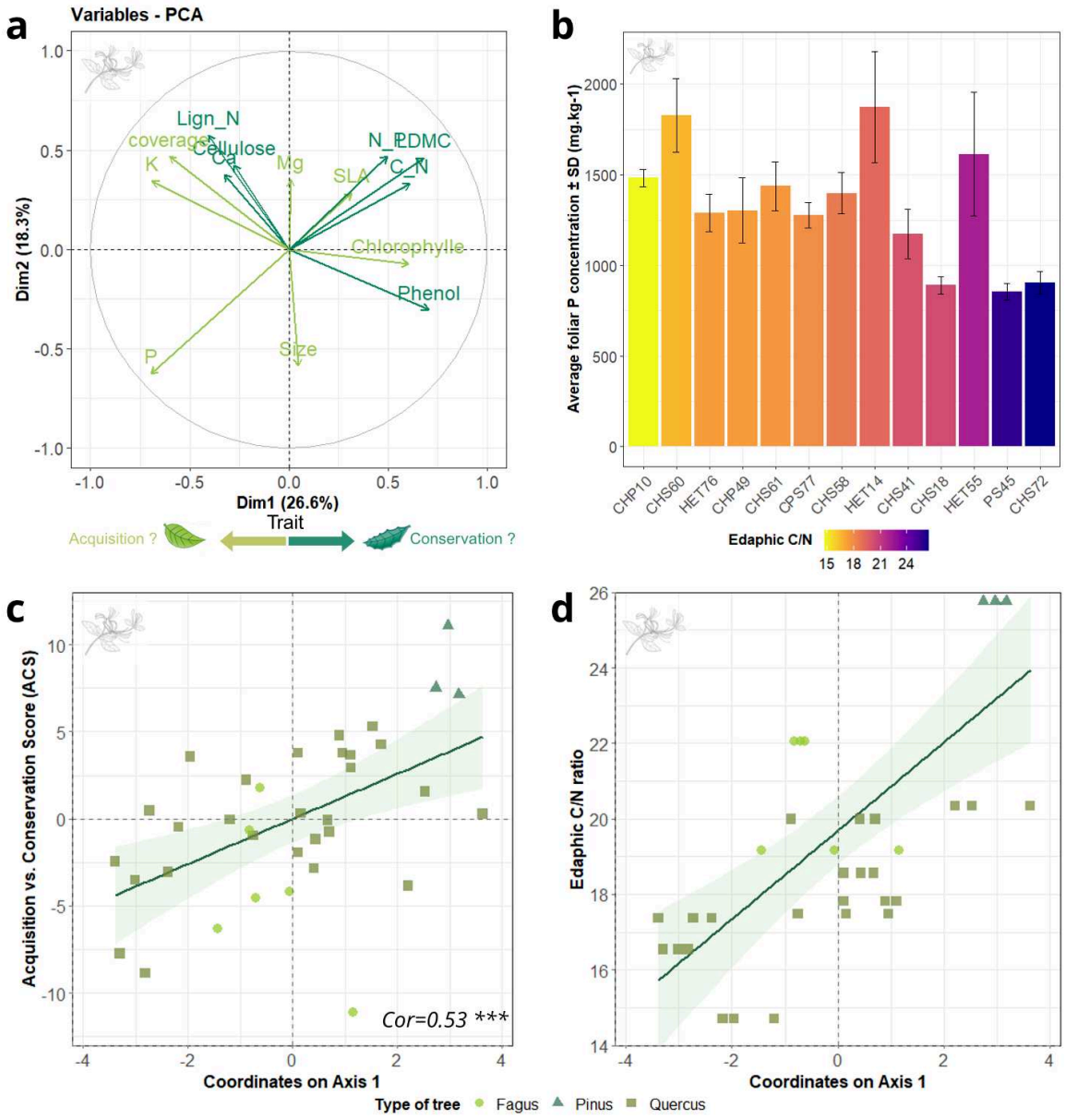


FIGURE 4 Leaf economic spectrum of *Lonicera periclymenum* along a soil fertility gradient.

(a) PCA variable scores showing the contribution of each trait to the principal components. Variables correspond to selected leaf and plant functional traits.

(b) Representation of intraspecific variability in key traits contributing to the acquisition–conservation spectrum. The most responsive trait is shown in relation to its main environmental driver: Lonicera periclymenum (12 sites) – Foliar P concentration vs. soil C/N ratio.

(c) Correlation between PCA Axis 1 scores and the acquisition–conservation index, calculated from literature trait values to validate Axis 1 as a proxy for the leaf economic spectrum (LES).

(d) Relationship between PCA Axis 1 scores and soil C/N ratio, with points colored and shaped according to dominant overstory type: Quercus (green squares, intermediate), Fagus (light green circles), and Pinus (dark green triangles), highlighting how LES variation aligns with soil fertility gradients.

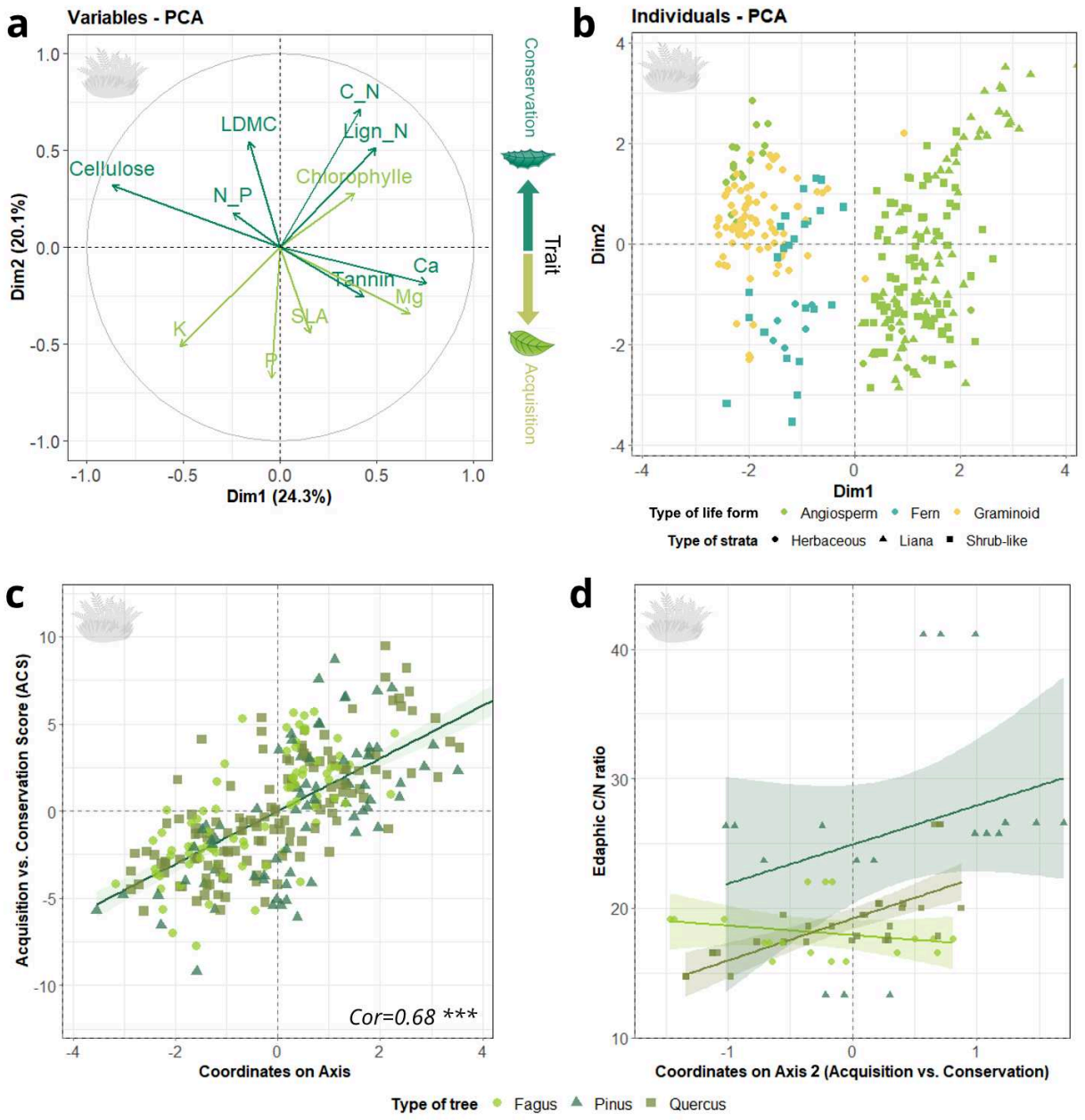


FIGURE 5 Leaf economic spectrum of the dominant understory community along a soil fertility gradient.

(a) PCA variable scores showing the contribution of each trait to the principal components. Variables correspond to selected leaf and plant functional traits of the dominant understory species.

(b) PCA individual scores as point colored by type of life form (green = forb, turquoise = fern, yellow = graminoid) and shaped according to stratum (circle = herbaceous, triangle = liana, square = shrub-like).

(c) Correlation between PCA Axis 1 scores and the acquisition–conservation index, calculated from literature trait values to validate Axis 1 as a proxy for the leaf economic spectrum (LES).

(d) Relationship between PCA Axis 1 scores and soil C/N ratio, with points colored and shaped according to dominant overstory type: Quercus (green squares, intermediate), Fagus (light green circles), and Pinus (dark green triangles), highlighting how LES variation aligns with soil fertility gradients.

3.3. Comparison of acquisition–conservation strategy and plant bioindicators along the soil C/N gradient

Across the 10 *Quercus*-dominated sites, community-level PCA axis 2 coordinates, used as a proxy for the acquisition–conservation strategy, explained the largest proportion of variance in soil C/N ratio (R^2 = 0.48), followed by Ellenberg N (R^2 = 0.39), EIVE N (R^2 = 0.15), Ecoplant C/N IV (R^2 = 0.12), and CATMINAT N (R^2 = 0.08; **FIGURE 6A–B**). Negative PCA axis 2 values corresponded to communities dominated by more acquisitive traits, typically found at sites with lower C/N ratios and higher nitrogen availability, whereas positive values reflected communities with more conservative traits associated with higher C/N ratios.

Along the soil C/N gradient, PCA axis 2 coordinates shifted from significantly negative to non-significant values between sites CHP49 (C/N = 17.372) and CHS61 (C/N = 17.485), and became significantly positive between CHS27 (C/N = 19.452) and CHS41 (C/N = 19.989), revealing clear ecological thresholds that were not captured by most traditional indicator values (**FIGURE 6A–B**). For Ellenberg N, a distinct shift from predominantly positive to negative values occurred between CHS58 (C/N = 18.567) and CHS27 (C/N = 19.452), a pattern also observed for CATMINAT N. EIVE N showed positive values up to CHS61 (C/N = 17.485), followed by significantly negative values from CHS18 (C/N = 20.340) onwards. In contrast, Ecoplant C/N IV exhibited no consistent shifts along the gradient, with changes in sign unrelated to C/N variation.

Pairwise compositional dissimilarity between sites, assessed using the Jaccard index, was maximal between CHS 72 (site with the highest soil C/N) and CHP 10 (site with the lowest soil C/N), with Jaccard = 0.71, reflecting strong differences in species composition. Similarly, sites with a more acquisitive functional structure, CHS 60 and CHP 49, showed a Jaccard dissimilarity of 0.50. For the remaining sites, Jaccard indices ranged between 0.33 and 0.50, indicating moderate variation in species composition across the soil fertility gradient (**FIGURE 7A**).

Partitioning variation in community-level PCA scores into interspecific and intraspecific components revealed that species turnover explained 54.9% of the variance, whereas intraspecific trait variability (ITV) contributed 45.1% (**FIGURE 7B**). These results indicate that both interspecific differences and within-species trait variation substantially shape functional differentiation along the acquisition–conservation spectrum in *Quercus*-dominated understory communities.

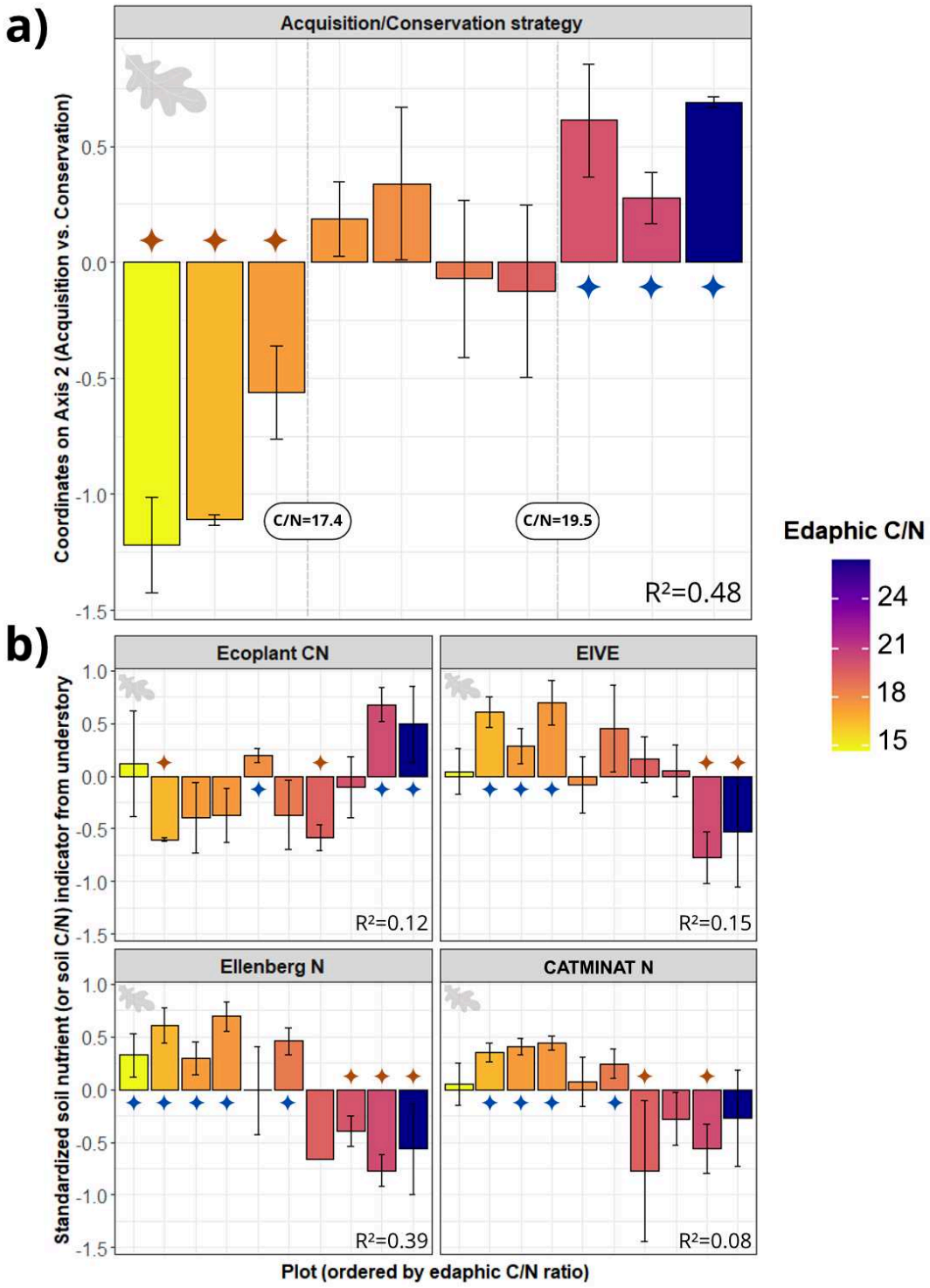


FIGURE 6 Comparison of acquisition–conservation strategies and plant bioindicators along the soil C/N gradient.

Community mean scores along PCA Axis 2, used as a proxy for the acquisition–conservation spectrum, are compared with plant indicator values (IVs) reflecting soil nutrient status, including Ecoplant C/N IV, Ellenberg N, CATMINAT N, and the European baseline EIVE N. Analyses were conducted on 10 Quercus-dominated sites from the 22 selected sites, averaging PCA Axis 2 scores across three trait measurements per dominant understory species (four to five species per site). Plant IVs were averaged within the four inner subplots (2 m × 50 m) of each plot, producing pseudo-replication analogous to the trait measurements. Simple linear models were fitted relating each response variable to edaphic C/N, with all response variables standardized for direct comparison of effect sizes (R^2). One-sample t-tests ($\mu = 0$) were applied to identify threshold points along the gradient where indicators shifted from significantly negative to significantly positive values, allowing evaluation of whether the PCA-based proxy provides a stronger and more consistent response to soil C/N than traditional plant-based bioindicators.

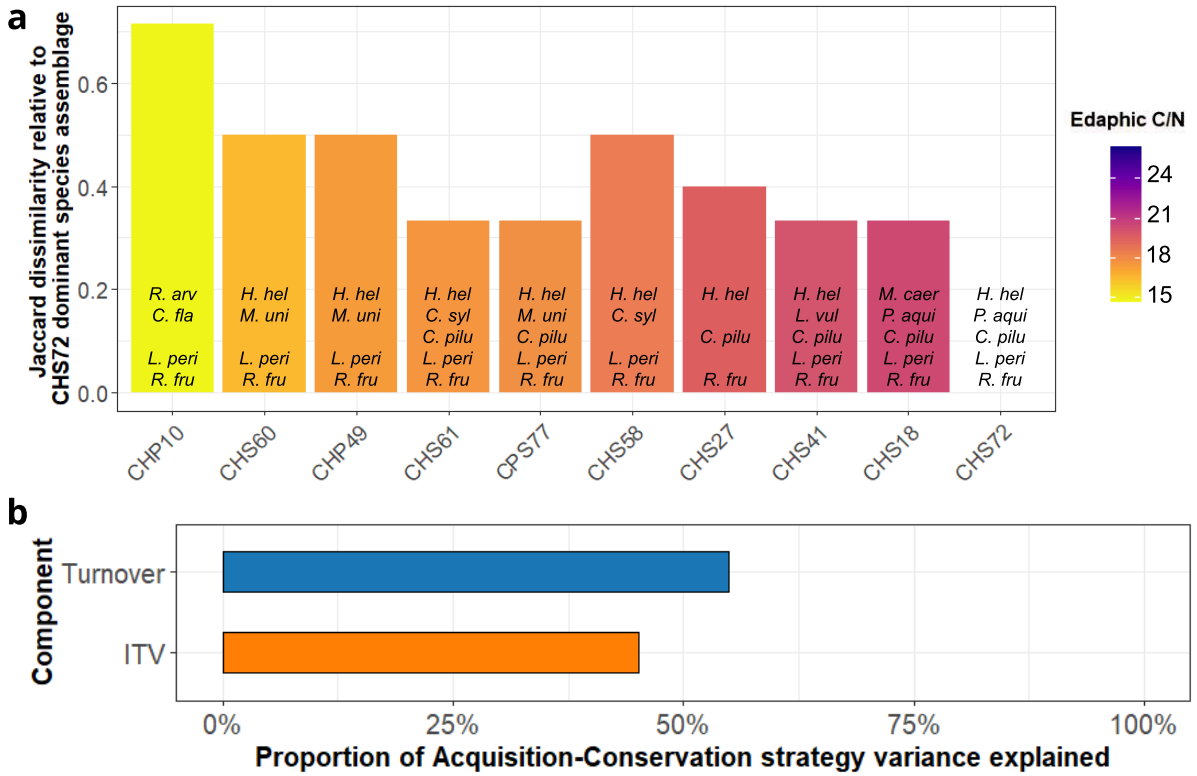


FIGURE 7 Site-level species dissimilarity (Jaccard) and partitioning of variance along the acquisition–conservation spectrum: contributions of turnover and intraspecific variability.

Functional dissimilarity and trait variance decomposition across Quercus-dominated sites. (a) Jaccard dissimilarity index between the reference site CHS 72 (site with the highest soil C/N ratio) and the nine other Quercus sites, ranked by their soil C/N. Species names are indicated on the bar plot to visualize significant differences among sites. Species codes (alphabetical order) are: C. fla – Carex flacca, C. pilu – Carex pilulifera, C. syl – Carex sylvatica, H. hede – Hedera helix, L. peri – Lonicera periclymenum, L. vul – Ligustrum vulgare, M. mol – Molinia caerulea, M. uni – Melica uniflora, P. aqui – Pteridium aquilinum, R. arv – Rosa arvensis, R. fru – Rubus fruticosus.

(b) Partitioning of functional variance along the acquisitive–conservative spectrum into contributions of species turnover and intraspecific trait variability (ITV). Community means (CM) of the PCA axis were calculated following Fajardo et al. (2018): CMfixed (using species mean traits across all plots) represents turnover-only variation; CMspecific (using local species trait values) captures both turnover and ITV; the intraspecific component was calculated as CMintra = CMspecific − CMfixed. Linear models were fitted for each CM type against environmental predictors (light or soil nitrogen), and the sum of squares explained by each predictor was used to quantify variance attributable to turnover (SSfixed), ITV (SSintra), and total variance (SSspecific).

4. DISCUSSION

In this study, we asked whether (i) leaf functional traits capture the acquisitive–conservative spectrum at individual and community levels, (ii) this spectrum varies predictably along soil nutrient gradients and canopy openness and (iii) trait-based indicators outperform traditional plant-based indicator values in reflecting soil fertility. We hypothesized that LES-linked traits forming a coherent acquisitive–conservative axis, shifts systematically with soil C/N and phosphorus, and provide a more sensitive proxy than classical IVs by integrating both species turnover and intraspecific trait variability.

4.1. Intraspecific variation shapes Leaf Economics Spectrum responses to soil fertility

Our results demonstrate that intraspecific trait variation (ITV) reflects the positions of individuals from the same species along the Leaf Economics Spectrum (LES), which represents trade-offs in leaf traits that balance resource acquisition versus conservation. In other words, the intraspecific variation we observed in foliar traits captures how individual plants adjust their functional strategy in response to local resource limitations. Across the studied taxa, soil C/N emerged as a primary driver of these trait adjustments, with higher C/N generally associated with more conservative traits, consistent with the central role of nitrogen in LES trade-offs (Reich, 2014; Kazakou *et al.*, 2014). These patterns highlight that ITV for foliar traits can serve as a mechanistic indicator of soil fertility, although the magnitude and clarity of this signal depend on species life form and ecological strategy (Niinemets *et al.*, 2015; Fajardo *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2023).

4.1.1 *Rubus fruticosus* agg.

Rubus fruticosus agg. exhibited pronounced intraspecific plasticity in response to local soil conditions, particularly for foliar P (0.72–2.86 $g \cdot kg^{-1}$) and foliar C/N (10.6–25.1; **TABLE S3**). Higher foliar C/N ratios were associated with more conservative resource-use strategies, whereas higher foliar P concentrations corresponded to more acquisitive ones. Along the soil C/N gradient, individuals shifted from acquisitive (high N available) to conservative strategies (low N available), reflecting functional adjustments that enable the species to persist across contrasting edaphic conditions.

This pattern aligns with observations in related species, such as *Rubus allegheniensis*, which shows increased foliar nitrogen and altered nutrient composition under long-term nitrogen deposition (Gilliam *et al.*, 2018). In addition to soil-driven variation, canopy openness further influenced foliar traits, consistent with the documented plasticity of *Rubus*. Balandier *et al.* (2013) demonstrated that light availability under the canopy strongly affects growth, leaf density, and understory occupancy. In our study, similar traits (leaf size, LDMC, and coverage) contributed substantially to variance along PCA axis 1, highlighting the combined effects of light and nutrient availability on the acquisition–conservation spectrum.

Although the species has a single indicator value theoretically representing its optimal conditions, its broad ecological amplitude, reflected in its consistent presence across the nutrient

gradient, prevents this value from distinguishing soil fertility among sites. In contrast, foliar traits vary significantly with edaphic and light conditions, making them reliable indicators of local soil nutrient and light availability. Overall, these results suggest that the phenotypic plasticity of *R. fruticosus* agg. limits the informativeness of traditional indicator values while enhancing the relevance of these traits-based bioindication.

4.1.2 *Carex pilulifera*

Carex pilulifera exhibited notable intraspecific trait variation, particularly in foliar phenols (2.09–6.57%), foliar K (16.39–22.28 $g \cdot kg^{-1}$), and LDMC (0.26–0.82; Table S3). Higher foliar phenols and foliar K concentrations were associated with more acquisitive resource-use strategies, whereas higher LDMC reflected more conservative ones. This variation largely structured the species' position along the acquisition–conservation spectrum, driven primarily by canopy openness and, to a lesser extent, by soil phosphorus availability, with no detectable response to soil C/N. These patterns are consistent with previous studies indicating that intraspecific trait variation (ITV) in the *Carex genus* is context-dependent, influenced by both edaphic conditions and light availability. For instance, ITV in *Carex buekii* (Wieclaw *et al.*, 2022), *C. rostrata* (Hinzke *et al.*, 2022), and *C. parva* (Liu *et al.*, 2024) showed that foliar traits respond primarily to edaphic potassium and phosphorus, whereas belowground traits, such as root biomass, rhizome number, and rhizome length, are more sensitive to nitrogen. This differential sensitivity may explain why foliar traits of *C. pilulifera* respond to soil P, but not to C/N.

Examining individual traits, LDMC (whose intraspecific variability contributes substantially to the acquisition–conservation spectrum) was positively correlated with canopy openness (**FIGURE S4**). This aligns with Heinrich *et al.* (2012), who reported that under higher light conditions, *C. pilulifera* develops denser tissues with thicker secondary cell walls, more sclerenchyma, and higher overall cell density, resulting in increased LDMC. Such mechanisms likely explain the significant relationship between canopy openness and PCA axis 2, used here as a proxy for the acquisition–conservation spectrum. In our study case, canopy openness is less than 25%, insufficient value to demonstrate an effect on the anatomic structure of individuals and therefore a marked shift between conservation et acquisition strategies.

In contrast, foliar K and phenol concentrations were not significantly correlated with the measured environmental variables (soil P, C/N, or canopy openness, **FIGURE S4**). The observed ITV in foliar phenols may reflect grazing or herbivory pressure from small mammals or insects (Erdenetsogt *et al.*, 2024), whereas variability in foliar K could result from differences in soil moisture availability (Wieclaw, 2022).

4.1.3 *Lonicera periclymenum*

Although *Lonicera periclymenum* exhibits substantial intraspecific trait variation, the alignment of these traits along the acquisition–conservation spectrum is less clear than in the other taxa. Leaf traits, including leaf dry matter content (LDMC) and foliar phosphorus content, varied systematically among

individuals. Higher LDMC was associated with more conservative strategies, while higher foliar P corresponded to more acquisitive strategies. Individual positions along this spectrum were strongly related to soil C/N, with conservative individuals occurring on high C/N sites and acquisitive individuals on low C/N sites, consistent with the predicted trade-offs in resource acquisition, growth, and tissue conservation (Wright *et al.*, 2004; Reich, 2014).

In addition to leaf traits, morphological traits, such as internode length (3.1–48.8 cm) and plant coverage (1–38.7 %), also exhibited substantial intraspecific variation. Unlike LDMC or foliar P, these traits contributed little to variance along PCA axis 1, which represents the acquisition–conservation spectrum, but contributed more strongly to PCA axis 2. Individual positions along this axis were strongly related to canopy openness, with internode length increasing in more open sites (**FIGURE S4**). This pattern suggests that internode length and ground coverage primarily reflect performance- or fitness-related responses, such as adjustments in light capture or spatial occupation (Shipley *et al.*, 2006; Violle *et al.*, 2007).

Together, these results indicate that intraspecific trait variation in *L. periclymenum* illustrates two distinct functional responses: one related to the acquisition–conservation spectrum and driven by soil nutrient availability, and the other reflecting fitness-related adjustments to light conditions. Overall, intraspecific variation combines functional strategy, captured by leaf traits, and performance responses, captured by morphological traits. Aggregating diverse traits in a single PCA can dilute the clear expression of the acquisition–conservation strategy when traits responding to other ecological factors are included, highlighting the need to select traits that are both species- and context-specific for ecological bioindication.

4.2. Leaf trait variability at the community scale reveals a clear acquisitive–conservative spectrum and outperforms classical indicators along edaphic C/N gradients

Dominant understory species exhibited substantial intra- and interspecific variability in foliar traits, particularly for foliar C/N and LDMC—both associated with conservative strategies—and for SLA and foliar P, which characterize acquisitive strategies. These patterns provide further evidence that variation in key traits defining the Leaf Economics Spectrum (LES) can robustly capture the trade-off between resource acquisition and conservation (Wright *et al.*, 2004; Reich, 2014).

At the community level, the individuals' position along this functional spectrum strongly and exclusively correlated with soil C/N ratio. Communities occurring on low soil C/N sites were dominated by individuals expressing acquisitive strategies (high SLA, high foliar P, low LDMC), whereas high C/N sites were associated with more conservative strategies (high LDMC, low SLA, low foliar P). This relationship is consistent with previous studies showing that nutrient limitation induces functional adjustments in leaf traits, leading plants to adopt more conservative strategies that maximize nutrient retention and efficiency (Pérez-Ramos *et al.*, 2012; Delpiano *et al.*, 2020).

Within the community, individual positions along the PCA were strongly influenced by plant type and life form and stratum. Herbaceous species, whether graminoids or angiosperms, displayed predominantly conservative functional strategies, whereas lianas and shrubs were distributed more evenly along the acquisition–conservation spectrum. This pattern suggests that, for lianas and shrubs, most functional variability occurs within these life forms, reflecting differences among individuals and the combined influence of species turnover and intraspecific trait shifts (Garnier *et al.*, 2004; Delpiano *et al.*, 2020).

This differentiation among life forms was mainly driven by the first PCA axis, which was strongly associated with foliar cellulose and, to a lesser extent, with lignin/N and tannin concentrations. These results are consistent with previous studies showing that woody plants, such as shrubs and lianas, generally have higher lignin and tannin content than herbaceous species (Mahieu *et al.*, 2021).

Recent studies have emphasized that these secondary traits, while not directly part of the Leaf Economics Spectrum (LES), interact with traits such as SLA and nutrient content to shape plant functional strategies. For instance, cellulose is positively associated with structural defense, while tannins contribute to chemical defense, indicating that these traits complement the LES in determining species' ecological responses (Mohanbabu *et al.*, 2023). In this sense, the first PCA axis not only reflects physiological differences among life forms but may also represent a defensive adaptation axis.

Despite the clear ecological signal captured by leaf traits, direct comparisons between trait-based community metrics and traditional plant indicator values (e.g., Ellenberg N, Ecoplant C/N IV, CATMINAT N, EIVE N) remain rare. Our study provides such a comparison under relatively homogeneous conditions in *Quercus*-dominated plots, highlighting the added value of a trait-based approach. The PCA-derived community axes, reflecting the acquisitive–conservative spectrum, explained a larger proportion of variance along the soil C/N gradient than most classical indicator values (R^2 = 0.48 for PCA axis 2 vs. 0.08–0.39 for the IVs). This demonstrates that the acquisition–conservation framework, as used in our study, captures soil fertility gradients more consistently and robustly than traditional bioindicators, emphasizing its potential as a more sensitive tool for community-level ecological assessment.

Beyond this quantitative pattern, PCA scores revealed both gradual trends and two distinct threshold points along the soil C/N gradient, marking shifts from predominantly acquisitive to intermediate, and from intermediate to predominantly conservative community strategies. In our dataset, these transitions occurred around C/N ≈ 17.4–17.5 and 19.5–20.0, providing novel reference points for functional reorganization in temperate forest understories. Between these thresholds, variations in soil processes, such as organic matter decomposition and the resulting nutrient

availability (Berg *et al.*, 2014), likely modulate species' resource acquisition capacities, thereby driving shifts in community functional composition (Reich *et al.*, 2014).

Analysis of Jaccard dissimilarity further showed that sites below the first threshold, dominated by acquisitive strategies, differed more strongly in species composition from CHS 72 (the site with the most conservative strategy) than sites above the threshold. This pattern suggests that the first threshold coincides with substantial species turnover, restructuring the community's functional organization. For instance, *Carex pilulifera* appeared only above this threshold, whereas *Carex sylvatica* and *Melica uniflora* were restricted to sites beyond the second one.

Despite this turnover, three species (*Rubus fruticosus*, *Lonicera periclymenum*, and *Hedera helix*) were present across almost the entire gradient. Among the ten sites, nine shared at least two of these species, and seven shared all three, underscoring their broad ecological amplitude and the important role of intraspecific trait variation (ITV) in fine-tuning community-level functional responses. ITV accounted for approximately 45% of the variation in community positioning along the acquisition–conservation spectrum, with species turnover explaining the remaining 55%, consistent with the findings of Fajardo *et al.* (2018). In the context of bioindication, trait-based approaches outperform classical indicator values (IVs) in detecting soil C/N variation, as IVs fail to capture intraspecific variability and the ecological amplitude of species, effectively missing nearly half of the information present in functional traits.

Overall, our results demonstrate that trait-based approaches provide a more mechanistic, flexible, and sensitive framework for bioindication than traditional indicator values. By integrating both inter- and intraspecific variability, trait-based metrics capture not only species turnover but also functional adjustments within species that accompany changes in soil fertility. In contrast, classical indicator values remain constrained by fixed species-level scores that cannot account for phenotypic plasticity or local responses. Consequently, trait-based indicators offer a more direct link between plant physiology and ecosystem processes, enabling the detection of subtle environmental gradients and early signs of soil chemical shifts. This functional perspective therfore represents a major step forward for ecological monitoring, allowing bioindication to move from a correlative, species-based framework toward a predictive, process-based understanding of ecosystem functioning.

4.3. Limitations and perspectives

Our study considered the 4–5 dominant understory species per site, a choice aimed at capturing the main functional signal driving community-level responses along nutrient gradients. This selection allowed clear patterns to emerge, demonstrating that dominant species effectively track shifts in soil C/N and resource availability. While including additional, less abundant species might provide a more complete view of community functioning and help identify early-warning indicators of soil fertility changes, our results suggest that dominant species alone carry a robust signal. Moreover, the

community-level index was calculated without weighting by species abundance, consistent with the methodology of traditional plant-based indicator values, which often perform better under unweighted approaches (Diekmann, 2003; Schaffers & Sýkora, 2000; Ewald, 2003; Zelený, 2018). This alignment ensures a meaningful comparison between trait-based and IV-based metrics. Nonetheless, in communities with very few dominant species, overemphasis on a single species could potentially bias interpretations, highlighting a direction for further investigation.

We focused on foliar and some stem traits, capturing key dimensions of the Leaf Economics Spectrum (LES), while acknowledging that root and mycorrhizal traits are likely important for fully representing phosphorus gradients and belowground resource dynamics (Laliberté, 2017; Freschet *et al.*, 2021). Trait measurements were taken at a single point in time and do not reflect seasonal or interannual variability, yet all sampling was conducted under comparable weather conditions, providing a consistent snapshot of functional strategies. Despite these limitations, our results highlight the potential of trait-based bioindication. *Carex pilulifera* emerged as a sensitive but context-dependent indicator, responding to soil P and light gradients, while *Lonicera periclymenum* complemented these patterns by capturing additional ecological dimensions such as edaphic C/N. Notably, *Rubus fruticosus* agg., despite encompassing closely related species with similar morphology and ecological niches, consistently formed a clear LES and tracked soil C/N gradients, demonstrating its practical value as a bioindicator and supporting the robustness of LES-based approaches for monitoring forest understory fertility (Gilliam *et al.*, 2018; Taylor, 2005).

Several avenues exist to improve and generalize trait-based bioindication. Integrating root economic spectrum (RES) and mycorrhizal traits could better capture nutrient acquisition–conservation trade-offs (Laliberté, 2017). Combining multiple scales (including intraspecific trait variation, community-weighted means, and classical indicator values) may yield hybrid metrics with greater sensitivity and ecological relevance (Fajardo *et al.*, 2018; Gaüzere *et al.*, 2019). Applying this framework across different biogeographic contexts and temporal series could assess its responsiveness to environmental change, following approaches developed in global trait databases and long-term forest monitoring (Kattge *et al.*, 2020). Linking functional thresholds to operational management classes could further inform forest monitoring and planning (Lavorel & Grigulis, 2012).

Finally, trait-based approaches remain more time- and resource-intensive compared to readily available indicator values. Identifying individual traits that are easy to measure yet consistently respond to soil fertility gradients could streamline monitoring while preserving mechanistic insight. Overall, despite some limitations, our results demonstrate that trait-based metrics provide a robust and mechanistically interpretable foundation for bioindication in temperate forest understories.

Discussion générale

I. Préambule

Ce travail de thèse visait à évaluer dans quelle mesure la végétation du sous-bois des forêts tempérées françaises reflète les dynamiques temporelles des conditions édaphiques. Trois objectifs complémentaires ont guidé cette démarche :

(i) Évaluer dans quelle mesure la flore du sous-bois reflète les dynamiques des conditions édaphiques à travers la composition floristique des assemblages d'espèces exprimées.

Hypothèse 1 (H1) : conformément à l'hypothèse admise dans la littérature, la composition floristique du sous-bois constitue un indicateur fiable des conditions édaphiques, traduisant à la fois leur distribution spatiale et leurs dynamiques temporelles à l'échelle des forêts françaises.

(ii) Tester l'apport de la diversité sombre pour compléter et affiner la bioindication temporelle.

Hypothèse 2 (H2) : la prise en compte de la diversité sombre, c'est-à-dire des espèces absentes mais qui devraient être présentes, permet de compléter et d'améliorer la bioindication temporelle des conditions édaphiques.

(iii) Examiner la variabilité inter- et intraspécifique des traits fonctionnels relevant du *Leaf Economics Spectrum* des espèces du sous-bois, le long d'un gradient de nutriments du sol**,** afin d'évaluer dans quelle mesure ces traits influencent la capacité du sous-bois à refléter les dynamiques édaphiques**.**

Hypothèse 3 (H3) : la variabilité inter- et intraspécifique des traits fonctionnels foliaires des espèces du sous-bois, reflétant le Leaf Economics Spectrum, illustre les changements de stratégies acquisition–conservation le long des gradients édaphiques de disponibilité en nutriments et constitue un indicateur précis et sensible de la fertilité du sol.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons mobilisé les données floristiques et édaphiques issues du réseau RENECOFOR, en combinant des analyses de composition floristique, des estimations de diversité sombre et une exploration des traits fonctionnels des espèces du sous-bois. La présente discussion propose de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus, de les confronter aux connaissances actuelles et d'en dégager les implications pour la compréhension des relations entre flore du sous-bois et dynamiques édaphiques en forêt tempérée.

UNDERSTORY PLANT INDICATOR VALUES POORLY PERFORM AT MONITORING CHANGES IN FRENCH FOREST SOIL CHEMICAL PROPERTIES

Dans le premier chapitre, nous avons examiné dans quelle mesure les communautés végétales du sous-bois pouvaient traduire les changements temporels dans les propriétés du sol, en nous appuyant sur des indices communautaires de condition du sol (ICS), calculés à partir des valeurs indicatrices des espèces. Si ces indices sont bien établis pour caractériser les gradients de propriétés édaphiques exprimés spatialement, leur sensibilité aux changements à long terme restait jusqu'alors peu documentée.

Pour explorer cette question, nous avons combiné six campagnes de suivi floristique (1995-2021) avec deux périodes d'échantillonnage/caractérisation des sols (1993–1997 et 2007–2012) menées sur 102 placettes permanentes réparties à travers la France métropolitaine. Nous avons comparé les dynamiques temporelles des ICS à celles du pH, du rapport C/N et du phosphore assimilable mesurés dans le sol, à la fois à l'échelle nationale, via des modèles à effets mixtes, et au niveau de chaque placette, à l'aide de modèles linéaires.

Les résultats ont révélé qu'aucune relation significative n'émerge entre la dynamique des ICS et la dynamique des propriétés édaphiques, ni à l'échelle nationale, ni au niveau des placettes. Les variations observées dans le sol étaient principalement liées aux conditions édaphiques initiales et à l'âge des peuplements, tandis que celles des ICS reflétaient surtout l'ouverture de la canopée et les perturbations anthropiques, comme les éclaircies ou l'exploitation forestière.

Ces observations mettent en lumière la sensibilité limitée de la flore du sous-bois pour détecter les changements édaphiques à long terme, en particulier lorsque ceux-ci sont modestes, et remettent en question l'usage des ICS comme bioindicateurs des dynamiques temporelles des conditions du sol.

FROM DARK TO CLEAR: DARK DIVERSITY IMPROVES THE TEMPORAL AND SPATIAL BIOINDICATION OF EDAPHIC CONDITIONS IN FRENCH ICP FORESTS

Dans le deuxième chapitre, nous avons intégré le concept de diversité sombre, c'est à dire l'ensemble des espèces du pool régional absentes d'un site mais dont les exigences écologiques sont compatibles avec ses conditions locales, au principe de bioindication. L'objectif était d'améliorer la fiabilité de la bioindication du sous bois en prenant en compte ces espèces absentes pour des raisons stochastiques, mais porteuses d'une information pertinente sur l'état de leur environnement.

Pour cela, nous avons exploité les relevés floristiques et les mesures de sol de 99 placettes permanentes du réseau RENECOFOR, sur la période 1995–2015. La diversité sombre a été estimée à l'aide d'une méthode probabiliste, permettant de constituer deux ensembles complémentaires : la diversité sombre elle même et le pool d'espèces spécifiques à chaque site, correspondant à l'assemblage de la diversité observée et de la diversité sombre. Pour chacun de ces ensembles, nous avons calculé un ICS relatif au rapport C/N du sol, modélisé leurs dynamiques à l'échelle nationale et locale, et comparé les résultats aux évolutions mesurées dans le sol. Nous avons enfin étudié le turnover des espèces entre 1995 et 2015 au sein de ces différents ensembles.

Les résultats montrent que la prise en compte de la diversité sombre et du pool spécifique améliore significativement la bioindication, tant sur le plan spatial que temporel. La diversité sombre a notamment permis de détecter l'augmentation du rapport C/N du sol au cours des deux décennies étudiées, alors que la végétation observée seule suggérait une stabilité. L'analyse du turnover a révélé que ce sont principalement les échanges entre diversité observée et diversité sombre, et non les gains ou pertes du pool spécifique, qui expliquent l'évolution des valeurs indicatrices.

Ces observations indiquent que la combinaison de diversité sombre et d'analyse du turnover constitue un cadre robuste pour « restaurer » la cohérence entre les dynamiques des conditions édaphiques mesurées et celles bioindiquées par la végétation exprimée seule, afin d'améliorer le suivi des changements dans les écosystèmes forestiers.

LEAF ECONOMICS SPECTRUM TRAITS OUTPERFORM TRADITIONAL INDICATOR VALUES IN DETECTING SOIL NUTRIENT GRADIENTS

Dans le troisième chapitre, nous avons exploré l'intérêt des mesures des traits fonctionnels foliaires pour améliorer la bioindication de la fertilité du sol par rapport aux valeurs indicatrices classiques. L'idée était que les traits représentatifs du *Leaf Economic Spectrum* (LES) offrent un lien mécanistique entre la variabilité intra- et interspécifique des stratégies des plantes et la disponibilité en nutriments, et pourraient ainsi détecter plus finement les gradients de fertilité du sol que les indicateurs traditionnels, limités à la seule variabilité interspécifique.

Pour tester cette approche, nous avons resconstitué un gradient de fertilité du sol en sélectionnant vingt-deux sites forestiers suivis à long terme dans le cadre des réseauxRENECOFOR et BEF, couvrant de larges gradients de rapport C/N et de phosphore assimilable édaphiques. Sur ces sites, nous avons combiné des mesures de traits du LES sur trois espèces du sous-bois largement répandues (*Rubus fruticosus* agg., *Carex pilulifera* et *Lonicera periclymenum*) avec des mesures sur les espèces dominantes du sous-bois. Les traits foliaires analysés, reflétant les stratégies d'acquisition et de conservation des ressources, ont été comparés aux valeurs indicatrices classiques afin d'évaluer leur sensibilité aux variations édaphiques.

Les résultats montrent que les traits du LES permettent de caractériser de manière cohérente les stratégies acquisitives et conservatrices, tant au niveau des espèces que des assemblages d'espèces dominantes, et que ces stratégies évoluent clairement le long des gradients de nutriments, les sols peu fertiles favorisant les stratégies conservatrices et les sols fertiles les stratégies acquisitives, comme attendu. À l'échelle de l'assemblage des espèces dominantes, le changement de stratégie le long du gradient de fertilité s'explique presque autant par le turnover d'espèces que par la variabilité intraspécifique. Les indicateurs fondés sur les traits révèlent ainsi des réponses plus nettes et plus sensibles à la fertilité du sol que les valeurs indicatrices traditionnelles, qui ne considèrent que le turnover spécifique.

Dans cette discussion générale, nous aborderons dans un premier temps les approches méthodologiques développées au fil des trois chapitres, en mettant en lumière leurs forces, leurs limites et les complémentarités qu'elles offrent pour l'étude de la bioindication. Nous examinerons ensuite les principaux résultats obtenus, en articulant les apports respectifs des valeurs indicatrices classiques, de la diversité sombre et des traits fonctionnels relevant du *Leaf Economics Spectrum*. Cette synthèse visera à répondre, de manière critique et intégrée, à la question centrale de ce travail : **dans quelle mesure la dynamique de la végétation du sous-bois reflète-t-elle fidèlement les variations temporelles des conditions édaphiques ?**

2. Discussion méthodologique

2.1. Analyse comparative des dynamiques des conditions édaphiques et des communautés floristiques à l'échelle nationale

Le réseau RENECOFOR, présenté dans l'INTRODUCTION GÉNÉRALE de ce travail, assure depuis trois décennies le suivi spatial et temporel de la flore du sous-bois au moyen d'inventaires floristiques réguliers, parallèlement à l'évaluation des conditions édaphiques à travers des campagnes d'analyses de sol. Il constitue ainsi une base de données unique en France, permettant de confronter directement, à large échelle spatiale et temporelle, les mesures physico-chimiques du sol et les informations bioindiquées par la végétation.

Cette comparaison s'est toutefois heurtée à une contrainte majeure : seules deux campagnes d'échantillonnage du sol ont été menées (la première entre 1993 et 1997, la seconde entre 2007 et 2012), tandis que les inventaires floristiques ont été réalisés tous les cinq ans depuis 1995. Cette différence de fréquence, combinée à l'asynchronie dans la collecte des deux jeux de données, a nécessité des ajustements spécifiques afin d'évaluer la correspondance entre propriétés édaphiques mesurées et conditions bioindiquées.

L'étendue spatiale du réseau a soulevé un second enjeu. Étudier les dynamiques temporelles à l'échelle nationale demeure un exercice délicat lorsque les données proviennent d'un dispositif conçu pour couvrir l'ensemble du gradient écologique et pédoclimatique français. La forte hétérogénéité des sites, reflet de cette diversité, accroît la complexité d'interprétation des signaux à grande échelle et peut atténuer certaines tendances générales.

Face à ces contraintes, plusieurs choix analytiques ont été nécessaires. Ils demeurent discutables et invitent à s'interroger sur la sensibilité des résultats aux méthodes employées. Les sections suivantes proposent d'examiner ces choix et d'en discuter la portée.

2.1.1 Ecart entre deux dates ou dynamique annuelle

L'étude comparative des dynamiques des conditions édaphiques mesurées et de celles bioindiquées par la végétation s'est trouvée limitée par la fréquence et l'asynchronie de leur suivi. Les campagnes d'analyses physico-chimiques des sols du réseau RENECOFOR sont nécessairement espacées dans le temps, en raison de la complexité logistique, du coût et du volume des mesures à réaliser. Leur mise en œuvre repose sur une équipe resserrée de techniciens de R&D formés aux protocoles d'échantillonnage des sols, ainsi que sur une main-d'œuvre conséquente dédiée à l'échantillonnage des 102 placettes réparties sur l'ensemble du territoire. Les analyses, centralisées au Laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRAE (Arras, France), s'étalent ensuite sur plusieurs années. Cette organisation explique la faible fréquence des campagnes (environ une tous les quinze ans) ainsi que leur durée prolongée (quatre à cinq ans par cycle). Ce rythme est également cohérent avec la dynamique généralement lente des propriétés des sols, pour lesquelles on ne s'attend pas à observer

des évolutions significatives à des pas de temps très resserrés. La troisième campagne, actuellement en cours, devrait s'achever d'ici cinq ans, une fois l'ensemble des échantillons collectés et analysés.

À l'inverse, les inventaires floristiques, réalisés par un réseau de botanistes extérieurs à l'ONF selon un protocole standardisé, sont non destructifs, rapides et ne nécessitent pas d'analyses a posteriori. Ces caractéristiques autorisent un suivi quinquennal de la flore du sous-bois. Ainsi, pour la période étudiée, deux campagnes de caractérisation des sols correspondent à six inventaires floristiques

Pour comparer les dynamiques des conditions édaphiques mesurées et bioindiquées tout en tenant compte de l'asynchronie des suivis, nous avons d'abord retenu les inventaires floristiques coïncidant avec les campagnes de caractérisation des sols. La première (1993–1997) a été associée à l'inventaire de 1995, et la seconde (2007–2012) à celui de 2015, préféré à 2010 car couvrant l'ensemble du réseau. L'écart entre les valeurs mesurées dans la couche minérale superficielle (0–10 cm) lors des deux campagnes a ensuite été calculé, puis mis en relation avec la variation des valeurs bioindiquées entre 1995 et 2015 (**FIGURE 1**). Cette approche, similaire à celles de Baeten *et al.* (2009) ou de McGovern *et al.* (2011), visait à déterminer si les variations mesurées du sol étaient reflétées par la flore. Aucune corrélation significative n'a été observée pour les conditions édaphiques testées (pH, rapport C/N, phosphore assimilable), suggérant que la flore du sous-bois ne traduit pas directement les variations temporelles des propriétés du sol sur le réseau RENECOFOR (**FIGURE 1**).

Cependant, cette première approche ne mobilisait pas l'ensemble des données floristiques disponibles. Ignorer les inventaires intermédiaires de 2000, 2005 et 2010 revenait à négliger l'un des principaux atouts du réseau : la possibilité d'un suivi continu et détaillé de la dynamique floristique sur placettes permanentes. Exploiter la série complète 1995–2015 offrait la possibilité d'examiner si la trajectoire temporelle de la végétation révélait un signal plus cohérent avec les variations observées dans le sol. Cette réflexion a conduit à l'adoption d'une seconde approche, plus intégrative.

Comme présenté dans les **CHAPITRES 1** et **2** de ce travail, nous avons mobilisé l'ensemble des inventaires floristiques du réseau afin de déterminer les dynamiques bioindiquées des conditions édaphiques, à la fois à l'échelle nationale et à celle des placettes. À l'instar de Richard *et al.* (2021), nous avons utilisé des modèles statistiques estimant la variation annuelle des valeurs indicatrices à l'échelle des communautés. La même démarche a été appliquée aux mesures de sol, permettant de comparer les dynamiques annuelles malgré l'asynchronie et la différence de période des inventaires. Les résultats mettent en évidence un découplage entre les dynamiques mesurées et bioindiquées.

Si la robustesse de la modélisation est bien établie pour la flore, grâce aux six dates disponibles et aux nombreuses répétitions par placette, elle peut sembler plus limitée pour le sol, où seules deux campagnes sont disponibles. Toutefois, celles-ci couvrent l'ensemble du réseau et s'étendent sur des périodes suffisamment longues pour estimer une tendance générale des propriétés édaphiques. Cette approche a d'ailleurs déjà été utilisée par Saenger *et al.* (2024) pour l'analyse des dynamiques édaphiques du RENECOFOR, confirmant ainsi sa fiabilité et sa pertinence. Le prolongement de ces

travaux, à la lumière des données de la troisième campagne, permettra de consolider et d'affiner ces premiers résultats.

Quelle que soit la méthode employée, qu'elle repose sur une comparaison directe entre campagnes ou sur une modélisation intégrative des dynamiques, les résultats convergent vers un même constat : la végétation du sous-bois ne reflète pas les variations temporelles mesurées dans le sol.

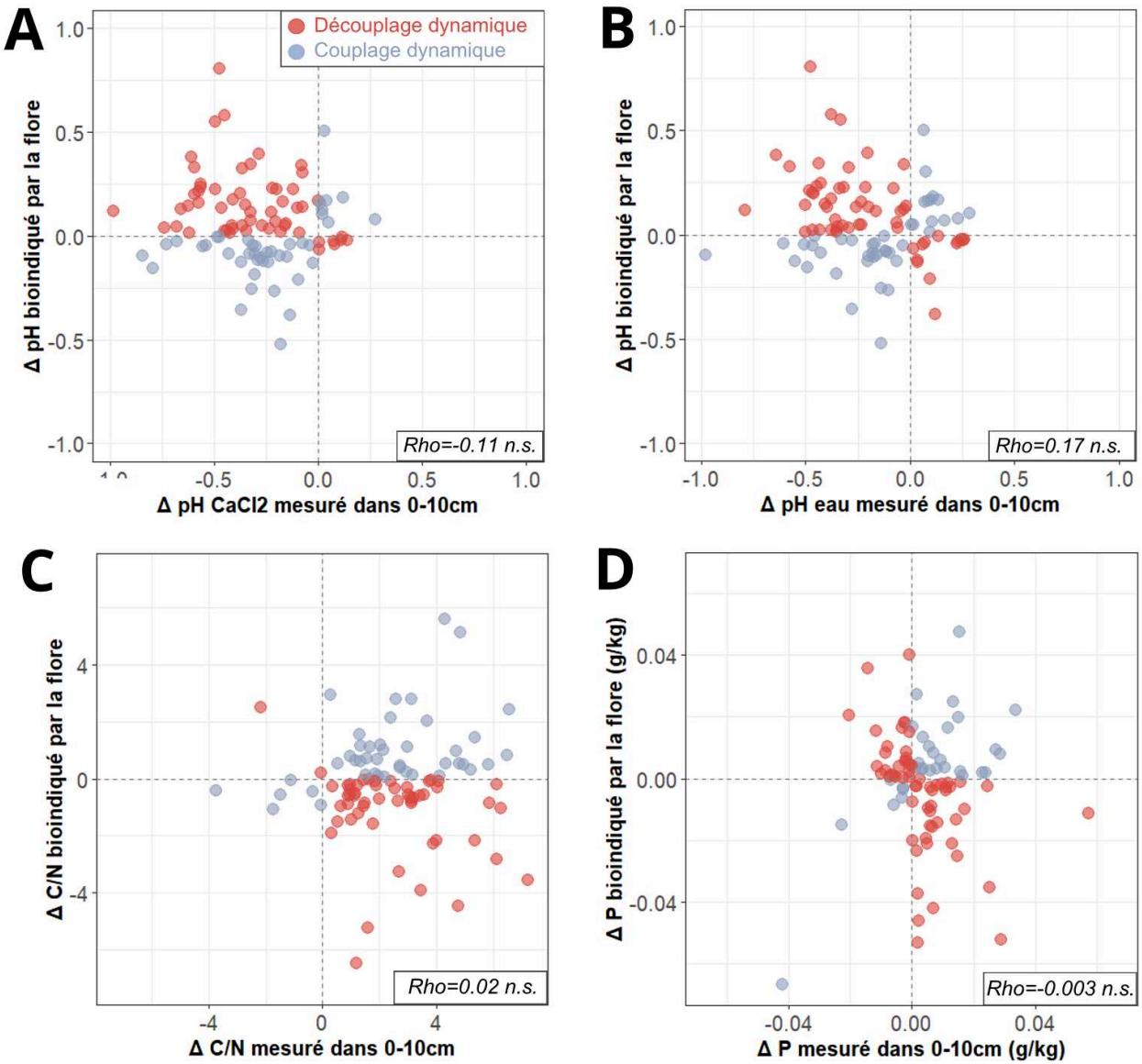


FIGURE 1 Comparaison des dynamiques des conditions édaphiques bioindiquées par la flore du sous-bois et mesurées dans la couche 0–10 cm du sol, exprimées comme les écarts observés entre deux relevés du réseau RENECOFOR.

*Les dynamiques des valeurs bioindicatrices sont comparées à celles des valeurs mesurées. Les points sont colorés en bleu lorsque les deux dynamiques évoluent dans le même sens (concordance), et en rouge lorsqu'elles évoluent en sens opposé (discordance). Les coefficients de corrélation de Spearman (Rho) sont indiqués, accompagnés de leur niveau de signification statistique, codé comme suit : « ns » pour non significatif, «.» pour $p < 0,1$, « * » pour $p < 0,05$, « ** » pour $p < 0,01$ et « *** » pour $p < 0,001$.*

2.1.2 Partitionner le réseau

Lors de l'analyse des tendances nationales des conditions édaphiques, qu'elles soient mesurées ou bioindiquées, l'hétérogénéité entre les placettes du réseau RENECOFOR s'est révélée importante. Les modèles linéaires mixtes offrent un cadre adapté pour en tenir compte, en intégrant un effet aléatoire de placette qui capture la variabilité spatiale non expliquée par les effets fixes. Cet « effet site » explique une part substantielle de la variance des dynamiques édaphiques mesurées et bioindiquées, comme le suggèrent les écarts marqués entre R^2 conditionnels et marginaux, les premiers étant supérieurs aux seconds d'un facteur 100 (CHAPITRE I et 2).

Ces modèles sont toutefois soumis au *shrinkage effect*, ou effet de rétrécissement vers la moyenne (Gelman & Hill, 2007 ; Harrison *et al.*, 2018). Ce mécanisme, inhérent à l'estimation des effets aléatoires, réduit la dispersion des pentes individuelles en les rapprochant de la moyenne globale. Il stabilise les estimations lorsque certaines placettes disposent de peu de données, mais peut également atténuer les contrastes réels entre sites. Dans notre cas, où les trajectoires locales sont hétérogènes, ce rétrécissement peut conduire à un sur-lissage des tendances et à une sous-estimation des variations propres aux sites les plus divergents. Pour concilier robustesse statistique et représentation fine des trajectoires locales, nous avons complété cette approche par une modélisation indépendante à l'échelle de chaque placette. La dynamique temporelle des conditions édaphiques mesurées et bioindiquées a ainsi été estimée pour chaque site, puis les pentes obtenues ont été corrélées. Cette double démarche permet de dégager une tendance nationale tout en préservant la variabilité locale et en limitant le lissage induit par les modèles hiérarchiques.

Une question demeure cependant : serait-il possible de simplifier l'analyse en réduisant la dispersion entre sites, sans recourir à la combinaison des approches globale et locale ? La littérature souligne que les dynamiques des sols et de la flore forestière dépendent fortement de conditions écologiques spécifiques. Saenger *et al.* (2024) ont montré que l'acidification et l'évolution du rapport C/N varient selon le niveau d'acidité initial des sols, les changements les plus marqués étant observés sur les sites les plus acides. La forme d'humus module également les processus de décomposition et la disponibilité en nutriments, avec des fonctionnements contrastés entre mor, moder et mull (Jabiol *et al.*, 2007). La composition du peuplement forestier constitue un autre facteur déterminant : sur le réseau RENECOFOR, Jonard *et al.* (2017) ont observé que la séquestration de carbone entre 1993 et 2012 dépendait de la structure, du type d'essence et de l'âge des peuplements, diminuant avec leur vieillissement. Enfin, les écosystèmes forestiers français présentent des contrastes régionaux marqués, liés aux gradients climatiques et biogéographiques (Wernsdörfer *et al.*, 2012 ; Bontemps *et al.*, 2019).

Ainsi, le partitionnement du réseau selon ces déterminants écologiques permettrait de réduire la variabilité interne à chaque groupe et d'affiner la comparaison des dynamiques édaphiques mesurées et bioindiquées. Pour évaluer l'influence de ces facteurs et vérifier que les résultats présentés au CHAPITRE I ne dépendent pas des choix méthodologiques initiaux, nous avons réitéré la comparaison des dynamiques mesurées et bioindiquées en classant les placettes selon quatre critères

majeurs : le pH du sol (**FIGURE 2**), la forme d'humus (**FIGURE 3**), le type d'essence dominante (**FIGURE 4**) et la région écologique (GRECO ; **FIGURE 5** et **6**).

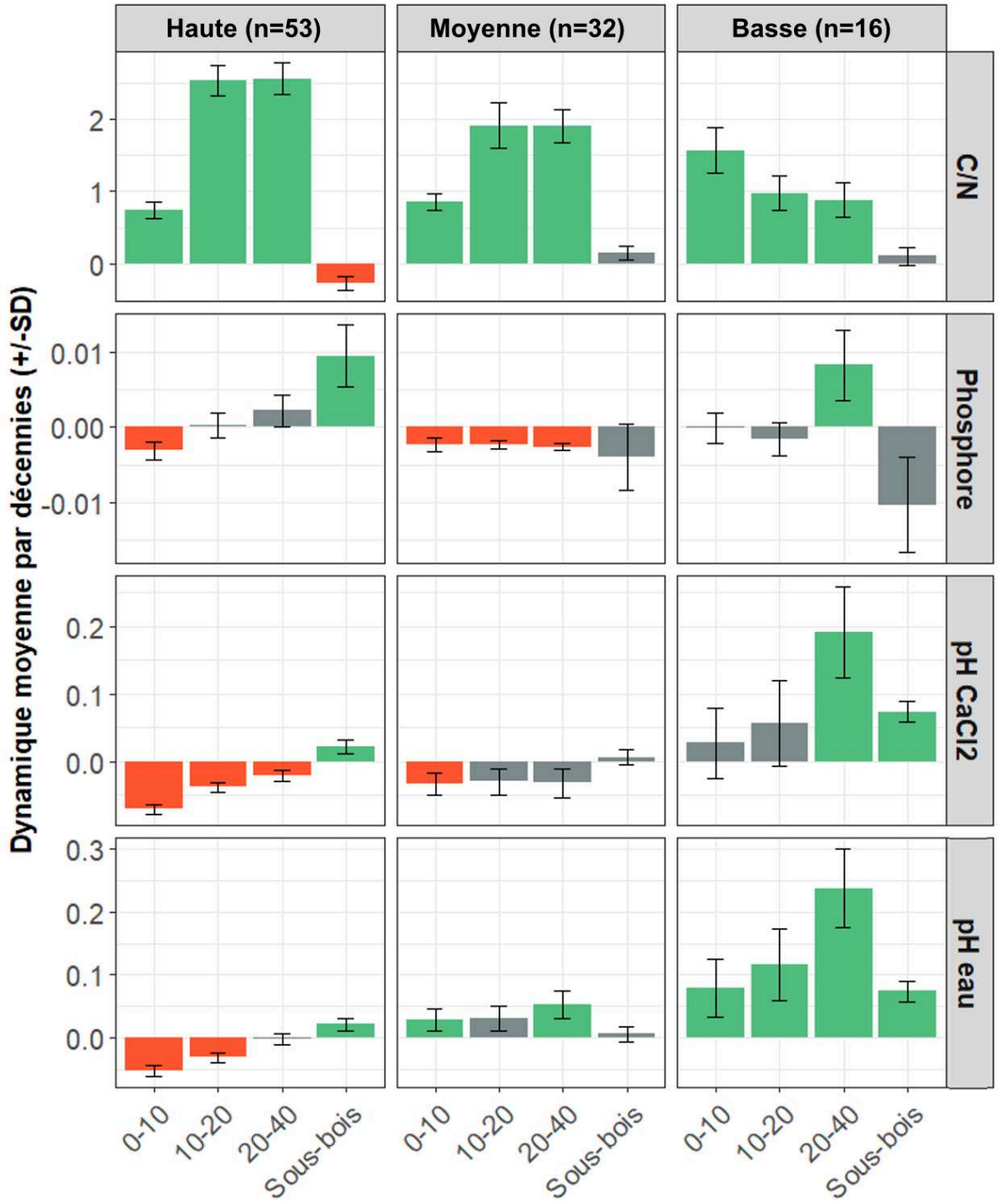


FIGURE 2 Comparaison de la dynamique des conditions édaphiques (mesurées et bioindiquées) selon l'acidité du sol.

*Moyenne décennale ± écart-type des placettes regroupées par classe d'acidité du sol : **Haute** (pH < 4,5), **Intermédiaire** (pH 4,5–5,5) et **Basse** (pH > 5,5). Les mesures concernent les couches minérales de sol 0–10 cm, 10-20cm, 10–40 cm, ainsi que les valeurs indiquées par la végétation du sous-bois, avec le phosphore assimilable exprimé en g·kg⁻¹. Les barres rouges indiquent une dynamique significativement négative, les barres vertes une dynamique significativement positive et les barres grises une dynamique non significative (p-value < 0,05).*

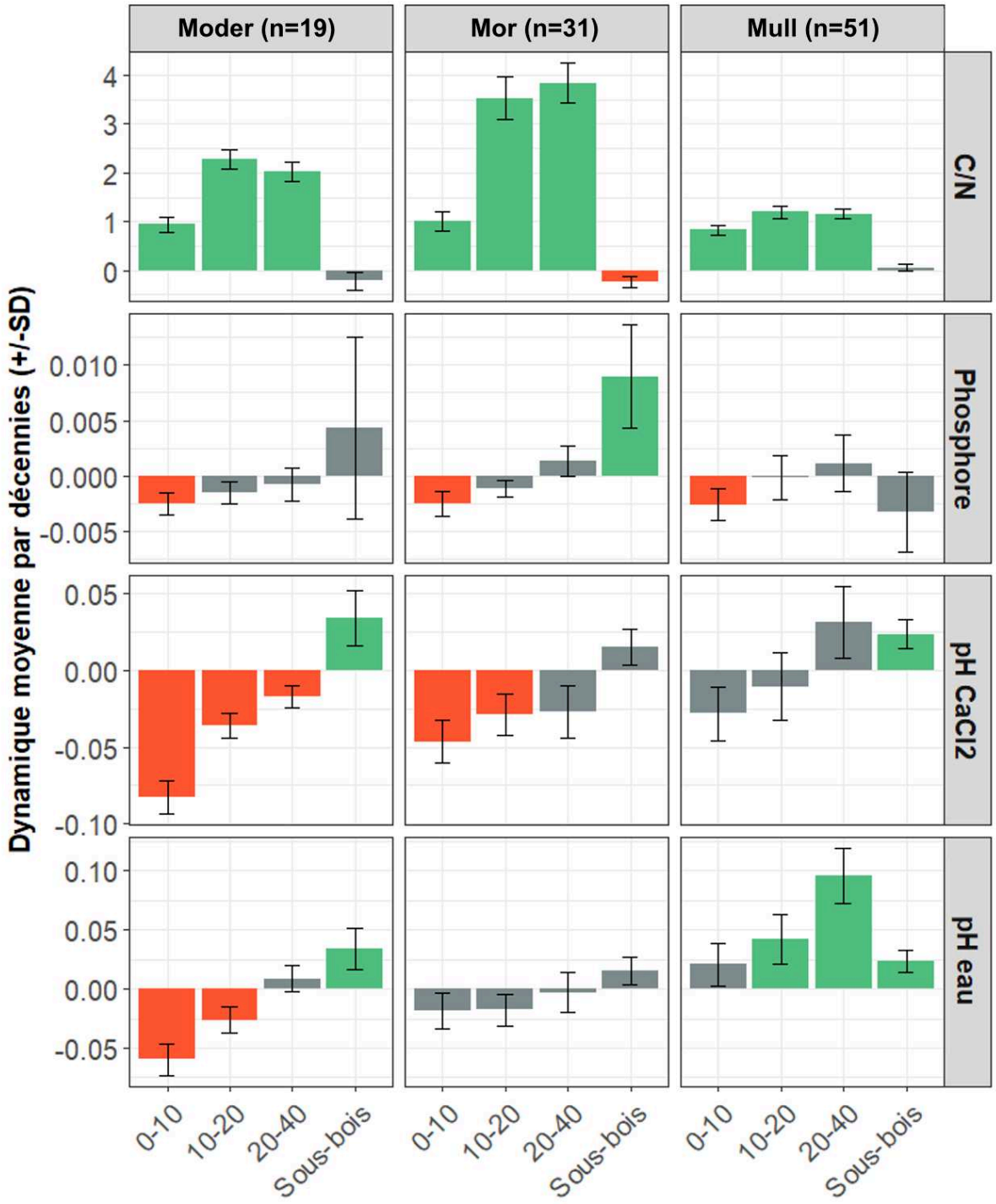


FIGURE 3 Comparaison de la dynamique des conditions édaphiques (mesurées et bioindiquées) selon la forme d'humus.

*Moyenne décennale ± écart-type des placettes regroupées par type d'humus : **Moder**, **Mor** et **Mull**. Les mesures concernent les couches minérales de sol 0–10 cm, 10-20cm, 10–40 cm, ainsi que les valeurs indiquées par la végétation du sous-bois, avec le phosphore assimilable exprimé en $g \cdot kg^{-1}$. Les barres rouges indiquent une dynamique significativement négative, les barres vertes une dynamique significativement positive et les barres grises une dynamique non significative (p-value < 0,05).*

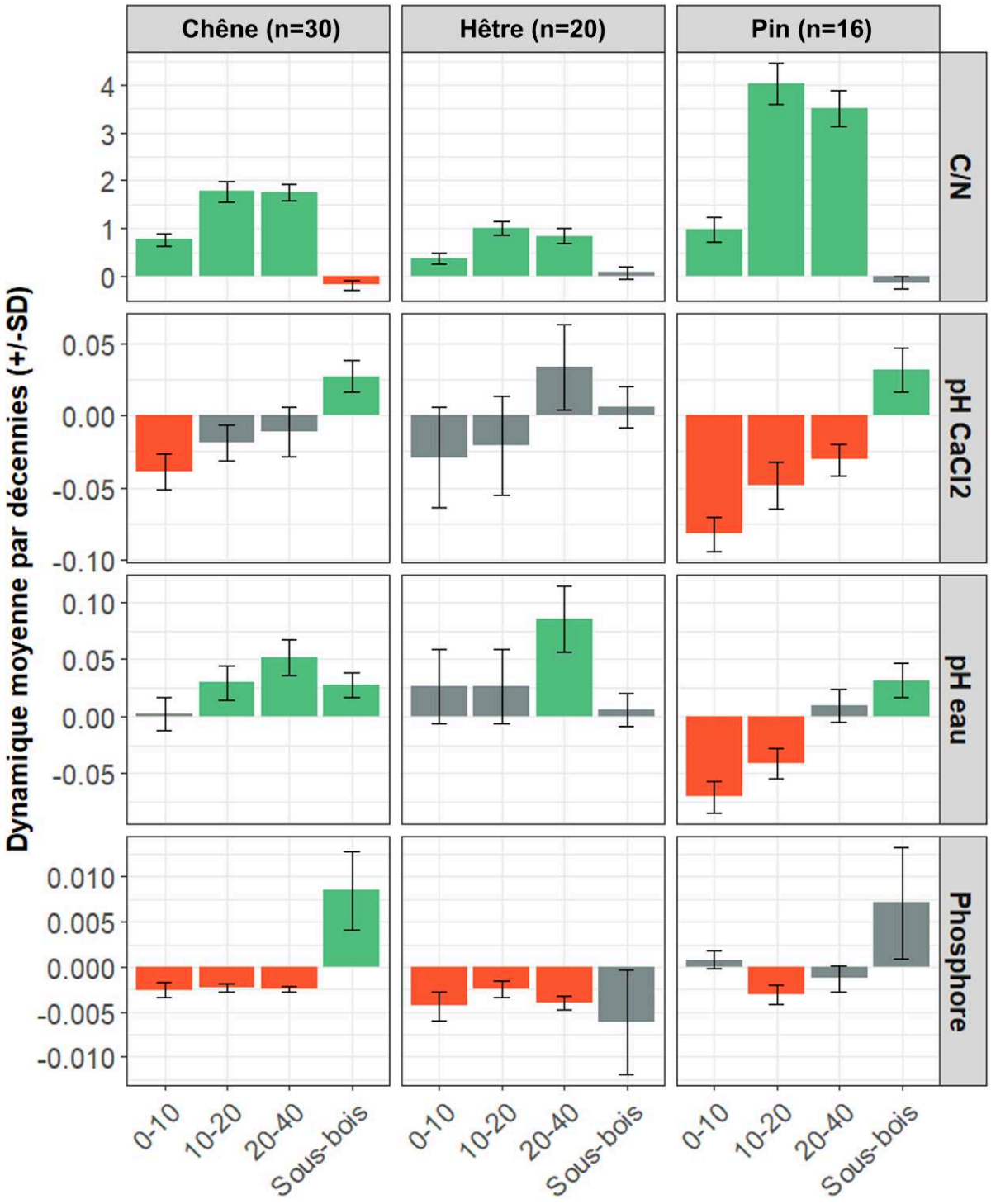


FIGURE 4 Comparaison de la dynamique des conditions édaphiques (mesurées et bioindiquées) selon le type d'essence dominante.

*Moyenne décennale ± écart-type des placettes regroupées par type d'essence : **Quercus** (petraea et robur), **Fagus** et **Pinus** (sylvestris et nigra). Les mesures concernent les couches minérales de sol 0–10 cm, 10-20cm, 10–40 cm, ainsi que les valeurs indiquées par la végétation du sous-bois, avec le phosphore assimilable exprimé en g·kg⁻¹. Les barres rouges indiquent une dynamique significativement négative, les barres vertes une dynamique significativement positive et les barres grises une dynamique non significative (p-value < 0,05).*

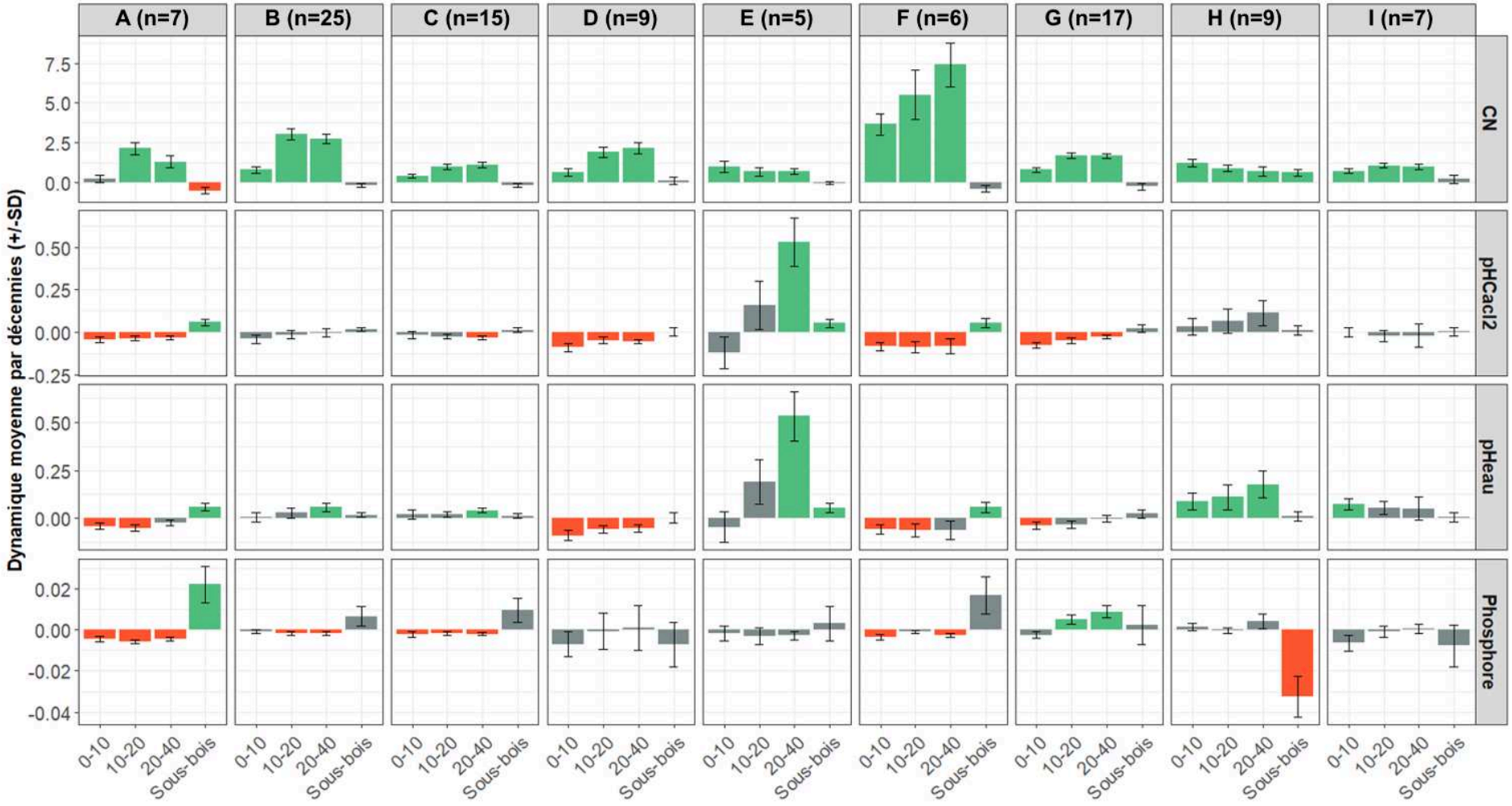


FIGURE 5 Comparaison de la dynamique des conditions édaphiques (mesurées et bioindiquées) selon la grande région écologique (GRECO).

Moyenne décennale ± écart-type des placettes regroupées par GRECO de A à I, voir la Figure 6 pour plus de détails. Les mesures concernent les couches minérales de sol 0–10 cm, 10-20cm, 10–40 cm, ainsi que les valeurs indiquées par la végétation du sous-bois, avec le phosphore assimilable exprimé en $g \cdot kg^{-1}$. Les barres rouges indiquent une dynamique significativement négative, les barres vertes une dynamique significativement positive et les barres grises une dynamique non significative (p-value < 0,05).

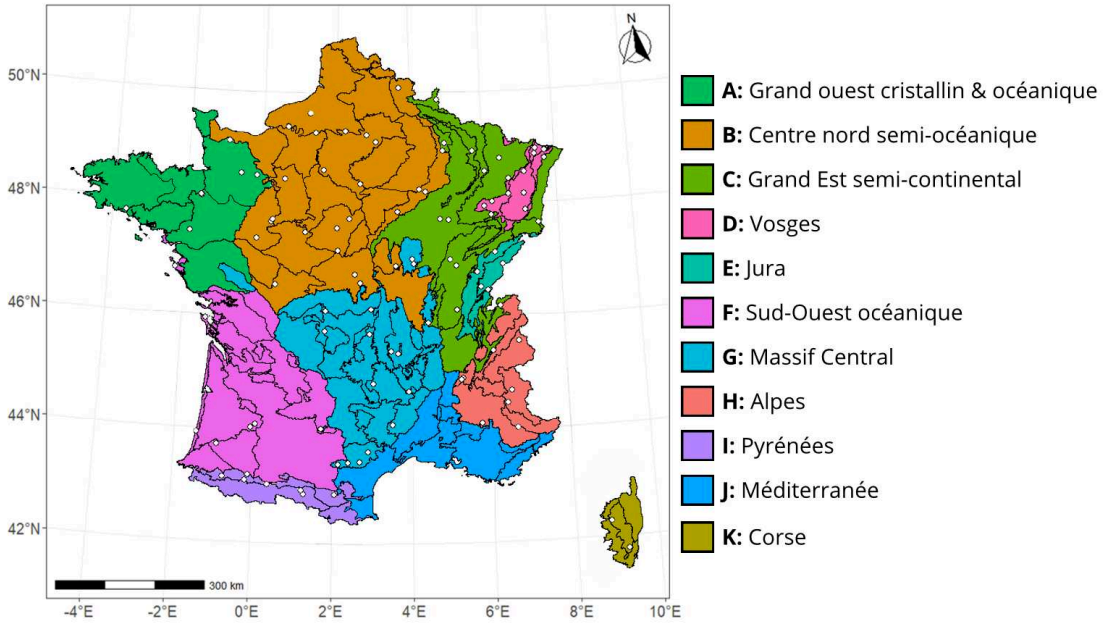


FIGURE 6 Carte des grandes régions écologiques françaises (GRECO) avec la localisation des placettes du réseau RENECOFOR.

En partitionnant le réseau selon ces différents critères écologiques, nous avons cherché à déterminer si la relation entre les dynamiques mesurées et bioindiquées variait selon le contexte écologique. Quel que soit le mode de partitionnement, selon l'acidité du sol, la forme d'humus, le type d'essence dominante ou la grande région écologique, les résultats convergent largement avec ceux obtenus à l'échelle nationale : les dynamiques temporelles des conditions édaphiques mesurées et bioindiquées diffèrent nettement. Autrement dit, la végétation du sous-bois ne semble pas refléter les variations temporelles mesurées des propriétés chimiques du sol, même lorsque l'analyse est restreinte à des ensembles de placettes écologiquement homogènes. Cette stabilité du découplage à travers les contextes écologiques suggère qu'il ne s'agit pas d'un artefact de modélisation statistique, mais bien d'un signal généralisé au sein du réseau.

Les seules situations où les trajectoires mesurées et bioindiquées présentent des évolutions analogues concernent les placettes les moins acides, caractérisées par un pH supérieur à 5,5. Dans ces cas, le pH du sol augmente parallèlement au pH bioindiqué par la flore du sous-bois (**FIGURE 2**). Ces sites, situés à la transition entre milieux acides et neutres, sont les plus susceptibles de franchir un seuil d'acidité suffisamment élevé pour provoquer un renouvellement floristique : les espèces acidophiles y régressent au profit d'espèces plus basiphiles, rendant ainsi perceptible un signal de bioindication cohérent avec l'évolution mesurée des sols (Ellenberg *et al.*, 1992 ; Diekmann 2003 ; Pärtel, 2002).

C'est la récurrence de ce découplage, observé quels que soient les contextes écologiques et les approches méthodologiques employées, qui nous a conduit à considérer une dimension souvent négligée de la composition floristique : la diversité sombre, ou diversité sombre en français. Pour rappel, cette dernière correspond à l'ensemble des espèces absentes d'une placette donnée mais

pouvant potentiellement s'y établir en raison de conditions écologiques favorables. Elle est ainsi susceptible de compléter le signal bioindiqué. La prise en compte de cette composante permettait d'interroger si l'absence de certaines espèces, pourtant attendues, pouvait masquer la relation entre dynamique floristique et variation des propriétés édaphiques.

2.2. Estimation de la diversité sombre

Dans le **CHAPITRE 2**, nous avons montré que l'intégration de la diversité sombre améliore la bioindication des conditions édaphiques, tant sur le plan spatial que temporel. La prise en compte de cette diversité sombre et du pool spécifique a permis de détecter des variations du rapport C/N du sol qui restaient invisibles à partir de la seule diversité observée, et l'analyse du turnover a révélé que ce sont principalement les échanges entre diversité observée et diversité sombre qui expliquent l'évolution des valeurs indicatrices.

Ces résultats illustrent le potentiel de la diversité sombre pour affiner la bioindication. Son estimation demeure toutefois un défi méthodologique de premier ordre, puisqu'elle suppose d'évaluer la présence d'espèces absentes, donc invisibles dans les inventaires floristiques classiques. Les méthodes actuellement disponibles, encore en cours de développement, font l'objet de débats nourris dans la littérature scientifique (De Bello *et al.*, 2016 ; Lewis *et al.*, 2016 ; Ronk *et al.*, 2016 ; Carmona *et al.*, 2021). L'application de cette approche à la bioindication soulève ainsi plusieurs questions : la méthode probabiliste fondée sur les co-occurrences est-elle réellement la plus pertinente ? Dans quelle mesure l'effet observateur peut-il influer sur la composition estimée de la diversité sombre ? Ces interrogations rappellent l'importance de considérer les limites et les incertitudes méthodologiques afin de consolider la fiabilité de cette approche dans le suivi des dynamiques édaphiques.

2.2.1 Pertinence du choix du principe de co-occurrence en bioindication

Dans l'**INTRODUCTION GÉNÉRALE**, nous avions souligné qu'il existait plusieurs approches pour estimer la diversité sombre, dont la méthode fondée sur les amplitudes écologiques des espèces (Lewis *et al.*, 2014). Cette approche considère qu'une espèce absente appartient à la diversité sombre si ses exigences écologiques, estimées à partir des valeurs indicatrices d'Ellenberg, se situent dans l'amplitude définie par la communauté locale. Elle permet ainsi d'identifier les espèces ayant franchi le filtre abiotique, mais dont l'établissement a été empêché par d'autres contraintes.

Cependant, nous avions émis l'hypothèse que l'application de cette approche dans un cadre de bioindication pouvait s'avérer problématique. En effet, les espèces intégrées à la diversité sombre sont sélectionnées en fonction de leurs valeurs indicatrices, ce qui risque de renforcer artificiellement la correspondance entre la diversité sombre et les conditions environnementales estimées, sans pour autant garantir que cette relation traduise un lien écologique réel.

Pour tester cette hypothèse et confirmer la pertinence de notre choix méthodologique, nous avons appliqué la méthode des amplitudes écologiques sur un jeu de données externe, constitué d'inventaires floristiques du sous-bois réalisés dans les massifs forestiers des Boucles de la Seine. Nous avons comparé les estimations de diversité sombre obtenues par cette approche à celles issues de la méthode probabiliste fondée sur les cooccurrences d'espèces (méthode hypergéométrique utilisée dans le **CHAPITRE 2**). La distribution des indices d'Ellenberg au sein des pools de diversité sombre dérivés de chaque approche a ensuite été analysée, afin de confronter les méthodes et d'apprécier leur influence sur les valeurs indicatrices des espèces composant la diversité sombre, conditionnant ainsi leur pertinence et leur robustesse en tant qu'outil bioindicateur. À titre d'exemple, la **FIGURE 7** illustre la distribution des valeurs d'indice d'Ellenberg relatives à l'humidité du sol.

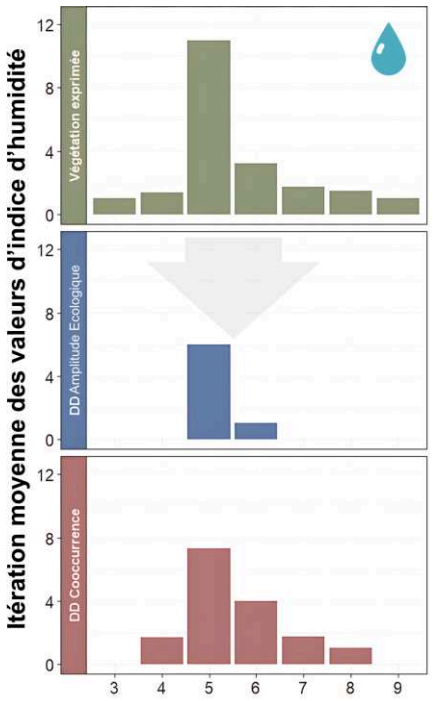


FIGURE 7 Comparaison méthodologique des principes d'estimation de la diversité sombre dans le cadre de la bioindication.

Les barres montrent le nombre moyen d'itérations des valeurs de l'indice d'humidité d'Ellenberg des espèces du sous-bois, dans la diversité sombre mesurée à partir d'inventaires forestiers des Boucles de la Seine, hors du réseau RENECOFOR.

L'approche reposant sur les amplitudes écologiques ne révèle que deux classes de valeurs de l'indice d'humidité d'Ellenberg (5 et 6) au sein du pool de diversité sombre, tandis que la méthode probabiliste fondée sur les cooccurrences en met en évidence cinq, véhiculant ainsi deux messages distincts quant au pouvoir bioindicateur de la diversité sombre. Cette divergence découle directement du principe même de la méthode d'estimation par les amplitudes écologiques : la moyenne des valeurs indicatrices des espèces présentes borne mécaniquement l'amplitude autour des conditions les plus fréquentes au sein de la communauté observée. Les espèces incluses dans la diversité sombre reflètent dès lors principalement les conditions dominantes déjà représentées, ce qui tend à réduire artificiellement la variabilité écologique du pool. À l'inverse, la méthode probabiliste fondée sur les cooccurrences repose sur les relations d'association entre espèces, indépendantes de leurs valeurs indicatrices, et permet ainsi d'intégrer des espèces absentes présentant une gamme plus étendue de préférences écologiques.

En conclusion, ces analyses confirment que la méthode probabiliste fournit une estimation plus adaptée et écologiquement cohérente de la diversité sombre dans le cadre de la bioindication. En évitant la circularité inhérente aux approches fondées sur les amplitudes écologiques, elle permet de dissocier davantage le signal de la diversité sombre des gradients environnementaux employés pour sa construction. Cette indépendance méthodologique renforce la robustesse des inférences écologiques et justifie pleinement le recours à la méthode probabiliste pour l'ensemble de nos analyses.

2.2.2 "Effet observateur" lors de l'estimation de la diversité sombre

La méthode probabiliste fondée sur les cooccurrences d'espèces, bien qu'écologiquement plus pertinente, repose sur la disponibilité de bases de données floristiques étendues (Carmona *et al.*, 2019). L'exactitude de ses estimations dépend donc directement de la qualité des inventaires mobilisés. Or, ces inventaires, réalisés par différents observateurs, ne sont pas exempts de biais potentiels, notamment en ce qui concerne la détection et l'identification des espèces du sous-bois. Il est dès lors essentiel de vérifier que ces variations d'observation n'introduisent pas de biais significatif dans l'estimation de la diversité sombre et, par conséquent, dans le signal de bioindication qui en découle.

Grâce aux données de contrôle qualité du réseau RENECOFOR, il est possible d'évaluer cet effet en comparant les valeurs bioindiquées dérivées des communautés de diversité sombre estimées à partir des inventaires de référence et de contrôle. À notre connaissance, l'impact de l'effet observateur sur l'estimation de la diversité sombre n'avait encore jamais été évalué. Les données du réseau RENECOFOR offrent une opportunité unique pour tester cette question méthodologique, tout en s'assurant que les estimations utilisées dans ce travail ne sont pas affectées par un biais susceptible de remettre en cause les résultats présentés au **CHAPITRE 2**.

Concrètement, pour toutes les placettes ayant fait l'objet d'un contrôle floristique, nous avons estimé la diversité sombre à partir des inventaires de référence, d'une part, et des inventaires de contrôle, d'autre part. À partir de ces estimations, nous avons calculé les indices communautaires de conditions du sol (ICS) pour le rapport C/N, le pH et le phosphore assimilable. La relation entre les valeurs d'ICS dérivées des diversités sombres issues des inventaires de référence et de contrôle a ensuite été examinée à l'aide de modèles linéaires (**FIGURE 8**). Cette approche permet d'évaluer la sensibilité de l'estimation de la diversité sombre à l'effet observateur, en testant si les variations dans la perception ou la détection des espèces se traduisent par des différences significatives dans le signal bioindicatif associé.

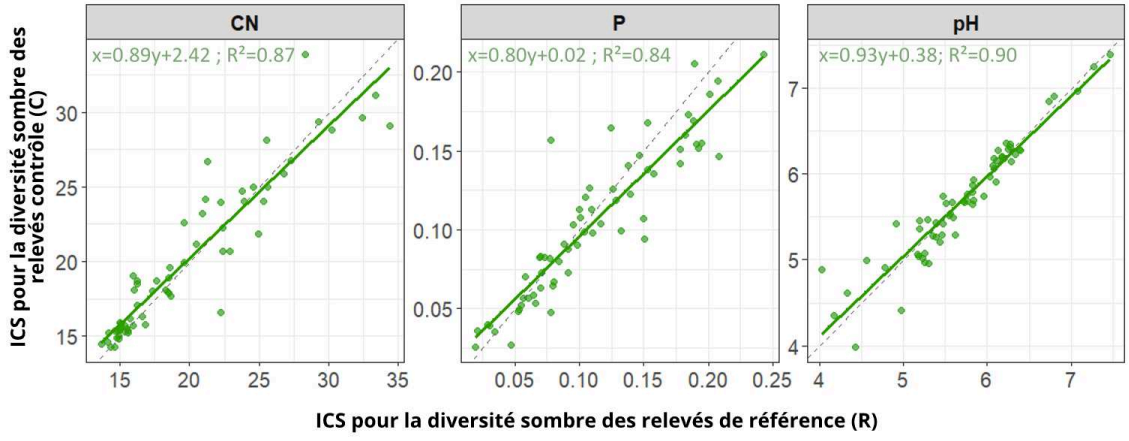


FIGURE 8 Comparaison des indices communautaires de condition du sol (ICS) de la diversité sombre, calculés à partir des inventaires des groupes de référence et des groupes de contrôle.

Relations entre les indices de diversité sombre (ICS), calculés à partir des inventaires des groupes de référence et des groupes de contrôle. Les relations ont été estimées par des modèles linéaires dont les caractéristiques sont indiquées sur chaque facette. Toutes les relations sont significativement positives.

Les résultats montrent que les relations entre les ICS calculés à partir de la diversité sombre estimée à partir des inventaires de référence et ceux issus des inventaires de contrôle sont toutes significatives et fortement positives, avec des coefficients de détermination (R^2) supérieurs à 0,84 et des pentes proches de 1 pour l'ensemble des variables édaphiques testée (**FIGURE 8**). Pour le rapport C/N édaphique, particulièrement mobilisé dans le **CHAPITRE 2**, les ICS sont très similaires entre la diversité sombre estimée à partir des inventaires de référence et celle issue des inventaires de contrôle. Les différences les plus marquées apparaissent pour le phosphore assimilable, avec un R^2 de 0,84 et une pente de 0,80, traduisant un léger décalage potentiel entre les deux types de relevés. Toutefois, ces valeurs restent comparables à celles obtenues lors de l'évaluation de l'effet observateur sur la végétation observée, suggérant que l'influence de ce biais sur la diversité sombre est limitée.

Ces résultats confirment la robustesse de la méthode probabiliste choisie et indiquent qu'elle n'est pas affectée par un biais lié aux inventaires mobilisés. On peut ainsi conclure que, tant sur le plan théorique que pratique, la diversité sombre constitue un outil applicable et fiable pour la bioindication des conditions édaphiques.

2.3. Etude de la structure fonctionnelle des communautés du sous-bois

2.3.1 Choix entre moyenne de traits pondérée ou non par le recouvrement des espèces

Dans le **CHAPITRE 3**, les indicateurs fondés sur les traits ont mis en évidence des réponses plus nettes et plus sensibles à la fertilité du sol que les valeurs indicatrices traditionnelles, lesquelles sont limitées au turnover spécifique. Dans ce cadre, les coordonnées moyennes des communautés sur l'axe acquisition-conservation ont été utilisées comme indicateurs fonctionnels de la stratégie foliaire dominante.

Sur les placettes de chênaie, ces coordonnées moyennes ont été calculées sans pondération par le recouvrement des espèces. Ce choix visait principalement à comparer la capacité de bioindication des traits fonctionnels à celle des valeurs indicatrices, pour lesquelles la littérature montre que les moyennes simples, non pondérées par l'abondance, sont souvent suffisantes, voire plus robustes, pour caractériser les conditions environnementales. L'absence de pondération rend les estimations plus stables, moins sensibles à l'échantillonnage incomplet et limite les biais liés à la dominance locale de certaines espèces (Diekmann, 2003 ; Ewald, 2003 ; Schaffers & Sýkora, 2000 ; Zelený, 2018).

Par ailleurs, les communautés étudiées comprenaient un ensemble ciblé d'espèces dominantes et quasi constantes (deux à trois espèces dominantes et deux à trois espèces quasi constantes sur l'ensemble des placettes). En se concentrant sur ces espèces pour les mesures de traits, l'information fonctionnelle principale de la communauté était déjà capturée, rendant la pondération explicite par le recouvrement, redondante et potentiellement source de biais.

Ce choix s'inscrit dans le cadre de la *mass-ratio hypothesis*, selon laquelle la composition fonctionnelle d'une communauté est largement déterminée par les traits des espèces dominantes (Garnier *et al.*, 2004 ; Díaz *et al.*, 2007). Cependant, dans la littérature, les travaux fondés sur cette

hypothèse considèrent généralement l'ensemble des espèces et pondèrent les traits par l'abondance, car les variations de composition fonctionnelle peuvent également résulter de changements d'abondance (Garnier *et al.*, 2004 ; Lavorel *et al.*, 2008 ; Lepš *et al.*, 2011). Ces auteurs montrent que la pondération améliore la détection des relations entre traits et environnement lorsque les variations d'abondance reflètent des réponses écologiques réelles, mais qu'elle peut aussi atténuer le signal lorsqu'elle amplifie le bruit associé à la dominance locale ou à la plasticité d'espèces opportunistes. Ces observations soulèvent la question de savoir si la pondération par le recouvrement aurait modifié les résultats dans notre étude, justifiant ainsi la vérification empirique de cet effet.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet d'une pondération par le recouvrement sur la performance de l'indicateur fondé sur les traits. Les coordonnées moyennes pondérées des communautés sur l'axe acquisition–conservation ont été recalculées, puis la relation entre le rapport C/N du sol et ces coordonnées analysées à l'aide d'un modèle linéaire. Les résultats révèlent une légère amélioration du pouvoir explicatif de l'indicateur pondéré (R^2 = 0,53) par rapport à l'indicateur non pondéré (R^2 = 0,48), suggérant que la prise en compte de la dominance relative renforce la relation entre l'indicateur fonctionnel et la fertilité du sol (**FIGURE 9**).

Cependant, la pondération modifie la structure de la réponse fonctionnelle le long du gradient de fertilité : la transition entre communautés à stratégie acquisitrice et conservatrice devient moins nette. À partir du site CPS 77 (C/N = 17,8), les communautés présentent des valeurs intermédiaires ou ambiguës, ne s'inscrivant plus clairement dans l'un ou l'autre pôle du spectre. Ainsi, bien que la pondération améliore légèrement la corrélation globale, elle semble en revanche réduire la lisibilité écologique de la réponse, soulevant la question du compromis entre précision statistique et clarté fonctionnelle des indicateurs.

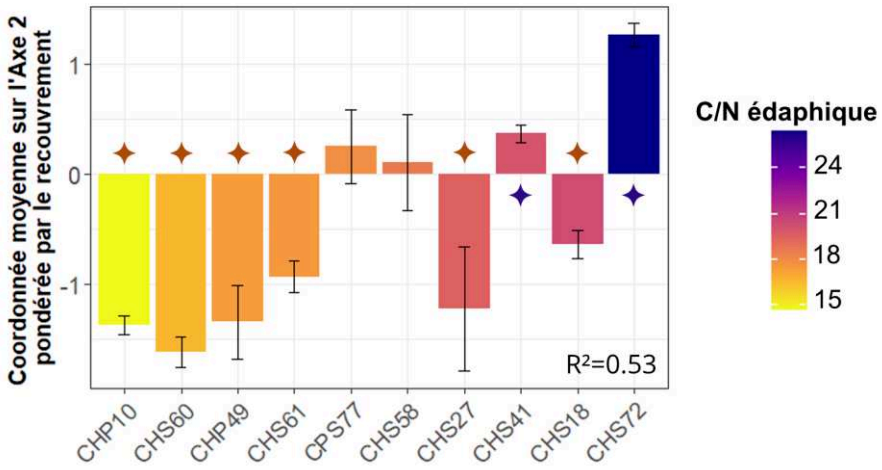


FIGURE 9 Scores moyens des communautés le long de l'Axe 2 de l'ACP (pondérés par le recouvrement des espèces), utilisés comme indicateur de la stratégie acquisition–conservation.

Les étoiles rouges indiquent des scores moyens significativement inférieurs à 0, et les étoiles bleues des scores significativement supérieurs à 0 (test t, $\mu = 0$).

3. Synthèse et mise en perspective des résultats

3.1. Confirmation de la pertinence de la composition floristique du sous-bois comme bioindicateur des conditions édaphiques forestières à l'échelle spatiale

3.1.1 Valeurs Indicatrices des communautés florisitiques observées

Les résultats présentés dans le **CHAPITRE 1** apportent une preuve supplémentaire de la fiabilité de l'usage des valeurs indicatrices de la flore pour bioindiquer spatialement les conditions édaphiques. Ils s'inscrivent dans la continuité de nombreux travaux ayant démontré la robustesse de cette approche pour estimer les propriétés chimiques du sol à grande échelle (Schaffers *et al.*, 2000 ; Ewald, 2003 ; Gégout *et al.*, 2005, 2008 ; Carpenter & Goodenough, 2014 ; Riofrío-Dillon, 2012, 2013). Les fortes corrélations positives observées entre les indices communautaires calculés et les mesures de terrain à l'échelle du réseau RENECOFOR confirment que la composition floristique du sous-bois constitue un indicateur fidèle des variations spatiales de la chimie du sol, en particulier pour le pH (H_2O et $CaCl_2$) et le rapport C/N.

Bien que les valeurs d'EcoPlant ne reflètent pas directement les mesures absolues des paramètres édaphiques, elles demeurent pertinentes pour discriminer les conditions du sol à large échelle (Gégout *et al.*, 2005, 2008 ; Riofrío-Dillon, 2012, 2013). L'évaluation du nouvel indice relatif au phosphore assimilable est particulièrement prometteur. Malgré une couverture taxonomique encore partielle et les difficultés méthodologiques liées à la précision des mesures directes en laboratoire (Bonneau *et al.*, 2003 ; Achat *et al.*, 2016), une corrélation significative a été établie entre les valeurs bioindiquées en 1995 et les mesures réalisées entre 1993 et 1997. La mise au point d'un indice fiable du phosphore assimilable constituerait ainsi un progrès méthodologique majeur. Il apparaît essentiel de poursuivre l'enrichissement de cet indice afin d'en renforcer la précision et la représentativité, notamment en élargissant la base taxonomique.

La forte cohérence observée entre valeurs bioindiquées et valeurs mesurées à l'échelle spatiale repose vraisemblablement sur l'hétérogénéité édaphique et écologique du réseau RENECOFOR. Les placettes couvrent un large spectre de contextes pédologiques et écologiques, se traduisant par des amplitudes importantes pour les principaux paramètres étudiés : le pH H_2O (0–10 cm) varie de 3,7 à 8,4, le rapport C/N de 10,73 à 40,83, et le phosphore assimilable (méthodes Dyer ou Joret-Hébert) de 0,002 à 0,73 mg P g^{-1} de sol. Ces gradients justifient la présence de communautés floristiques contrastées : les stations acides abritent typiquement des espèces acidophiles, tandis que les stations basiques sont dominées par des espèces calcicoles (Ellenberg *et al.*, 1992 ; Diekmann 2003 ; Pärtel, 2002). De même, les sites à faible C/N et forte teneur en P accueillent une flore eutrophe, alors que les milieux à C/N élevé et faible teneur en P sont caractérisés par une flore oligotrophe (Diekmann & Falkengren-Grerup, 2002 ; Decocq *et al.*, 2004).

En somme, les résultats du **CHAPITRE 1** confirment partiellement l'hypothèse **H1** de cette étude : **la flore du sous-bois constitue un indicateur fiable, robuste et spatialement**

pertinent des conditions édaphiques à large échelle. Ils confirment la capacité des valeurs indicatrices à restituer la structuration spatiale des propriétés du sol, tout en soulignant la nécessité d'affiner et d'enrichir les indices relatifs au phosphore assimilable pour améliorer encore la précision et la portée de cette approche bioindicatrice.

3.1.2 Apport de la diversité sombre

Dans le **CHAPITRE 2**, nous avons introduit le concept de diversité sombre et exploré son application à la bioindication. À l'instar de la végétation observée, les valeurs indicatrices calculées à partir des espèces appartenant à la diversité sombre se sont révélées de bons bioindicateurs spatiaux du rapport C/N du sol mesuré dans la couche 0–10 cm. Au-delà de cette observation, la prise en compte conjointe de la végétation observée et de la diversité sombre, c'est-à-dire l'ensemble des espèces constituant le pool spécifique du site (*Site-Specific Species Pool*, SSP, décrit dans le **CHAPITRE 2**), permet de bioindiquer des valeurs extrêmement proches, voire identiques, de celles mesurées directement dans le sol. Par exemple, la valeur bioindiquée du C/N édaphique par le SSP en 2015 était de 19,9 ± 5,19, tandis que la valeur mesurée entre 2007 et 2012 était de 19,9 ± 5,34.

La définition même de la diversité sombre justifie son utilisation en bioindication, puisqu'elle correspond à des espèces dont les exigences écologiques sont compatibles avec les conditions édaphiques locales (Partel *et al.*, 2011). On pouvait donc s'attendre à ce que ces espèces reflètent de manière fiable les conditions du sol, de façon comparable à la végétation observée. Nos résultats confirment que l'intégration de la diversité sombre renforce le signal bioindicatif à l'échelle spatiale, en considérant l'ensemble du pool spécifique d'un site. Ces observations valident ainsi l'hypothèse **H2** de cette étude : **la prise en compte de la diversité sombre contribue à améliorer la bioindication des conditions édaphiques par la flore du sous-bois à l'échelle spatiale**.

Cette amélioration soulève néanmoins une question : pourquoi l'ajout des espèces de la diversité sombre renforce-t-il autant le signal bioindicatif ? Quelle est la cause de l'appartenance d'une espèce à la diversité sombre ? En nous référant à l'étude présentée dans l'**INTRODUCTION GÉNÉRALE** de la thèse sur l'effet de l'observateur au sein du réseau RENECOFOR, nous avons constaté que l'exhaustivité des inventaires botaniques n'atteignait que rarement 100 %, avec une moyenne entre 60 et 75%. Bien que cette exhaustivité ne varie pas significativement entre observateurs, cela signifie qu'en moyenne une à deux espèces sur cinq sont manquées lors des inventaires. Il est donc plausible que certaines de ces espèces non observées appartiennent à la diversité sombre, ce qui expliquerait que leur inclusion améliore le signal bioindicatif.

Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé la relation entre la richesse des espèces observées, celle du pool spécifique du site (SSP) et la richesse totale estimée par l'estimateur Jackknife (Burnham *et al.*, 1978), c'est-à-dire la richesse que l'on aurait observée si les relevés avaient été exhaustifs. Nous avons également examiné le lien entre le nombre d'espèces manquées selon l'estimateur Jackknife et la taille de la diversité sombre.

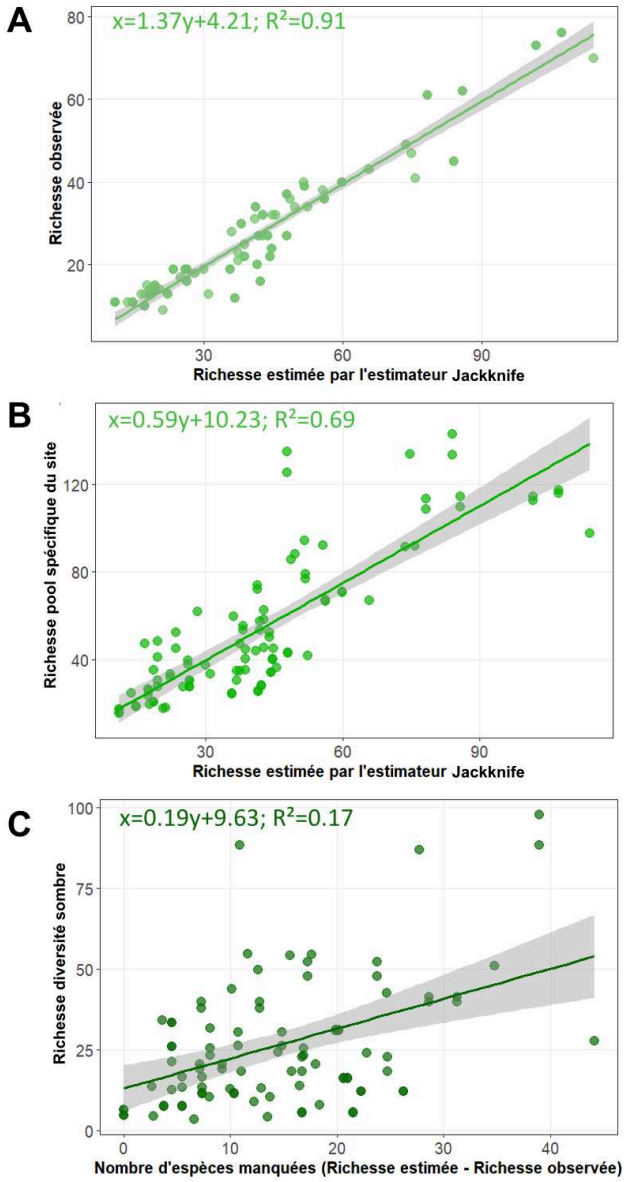


FIGURE 10 Relation entre l'exhaustivité des relevés floristiques et la richesse de la diversité sombre.

Le panneau A montre la relation entre la richesse observée et la richesse estimée par l'estimateur Jackknife, *correspondant à la richesse attendue si l'exhaustivité des inventaires atteignait 100 %.*

Le panneau B illustre la relation entre la richesse du pool spécifique du site (somme des richesses observée et sombre) et la richesse estimée par l'estimateur Jackknife.

*Le panneau C présente la relation entre la richesse de la diversité sombre et le nombre d'espèces manquantes lors des inventaires, estimé par la différence entre la richesse estimée (*Jackknife*) et la richesse observée.*

L'analyse des relations entre richesse observée, SSP et estimateur Jackknife révèle une corrélation linéaire positive et significative, plus marquée pour la richesse observée que pour celle du SSP (**FIGURE 10A** et **B**). L'ajout des espèces de la diversité sombre atténue légèrement cette relation, indiquant que la taille de la diversité sombre ne se limite pas aux erreurs d'inventaire, mais résulte également d'autres déterminants écologiques ou méthodologiques.

Parallèlement, la richesse du SSP dépasse celle estimée par Jackknife, confirmant que l'appartenance à la diversité sombre ne s'explique pas uniquement par l'omission d'espèces lors des relevés.

Malgré cette indépendance partielle, la diversité sombre présente un lien significatif avec le nombre d'espèces manquées selon Jackknife (R^2 = 0,17, **FIGURE 10C**), montrant qu'une fraction des espèces omises contribue effectivement à ce pool. Cette observation suggère que l'inclusion de la diversité sombre dans une démarche de bioindication permet de compenser partiellement les limites de l'échantillonnage et de renforcer le signal bioindicatif.

Néanmoins, le fait qu'une proportion de la diversité sombre ne soit pas associée aux omissions souligne l'existence de facteurs additionnels, dont l'identification constitue un enjeu pour des études ultérieures.

3.2. La composition floristique du sous-bois ne bioindique pas les variations temporelles des conditions édaphiques forestières

Un résultat central de cette thèse est l'absence de corrélation entre l'évolution temporelle des valeurs bioindiquées par la végétation exprimée du sous-bois et les mesures directes des propriétés du sol, alors même que la végétation est souvent mobilisée pour suivre les changements environnementaux sur le long terme. Le CHAPITRE 1 a montré qu'à la fois à l'échelle nationale et à celle des placettes du réseau RENECOFOR, **les dynamiques édaphiques bioindiquées et mesurées apparaissent systématiquement discordantes**. Les analyses méthodologiques confirment par ailleurs que ce constat ne dépend pas de la méthode employée. Ces résultats invalident l'hypothèse H1 selon laquelle les communautés du sous-bois pourraient servir de bons bioindicateurs des variations temporelles des conditions édaphiques.

Cette observation invite à examiner les mécanismes écologiques et méthodologiques susceptibles d'expliquer cette déconnexion. Plusieurs hypothèses avaient été formulées lors de la discussion du chapitre 1 pour rendre compte de cette divergence, et les résultats des CHAPITRES 2 et 3 permettent désormais de confirmer certaines d'entre elles tout en en écartant d'autres. Cette section se propose donc de mettre en perspective l'ensemble des résultats de la thèse et d'évaluer les facteurs qui influencent la réponse des communautés floristiques aux variations édaphiques.

3.2.1 L'utilisation de la diversité sombre réfute l'hypothèse d'une « dette édaphique »

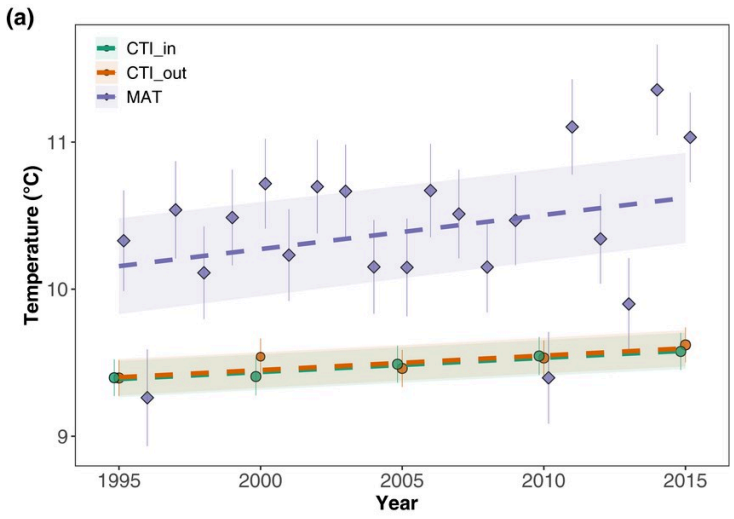


FIGURE 11 Comparaison des dynamiques de température bioindiquées et mesurées sur le RENECOFOR entre 1995 et 2015.

Richard *et al.*, 2021

L'absence de cohérence entre les dynamiques bioindiquées et mesurées des conditions édaphiques rappelle les résultats de Richard *et al.* (2021), qui ont mis en évidence un décalage temporel entre les températures mesurées et celles bioindiquées sur le réseau RENECOFOR (**FIGURE 11**). Présenté comme une « dette climatique », ce phénomène se traduit par le fait que la végétation bioindique bien une augmentation des températures entre 1995 et 2015, mais à un rythme trois fois plus lent que celui effectivement mesuré. Étant donné que les mêmes données floristiques et une méthodologie comparable ont été employées pour attribuer aux espèces du sous-bois des valeurs indicatrices à partir des bases CATMINAT et EcoPlant, il apparaît naturel d'interpréter l'absence de réaction de la végétation comme le reflet d'une « dette édaphique ».

Ce décalage résulte probablement du délai de réponse de certaines espèces aux variations des conditions environnementales (Jackson and Sax, 2010 ; Bertrand *et al.*, 2016 ; Talluto *et al.*, 2017 ; Alexander *et al.*, 2018). Comme rappelé dans l'introduction du **CHAPITRE 2,** certaines espèces persistent alors que les conditions ne sont plus favorables pour elles, constituant ce que l'on appelle une « dette d'extinction », tandis que d'autres, bien adaptées écologiquement, n'ont pas encore colonisé le site, représentant un « crédit de colonisation » (Tilman *et al.*, 1994 ; Hishe *et al.*, 2022). Dans l'étude de Richard *et al.* (2021), les espèces en dette d'extinction privilégieraient des températures plus basses, tandis que celles en crédit de colonisation seraient associées à des températures plus élevées. Le ralentissement du signal bioindicatif pourrait ainsi résulter du temps nécessaire à la disparition ou à l'arrivée de ces espèces.

Jusqu'à présent, il était difficile de vérifier cette hypothèse, car prévoir la disparition ou l'arrivée d'une espèce sur un site reste fastidieux. Dans le **CHAPITRE 2**, en combinant le concept de diversité sombre avec le cadre théorique de Trindade *et al.* (2020), nous avons pu identifier les espèces en dette d'extinction et en crédit de colonisation, et vérifier si leurs valeurs indicatrices reflétaient effectivement les variations édaphiques. Trois pools d'espèces ont été définis : la végétation observée, la diversité sombre, et la combinaison des deux constituant le site-specific species pool. Les espèces « payant la dette d'extinction » étaient celles observées en 1995 mais absentes du pool spécifique en 2015, tandis que celles « prenant un crédit de colonisation » étaient initialement hors du pool en 1995 et présentes dans la diversité sombre en 2015.

Dans le cas de l'augmentation du rapport C/N du sol, si l'absence de réaction de la végétation correspondait à une « dette édaphique », les espèces en dette auraient dû indiquer un C/N plus faible que la moyenne, et celles en crédit, un C/N plus élevé. Nos résultats montrent cependant que ces espèces n'ont pas de valeurs indicatrices distinctes de celles restant observées entre 1995 et 2015. En d'autres termes, l'intégration de la diversité sombre et du concept de Trindade *et al.* (2020) dans la bioindication suggère que l'absence de cohérence entre les dynamiques édaphiques bioindiquées et mesurées ne résulte pas d'une « dette édaphique ».

3.2.2 Les conditions édaphiques et la végétation du sous-bois varient selon différents facteurs

L'un des résultats marquants du **CHAPITRE 1** est de montrer que les dynamiques des conditions édaphiques, mesurées et bioindiquées, ne dépendent pas des mêmes facteurs. Les variations des conditions du sol semblent principalement influencées par leur état initial. En revanche, la dynamique de la végétation du sous-bois est surtout modulée par l'ouverture de la canopée et par l'accumulation des perturbations sur le site, notamment d'origine anthropique (e.g. éclairci, extraction d'arbre), en accord avec la littérature (Pickett *et al.*, 1985 ; Dupouey *et al.*, 2002 ; Dormann *et al.*, 2020). Autrement dit, l'absence de cohérence entre les dynamiques bioindiquées et mesurées pourrait résulter de l'importance relative de ces perturbations pour la végétation, plutôt que de variations physico-chimiques du sol.

Les résultats du **CHAPITRE 2** vont dans ce sens. **En intégrant la diversité sombre dans l'analyse de la capacité de la végétation du sous-bois à bioindiquer spatialement et temporellement les conditions édaphiques, la qualité de la bioindication s'améliore nettement**, confirmant l'hypothèse **H2** de notre étude. Les dynamiques des conditions édaphiques bioindiquées par la diversité sombre, ou plus largement par le pool spécifique des sites, deviennent cohérentes avec celles mesurées, à la fois à l'échelle nationale et locale.

Ce gain de cohérence ne résulte pas de la prise en compte des espèces payant la dette d'extinction ou prenant un crédit de colonisation entre 1995 et 2015, comme mentionné précédemment. Il s'explique plutôt par le turnover entre la diversité observée et la diversité sombre : les espèces qui passent d'un pool à l'autre sont celles dont l'installation ou la disparition semble fortement influencée par le régime de perturbation et l'ouverture de la canopée. Ces résultats renforcent l'idée développée au **CHAPITRE 1** selon laquelle les perturbations influencent significativement la dynamique du sous-bois, indépendamment des variations édaphiques, brouillant ainsi la cohérence entre dynamiques mesurées et bioindiquées.

Pour vérifier que l'appartenance des espèces à la diversité sombre est réellement liée aux perturbations, nous avons comparé la taille moyenne de ce pool entre sites perturbés et non perturbés (**FIGURE 12A**). Les sites non perturbés présentent une diversité sombre significativement plus importante, ce qui suggère que certaines espèces de la diversité sombre nécessitent un niveau minimal de perturbation pour s'installer. En revanche, au sein des sites perturbés, la taille de la diversité sombre est positivement corrélée au nombre cumulé de perturbations entre 1995 et 2015 (**FIGURE 12B**). Cette observation suggère que l'accumulation modérée de perturbations favoriserait l'installation de certaines espèces, tandis qu'un excès de perturbations empêcherait l'établissement d'espèces moins tolérantes. Autrement dit, l'absence de perturbation peut être défavorable à certaines espèces, mais un excès peut également compromettre la présence d'autres.

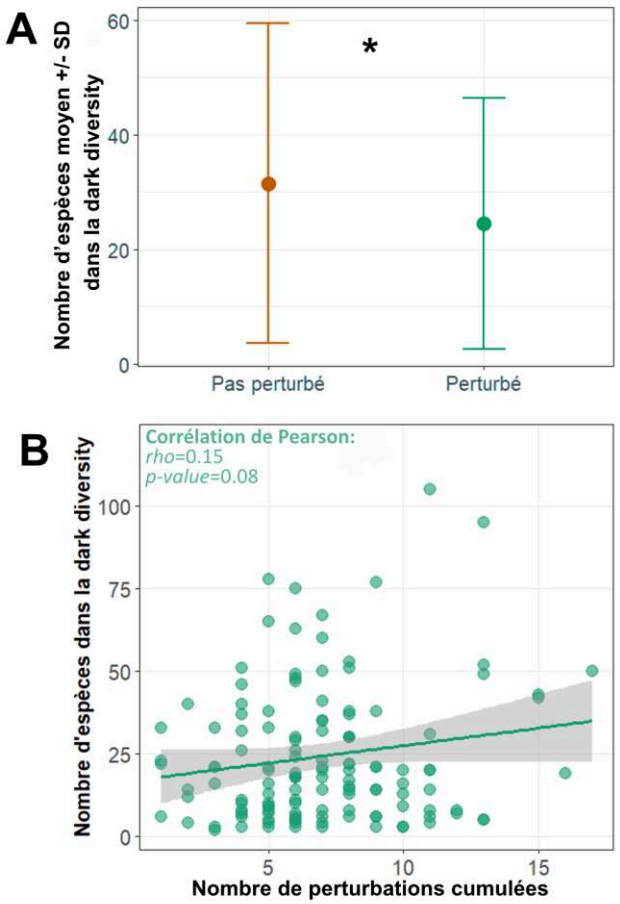


FIGURE 12 Effet des perturbations sur la richesse de la diversité sombre.

Le panneau A montre la comparaison des richesses moyennes de diversité sombre selon la présence ou l'absence de perturbation sur les placettes (test de Wilcoxon significatif).

Le panneau B illustre la relation entre la richesse de la diversité sombre et le nombre de perturbations cumulées.

Ces résultats montrent que la présence ou l'absence d'espèces sur les sites du réseau RENECOFOR dépend largement du régime de perturbation local. Par conséquent, des espèces adaptées aux conditions écologiques du site, et donc capables de bioindiquer les propriétés édaphiques, peuvent être absentes en raison d'un déficit ou d'un excès de perturbations, ce qui affecte la cohérence entre valeurs bioindiquées et mesures directes. L'intégration des espèces de la diversité sombre permet de neutraliser cet effet : toutes les espèces écologiquement viables sur le site, indépendamment des événements aléatoires tels que les perturbations, sont ainsi prises en compte, rétablissant une bioindication cohérente avec les valeurs mesurées.

3.2.3 Les traits fonctionnels sont des indicateurs plus sensibles que les valeurs indicatrices

L'application du concept de diversité sombre dans le **CHAPITRE 2** a permis de « restaurer » une certaine cohérence entre les dynamiques édaphiques indiquées par la végétation du sous-bois et celles mesurées dans le sol. Les dynamiques nationales et locales, notamment lorsqu'elles sont observées via le pool spécifique des sites, reflètent globalement celles mesurées dans le sol. Cependant, cette cohérence reste moins marquée que celle observée à l'échelle spatiale. À l'échelle spatiale, le pool spécifique bioindique des valeurs très proches de celles mesurées, alors qu'à l'échelle temporelle, il ne rend compte que de tendances générales. Ainsi, la bioindication des variations temporelles à partir des valeurs indicatrices de la communauté est beaucoup moins efficace que la bioindication spatiale, même lorsqu'on mobilise la diversité sombre.

Cette différence s'explique par l'amplitude des variations des conditions édaphiques à différentes échelles. Pour le rapport C/N, par exemple, l'écart entre les valeurs minimale et maximale mesurées sur les 102 placettes du réseau RENECOFOR en 1995 atteint environ 30, tandis que l'évolution moyenne temporelle entre 1993-1997 et 2007-2012 n'est que de 1,5. Là où les variations spatiales sont suffisantes pour provoquer un turnover d'espèces et générer un signal bioindicatif à partir des valeurs indicatrices, les variations temporelles apparaissent trop faibles pour déclencher le même mécanisme.

De plus, les valeurs indicatrices ne prennent en compte que l'optimum écologique des espèces, sans refléter leur amplitude écologique. Les espèces euryèces, telles que *Rubus fruticosus*, *Lonicera periclylenum* ou *Hedera helix*, peuvent persister sur un large gradient de conditions édaphiques (Dengler *et al.*, 2023). Pour que ces espèces apparaissent ou disparaissent d'un site, les conditions doivent varier suffisamment pour atteindre le seuil de leur amplitude écologique, condition nécessaire à la production d'un signal bioindicatif à l'échelle de la communauté.

Ces observations soulèvent une question fondamentale : à partir de quel seuil de variation des conditions édaphiques les valeurs indicatrices deviennent-elles réellement informatives, c'est-à-dire capables de refléter un turnover significatif des espèces du sous-bois ? La littérature aborde rarement cette question de manière quantitative, mais certaines données permettent d'avancer des ordres de grandeur. Pour le rapport C/N, MacDonald *et al.* (2002) suggèrent que ce ratio doit dépasser environ 25 unités dans les sols forestiers pour que la disponibilité en azote diminue suffisamment et réduise

significativement l'abondance des espèces nitrophiles. Pour le pH du sol, Peppler-Lisbach (2009) a montré que le turnover des espèces dans les forêts de feuillus allemandes augmente de manière significative pour des sols très acides (≈ 2,8–3,7), traduisant des changements marqués dans la composition floristique, devenant plus acidiphile.

Ces seuils sont relativement élevés et les atteindre nécessite souvent plusieurs dizaines d'années, notamment lorsque les conditions édaphiques initiales se situent dans des valeurs intermédiaires (par exemple, un pH autour de 4,5 et un rapport C/N de 20). Selon nos données, il faudrait attendre plusieurs décennies pour que ces valeurs soient atteintes et qu'un signal bioindicatif se manifeste. Les valeurs indicatrices traditionnelles restent ainsi peu sensibles aux variations modestes, ce qui limite leur capacité à détecter des changements subtils à l'échelle temporelle dans la végétation du sous-bois.

Pour pallier cette limite, nous avons cherché à intégrer l'amplitude écologique des espèces et le turnover des communautés, afin de développer une bioindication plus sensible. C'est l'objet du **CHAPITRE 3**, où nous avons étudié les traits fonctionnels du LES pour bioindiquer les variations édaphiques de C/N. L'analyse a montré que certaines espèces, notamment *Rubus fruticosus*, présentent une amplitude écologique très large, étant présentes sur l'ensemble des 22 sites du gradient édaphique de P (10,2-243,5 $mg \cdot kg^{-1}$) et de C/N (13,3-41,5). Le long de ce gradient, les traits fonctionnels du LES varient, traduisant un changement de stratégie d'acquisition des ressources : conservatrice dans les sols les plus pauvres, acquisitrice dans les sols les plus riches. L'étude des traits a ainsi permis de prendre en compte la variabilité intraspécifique, là où la seule valeur indicatrice de l'espèce resterait identique car centrée sur l'optimum écologique.

En analysant la variabilité des traits au niveau des assemblages des espèces dominantes du sous-bois, nous avons pu construire une métrique reflétant la stratégie de ressources des communautés. Dans des conditions homogènes de chênaie, le positionnement le long de cette stratégie présente une relation beaucoup plus forte avec le C/N édaphique mesuré que les valeurs indicatrices moyennes de l'assemblage. La variabilité de stratégie observée le long du gradient résulte presque autant de la variabilité intraspécifique que du turn-over d'espèces, confirmant l'importance de prendre en compte l'ITV souvent énoncé dans littérature (Garnier *et al.*, 2004 ; Albert *et al.*, 2011 ; Fajardo *et al.*, 2018).

Ainsi, **l'utilisation des traits comme indicateurs, plutôt que des valeurs indicatrices classiques, rend la bioindication temporelle de la végétation beaucoup plus sensible**, permettant de capter jusqu'à la moitié de l'information portée par la variabilité intraspécifique, ce qui valide l'hypothèse **H3**. Par ailleurs, cette approche a permis de définir des seuils de transition de stratégie le long du gradient de C/N dans les chênaies : les assemblages dominants adoptent une stratégie d'acquisition pour un C/N inférieur à 17,5 et une stratégie conservatrice au-delà de 19,5. Cet écart de seulement 2 unités, comparé à la variation temporelle observée de 1,5 entre les campagnes de sol, suggère qu'une bioindication fondée sur les traits pourrait détecter les dynamiques modérées effectivement observées sur le réseau RENECOFOR.

3.3. Implications et perspectives

3.3.1 Remise en question de l'usage de la composition floristique comme proxy des variations des conditions environnementales dans le temps

Les résultats obtenus dans ce travail conduisent à reconsidérer la fiabilité de la composition floristique comme indicateur temporel des variations édaphiques, en particulier lorsque celles-ci sont de faible amplitude. Si la bioindication floristique s'est révélée robuste pour décrire les gradients spatiaux du sol, son usage pour suivre les changements temporels sur quelques décennies, ici 26 ans, apparaît plus limité.

La flore du sous-bois semble peu réactive aux fluctuations édaphiques de faible intensité, que ce soit pour le rapport C/N ou pour d'autres propriétés du sol, mais elle est particulièrement sensible aux régimes de perturbation sur les placettes du réseau RENECOFOR. Ces observations sont cohérentes avec la littérature : les ouvertures de canopée, qu'elles résultent de perturbations naturelles (chablis, sénescence) ou anthropiques (éclaircies, coupes), entraînent des modifications rapides des conditions lumineuses et microclimatiques du sous-bois (Valladares *et al.*, 2016 ; De Frenne *et al.*, 2024). De telles variations provoquent, en quelques années seulement, un turnover marqué des communautés herbacées, avec l'installation d'espèces héliophiles lors des phases d'ouverture, suivie d'un retour progressif d'espèces sciaphiles à mesure que le couvert se referme (Closset-Kopp *et al.*, 2006 ; Verheyen *et al.*, 2012 ; Bernhardt-Römermann *et al.*, 2015).

À l'inverse, les propriétés édaphiques (pH, rapport C/N, disponibilité en phosphore, etc.) présentent une inertie temporelle beaucoup plus forte. Leur évolution, bien que déterminante pour la structure floristique à long terme, se produit sur des pas de temps pluri-décennaux à séculaires (Dupouey *et al.*, 2002 ; Dirnböck *et al.*, 2014). Les études ayant mis en évidence un couplage fort entre changements floristiques et édaphiques concernent généralement des périodes beaucoup plus longues ou des changements environnementaux plus marqués (Baeten *et al.*, 2009 ; Mc Govern *et al.*, 2011). En comparaison, la période étudiée ici dans le réseau RENECOFOR, bien que scientifiquement précieuse, représente un intervalle trop court pour détecter une réponse floristique mesurable.

Ainsi, la présente étude invite à relativiser l'usage de la flore comme proxy temporel des conditions édaphiques, sans remettre en cause son intérêt pour des suivis à très long terme ou dans des contextes où les variations édaphiques sont suffisamment importantes pour induire un turn-over significatif.

3.3.2 La diversité sombre, un nouvel outil pertinent pour la bioindication

L'intégration de la diversité sombre dans l'approche de bioindication ouvre des perspectives particulièrement prometteuses. En considérant les espèces absentes mais écologiquement compatibles avec le site, cette approche permet de maintenir la fiabilité de la bioindication même dans des contextes de faible signal observé.

Nos résultats montrent que la diversité sombre constitue un indicateur sensible des conditions environnementales locales et reflète également l'effet des perturbations sur la dynamique de la flore observée. Sa prise en compte permet de démêler l'absence de signal et de mieux interpréter la composition floristique. Dans notre étude, les espèces identifiées comme « en dette » ou « en crédit » n'indiquaient pas de variations cohérentes avec les conditions édaphiques du sol. Cependant, l'application de ce cadre aux analyses de Richard *et al.* (2021) pourrait permettre de distinguer, de manière similaire, si un décalage temporel observé correspond effectivement à une « dette climatique ».

Pour que la diversité sombre devienne un outil pleinement opérationnel de bioindication, il sera nécessaire d'approfondir la compréhension des mécanismes qui déterminent l'appartenance des espèces à ce pool. Autrement dit, il faut pouvoir identifier si leur absence résulte d'un déficit de dispersion, d'une perturbation récente ou d'un délai de réponse aux conditions actuelles du site. Le développement d'analyses fonctionnelles ciblées sur la diversité sombre pourrait contribuer à préciser ces mécanismes.

En somme, la diversité sombre offre un cadre conceptuel innovant pour intégrer, à la bioindication, non seulement l'état observé des communautés, mais également leur potentiel écologique latent. Elle apporte ainsi une vision plus dynamique de la biodiversité et renforce la capacité des approches végétales à rendre compte des variations environnementales locales.

3.3.3 Application des traits dans le concept de bioindication temporelle

Au-delà des valeurs indicatrices, les traits fonctionnels représentent un levier particulièrement prometteur pour affiner la bioindication écologique. Leur intérêt réside dans leur capacité à capturer directement la stratégie écologique des espèces, indépendamment de la composition taxonomique. En particulier, les traits du Leaf Economics Spectrum (LES), tels que la Specific Leaf Area (SLA) et la Leaf Dry Matter Content (LDMC), reflètent le continuum fondamental entre stratégies d'acquisition rapide et de conservation des ressources (Wright *et al.*, 2004).

Ces deux traits, relativement universels et écologiquement bien interprétés, permettent de décrire la réponse fonctionnelle des communautés végétales aux gradients environnementaux et aux perturbations. Dans le cadre de la bioindication, les traits du LES présentent un fort potentiel de généralisation : une SLA élevée traduit généralement un environnement plus riche et lumineux, tandis qu'une LDMC élevée reflète des conditions plus stressantes ou pauvres en ressources.

Cependant, contrairement aux valeurs indicatrices classiques, l'utilisation pratique des traits reste limitée par la complexité de leur mesure et la nécessité de traitements statistiques sophistiqués (e.g. PCA, normalisation multi-traits). Afin de rendre l'approche fonctionnelle plus accessible, il apparaît pertinent de développer des indices synthétiques, simples à mesurer et interpréter, tout en conservant la robustesse écologique des traits du LES.

Dans cette perspective, nous proposons un indice d'Acquisition/Conservation Simplifié (ACS), fondé uniquement sur SLA et LDMC, mesurés sur une espèce ubiquiste et écologiquement plastique : *Rubus fruticosus* agg. Cet indice se calcule ainsi :

$$ACS = scale(LDMC) - scale(SLA)$$

Où les deux variables sont centrées-réduites pour être comparables. L'ACS fournit une métrique unique traduisant la stratégie foliaire dominante de l'espèce, allant de conservatrice (valeurs positives : LDMC élevée, SLA faible) à acquisitrice (valeurs négatives : LDMC faible, SLA élevée).

En testant l'efficacité de cet indice sur le gradient de C/N édaphique constitué par les 10 sites de chênaie, une relation claire émerge : les sites à faible C/N (sols riches en azote) présentent des ACS faibles à négatifs, traduisant une stratégie d'acquisition, tandis que les sites à fort C/N (sols pauvres) affichent des ACS élevés, correspondant à une stratégie de conservation. Cette cohérence fonctionnelle confirme que l'ACS constitue un indicateur synthétique robuste de la stratégie écologique des espèces et de la fertilité du sol.

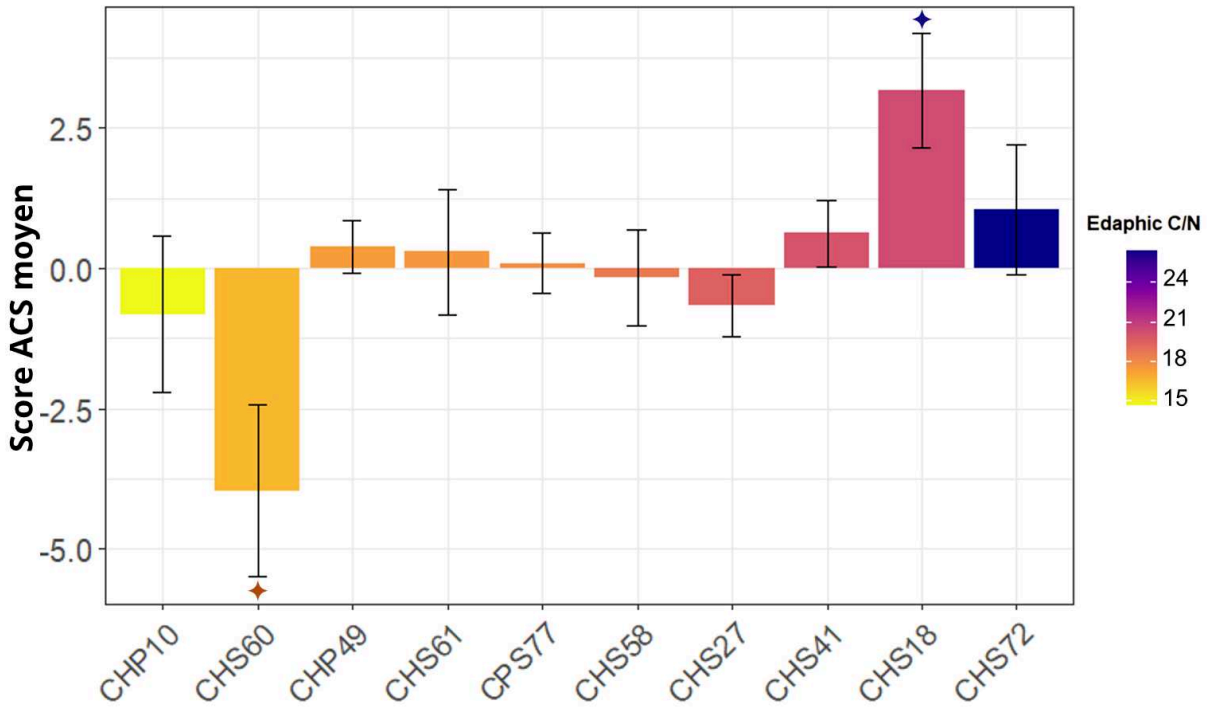


FIGURE 13 Test de l'efficacité de l'indice d'acquisition–conservation simplifié (ACS) pour bioindiquer le gradient de C/N édaphique dans les dix placettes de chênaie.

Les étoiles rouges indiquent des scores moyens significativement inférieurs à 0, et les étoiles bleues des scores significativement supérieurs à 0 (test t, $\mu = 0$).

L'un des principaux atouts de l'ACS réside dans sa simplicité : il ne nécessite que deux mesures foliaires sur une espèce ubiquiste, sans traitement multivarié. Le choix de *Rubus fruticosus*, présente dans de nombreux types forestiers et réactive aux variations d'ouverture du couvert, de disponibilité en nutriments ou d'humidité du sol, est stratégique : il permet de disposer d'un proxy fiable, reproductible et facilement mesurable sur le terrain.

Cette approche ouvre la voie à une bioindication fonctionnelle simplifiée, combinant la sensibilité écologique des traits du LES avec la praticité d'un indicateur mono-espèce. Des validations à plus large échelle, sur différents contextes forestiers et gradients de perturbation, permettront d'évaluer la robustesse et la transférabilité de cet indice, qui pourrait compléter les approches traditionnelles basées sur les valeurs indicatrices et enrichir les outils de diagnostic écologique disponibles pour la gestion forestière.

4. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude met en évidence que **la dynamique de la végétation du sous-bois ne reflète pas de manière fidèle les variations temporelles des conditions édaphiques**, du moins sur des périodes de l'ordre de quelques décennies. Si la bioindication floristique s'avère robuste pour caractériser les gradients spatiaux du sol, sa sensibilité aux changements temporels est limitée par la lenteur des évolutions édaphiques et par l'influence prépondérante des régimes de perturbation locale sur la composition floristique.

L'intégration de la diversité sombre constitue un outil particulièrement pertinent pour pallier cette limitation. En tenant compte des espèces écologiquement compatibles mais absentes sur le terrain, cette approche permet de neutraliser l'effet des perturbations aléatoires et de restaurer un signal bioindicatif cohérent avec les conditions édaphiques réelles. La diversité sombre apparaît ainsi comme un indicateur sensible, capable de compléter et de préciser l'information issue des relevés floristiques classiques, en intégrant le potentiel écologique latent des communautés.

Par ailleurs, **l'approche fonctionnelle fondée sur les traits, montre que les variations des stratégies d'acquisition des ressources sont plus réactives aux gradients édaphiques que les valeurs indicatrices traditionnelles**. L'ACS capture efficacement la réponse fonctionnelle des communautés aux variations de fertilité du sol sur de faibles amplitudes, révélant que la bioindication temporelle peut être améliorée en s'appuyant sur des traits bien choisis et mesurés de manière ciblée.

En conclusion, la dynamique floristique du sous-bois ne constitue pas un proxy temporel parfait des variations édaphiques sur des périodes courtes. Toutefois, la combinaison de deux leviers, (i) la prise en compte de la diversité sombre, (ii) l'utilisation des traits fonctionnels et la focalisation sur les espèces dominantes ou ubiquistes, offre une stratégie intégrée permettant d'augmenter la sensibilité et la fiabilité de la bioindication temporelle.

Références Bibliographiques

A

Achat, D., Pousse, N., Nicolas, M., Bredoire, F., & Augusto, L. (2016). Soil properties controlling inorganic phosphorus availability : General results from a national forest network and a global compilation of the literature. Biogeochemistry, 127(2), 255-272. https://doi.org/10.1007/s10533-015-0178-0

Ackerly, D. D., & Cornwell, W. K. (2007a). A trait-based approach to community assembly : Partitioning of species trait values into within- and among-community components. Ecology Letters, 10(2), 135-145. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.01006.x

Ackerly, D. D., & Cornwell, W. K. (2007b). A trait-based approach to community assembly : Partitioning of species trait values into within- and among-community components. Ecology Letters, 10(2), 135-145. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.01006.x

Albert, C. H., Grassein, F., Schurr, F. M., Vieilledent, G., & Violle, C. (2011). When and how should intraspecific variability be considered in trait-based plant ecology? Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 13(3), 217-225. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.04.003

Alexander, J. M., Chalmandrier, L., Lenoir, J., Burgess, T. I., Essl, F., Haider, S., Kueffer, C., McDougall, K., Milbau, A., Nuñez, M. A., Pauchard, A., Rabitsch, W., Rew, L. J., Sanders, N. J., & Pellissier, L. (2018). Lags in the response of mountain plant communities to climate change. Global Change Biology, 24(2), 563-579. https://doi.org/10.1111/gcb.13976

Archaux, F., Boulanger, V., Camaret, S., Corcket, E., Dupouey, J. L., Forgeard, F., Heuzé, P., Lebret-Gallet, M., Mårell, A., Payet, K., Ulrich, E., Behr, P., Bourjot, L., Brêthes, A., Chevalier, R., Dobremez, J. F., Dumas, Y. Y., Dumé, G., Forêt, M., … Triesch, S. (2009). RE-NECOFOR. Dix ans de suivi de la végétation forestière : Aspects méthodologiques et évolution temporelle de la flore (1994/1995-2005). Office National des Forêts. https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00576688

Archaux, F., Gosselin, F., Bergès, L., & Chevalier, R. (2006). Effects of sampling time, species richness and observer on the exhaustiveness of plant censuses. Journal of Vegetation Science, 17(3), Article 3. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2006.tb02449.x

Archer, J. K., Miller, D. L., & Tanner, G. W. (2007). Changes in Understory Vegetation and Soil Characteristics following Silvicultural Activities in a Southeastern Mixed Pine Forest. The Journal of the Torrey Botanical Society, 134(4), 489-504.

Ares, A., Berryman, S. D., & Puettmann, K. J. (2009). Understory vegetation response to thinning disturbance of varying complexity in coniferous stands. Applied Vegetation Science, 12(4), Article 4. https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2009.01042.x

Aubert, M., Alard, D., & Bureau, F. (2003). Diversity of plant assemblages in managed temperate forests : A case study in Normandy (France). Forest ecology and management, 175(1-3), 321-337.

Aubert, M., Bureau, F., Alard, D., & Bardat, J. (2004). Effect of tree mixture on the humic epipedon and vegetation diversity in managed beech forests (Normandy, France). Canadian Journal of Forest Research, 34(1), 233-248. https://doi.org/10.1139/x03-205

B

Baeten, L., Bauwens, B., De Schrijver, A., De Keersmaeker, L., Van Calster, H., Vandekerkhove, K., Roelandt, B., Beeckman, H., & Verheyen, K. (2009). Herb layer changes (1954-2000) related to the conversion of coppice-with-standards forest and soil acidification. *Applied Vegetation Science*, *12*(2), 187-197. https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2009.01013.x

Bakker, J. P., Olff, H., Willems, J. H., & Zobel, M. (1996). Why do we need permanent plots in the study of long-term vegetation dynamics? *Journal of Vegetation Science*, *7*, 147-155. https://doi.org/10.2307/3236314

Bakshi, A., & Gilroy, S. (2022). Moving magnesium. *Molecular Plant*, *15*(5), 796-798. https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.04.005

Balandier, P., Marquier, A., Casella, E., Kiewitt, A., Coll, L., Wehrlen, L., & Harmer, R. (2012). Architecture, cover and light interception by bramble (Rubus fruticosus) : A common understorey weed in temperate forests. *Forestry*, *86*. https://doi.org/10.1093/forestry/cps066

Barbier, S., Gosselin, F., & Balandier, P. (2008). Influence of tree species on understory vegetation diversity and mechanisms involved—A critical review for temperate and boreal forests. *Forest Ecology and Management*, *254*(1), 1-15. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.038

Bärlocher, F., & Graça, M. A. S. (2005). Total Phenolics. In M. A. S. Graça, F. Bärlocher, & M. O. Gessner (Éds.), *Methods to Study Litter Decomposition : A Practical Guide* (p. 97-100). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0_14

Barthod, C. (1996). La gestion durable des forêts tempérées : Quelques défis pour le XXIe siècle. *Revue forestière française*, *48*(S), 235-252. https://doi.org/10.4267/2042/26800

Bartoń, K. (2013). MuMIn : Multi-model inference. In *R package version 1.10.0*. (Vol. 1).

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *ArXiv e-prints*, *arXiv:1406*. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01

Beals, E. W. (1984). Bray-Curtis Ordination : An Effective Strategy for Analysis of Multivariate Ecological Data. In A. MacFadyen & E. D. Ford (Éds.), *Advances in Ecological Research* (Vol. 14, p. 1-55). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60168-3

Begon, M. (1996). *Ecology : Individuals, Populations and Communities*. Blackwell Science.

Belinchón, R., Belinchón, R., Hemrová, L., & Münzbergová, Z. (2020). Functional traits determine why species belong to the dark diversity in a dry grassland fragmented landscape. *Oikos*, *129*(10), 1468-1480. https://doi.org/10.1111/oik.07308

Bello, F., Lepš, J., Lavorel, S., & Moretti, M. (2008). *Importance of species abundance for assessment of trait composition : An example based on pollinator communities*. https://doi.org/10.1556/comec.8.2007.2.3

Belyea, L. R., & Lancaster, J. (1999). Assembly Rules within a Contingent Ecology. *Oikos*, *86*(3), 402-416. https://doi.org/10.2307/3546646

Berg, B. (2014). Decomposition patterns for foliar litter – A theory for influencing factors. *Soil Biology and Biochemistry*, *78*, 222-232. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.08.005

Bernard-Verdier, M., Navas, M.-L., Vellend, M., Violle, C., Fayolle, A., & Garnier, E. (2012). Community assembly along a soil depth gradient : Contrasting patterns of plant trait convergence and divergence in a Mediterranean rangeland. *Journal of Ecology*, *100*(6), 1422-1433. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12003

Bernhardt-Römermann, M., Baeten, L., Craven, D., De Frenne, P., Hédl, R., Lenoir, J., Bert, D., Brunet, J., Chudomelová, M., Decocq, G., Dierschke, H., Dirnböck, T., Dörfler, I., Heinken, T., Hermy, M., Hommel, P., Jaroszewicz, B., Keczyński, A., Kelly, D. L., … Verheyen, K. (2015). Drivers of temporal changes in temperate forest plant diversity vary across spatial scales. *Global Change Biology*, *21*(10), 3726-3737. https://doi.org/10.1111/gcb.12993

Bertrand, R., Lenoir, J., Piedallu, C., Riofrío-Dillon, G., De Ruffray, P., Vidal, C., Pierrat, J.-C., & Gégout, J.-C. (2011). Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland forests. *Nature*, *479*(7374), 517-520. https://doi.org/10.1038/nature10548

Bertrand, R., Riofrío-Dillon, G., Lenoir, J., Drapier, J., de Ruffray, P., Gégout, J.-C., & Loreau, M. (2016). Ecological constraints increase the climatic debt in forests. *Nature Communications*, *7*(1), 12643. https://doi.org/10.1038/ncomms12643

Blandin, P. (1986). Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bull. Ecol.*, *17*, 215-307.

Bonneau, M., Lévy, G., & Montpied, P. (2003). Evaluation de la pertinence des deux méthodes d'analyse du phosphore dans les sols forestiers. *Revue forestière française*, *55*(1), 57-64. https://doi.org/10.4267/2042/5155

Bontemps, J.-D., Hervé, J.-C., & Denardou, A. (2019). Partition idéalisée et régionalisée de la composition en espèces ligneuses des forêts françaises. *Écoscience*, *26*(4), 291-308. https://doi.org/10.1080/11956860.2019.1588511

Boulanger, V., Baltzinger, C., Saïd, S., Ballon, P., Picard, J.-F., & Dupouey, J.-L. (2015). Decreasing deer browsing pressure influenced understory vegetation dynamics over 30 years. *Annals of Forest Science*, *72*(3), Article 3. https://doi.org/10.1007/s13595-014-0431-z

Boulanger, V., Dupouey, J.-L., Archaux, F., Badeau, V., Baltzinger, C., Chevalier, R., Corcket, E., Dumas, Y., Forgeard, F., Mårell, A., Montpied, P., Paillet, Y., Picard, J., Said, S., & Ulrich, E. (2018). Ungulates increase forest plant species richness to the benefit of non-forest specialists. *Global Change Biology*, *24*, e485-e495. https://doi.org/10.1111/gcb.13899

Braun-Blanquet, J. (1915). *Les Cévennes méridionales (massif de l'Aigoual) : Étude phytogéographique*. Société Générale d'Imprimerie.

Braun-Blanquet, J. (1932). *Plant Sociology : The Study of Plant Communities*. McGraw-Hill book Company, Incorporated.

Bricca, A., Bonari, G., Padullés Cubino, J., & Cutini, M. (2023). Effect of forest structure and management on the functional diversity and composition of understorey plant communities. *Applied Vegetation Science*, *26*(1), Article 1. https://doi.org/10.1111/avsc.12710

Buckland, S. T., Magurran, A. E., Green, R. E., & Fewster, R. M. (2005). Monitoring change in biodiversity through composite indices. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1454), 243-254. https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1589

Burnham, K. P., & Overton, W. S. (1979). Robust Estimation of Population Size When Capture Probabilities Vary Among Animals. *Ecology*, *60*(5), 927-936. https://doi.org/10.2307/1936861

C

Cadotte, M. W., Arnillas, C. A., Livingstone, S. W., & Yasui, S.-L. E. (2015). Predicting communities from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution*, *30*(9), 510-511. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.07.001

Camaret, S., Archaux, F., Dupouey, J.-L., & Ulrich, E. (2006). Contrôle qualité de l'échantillonnage de la végétation basse dans le réseau français RENECOFOR (PIC niveau II) : Estimation des effets observateur. *Forests in a changing Environment. Results of 20 years of ICP Forests monitoring*, 31 p. https://hal.inrae.fr/hal-02814444

Camaret, S., & Brêthes, A. (2004). *Suivi de la composition floristique des placettes du réseau (1994/95-2000) et élaboration d'un programme d'assurance qualité intensif*. Office National des Forêts-Direction Technique.

Candolle, A.-P. de. (1820). *Essai élémentaire de géographie botanique*. Impr. de F.G. Levrault.

Cardou, F., & Cadotte, M. (2023). *From pattern to process in the search for generality* (p. 151-171). https://doi.org/10.1201/9781003314332-9

Carmona, C. P., & Pärtel, M. (2021). Estimating probabilistic site-specific species pools and dark diversity from co-occurrence data. *Global Ecology and Biogeography*, *30*(1), 316-326. https://doi.org/10.1111/geb.13203

Carmona, C. P., Szava-Kovats, R., & Pärtel, M. (2019). Estimating probabilistic dark diversity based on the hypergeometric distribution. *bioRxiv*, 636753. https://doi.org/10.1101/636753

Carpenter, W., & Goodenough, A. (2014). How robust are community-based plant bioindicators? Empirical testing of the relationship between Ellenberg values and direct environmental measures in woodland communities. *Community Ecology*, *15*(1), 1-11. https://doi.org/10.1556/ComEc.15.2014.1.1

Chianucci, F., & Macek, M. (2023). hemispheR : An R package for fisheye canopy image analysis. *Agricultural and Forest Meteorology*, *336*, 109470. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2023.109470

Chollet, S., Dano, M., Thiébaut, G., & Jung, V. (2025). Dark diversity and habitat conservation status : Two sides of the same coin for conservation and restoration? *Ecological Indicators*, *170*, 112990. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.112990

Christensen, R. H. B. (2018). *Satterthwaite's Method for Degrees of Freedom in Linear Mixed Models*.

Chytrý, M., Hejcman, M., Hennekens, S. M., & Schellberg, J. (2009). Changes in vegetation types and Ellenberg indicator values after 65 years of fertilizer application in the Rengen Grassland Experiment, Germany. *Applied Vegetation Science*, *12*(2), 167-176. https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2009.01011.x

Clements, F. E. (1916). *Plant Succession : An Analysis of the Development of Vegetation*. Carnegie Institution of Washington.

Clements, F. E. (1936). Nature and Structure of the Climax. *Journal of Ecology*, *24*(1), 252-284. https://doi.org/10.2307/2256278

Closset-Kopp, D., Schnitzler, A., & Aran, D. (2006). Dynamics in Natural Mixed-beech Forest of the Upper Vosges. *Biodiversity & Conservation*, *15*(4), 1063-1093. https://doi.org/10.1007/s10531-004-1874-6

Craine, J. M. (2009). *Resource Strategies of Wild Plants*. Princeton University Press. https://doi.org/10.1515/9781400830640

D

Delgado, V., & Ederra, A. (2013). Long-term changes (1982–2010) in the bryodiversity of Spanish beech forests assessed by means of Ellenberg indicator values of temperature, nitrogen, light and pH. Biological Conservation, 157, 99-107. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.06.022

Delian, E., Chira, A., Dulescu, L. B., & Chira, L. a. (2014). CALCIUM ALLEVIATES STRESS IN PLANTS : INSIGHT INTO REGULATORY MECHANISMS. AgroLife Scientific Journal. https://www.semanticscholar.org/paper/CALCIUM-ALLEVIATES-STRESS-IN-PLANTS%3A-INSIGHT-INTO-Delian-Chira/8fe1900e4ce18a6fa26082fd0d2deff8f6ae7485

Delpiano, C. A., Prieto, I., Loayza, A. P., Carvajal, D. E., & Squeo, F. A. (2020). Different responses of leaf and root traits to changes in soil nutrient availability do not converge into a community-level plant economics spectrum. Plant and Soil, 450(1), 463-478. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04515-2

Dengler, J., Jansen, F., Chusova, O., Hüllbusch, E., Nobis, M. P., Meerbeek, K. V., Axmanová, I., Bruun, H. H., Chytrý, M., Guarino, R., Karrer, G., Moeys, K., Raus, T., Steinbauer, M. J., Tichý, L., Tyler, T., Batsatsashvili, K., Bita-Nicolae, C., Didukh, Y., … Gillet, F. (2023). Ecological Indicator Values for Europe (EIVE) 1.0. Vegetation Classification and Survey, 4, 7-29. https://doi.org/10.3897/VCS.98324

de Vries, W., Dobbertin, M. H., Solberg, S., van Dobben, H. F., & Schaub, M. (2014). Impacts of acid deposition, ozone exposure and weather conditions on forest ecosystems in Europe : An overview. Plant and Soil, 380(1), 1-45. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2056-2

de Vries, W., & Schulte-Uebbing, L. (2019). Impacts of Nitrogen Deposition on Forest Ecosystem Services and Biodiversity. In M. Schröter, A. Bonn, S. Klotz, R. Seppelt, & C. Baessler (Éds.), Atlas of Ecosystem Services : Drivers, Risks, and Societal Responses (p. 183-189). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96229-0_29

Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J. H. C., Wright, I. J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönisch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P. B., Moles, A. T., Dickie, J., Gillison, A. N., Zanne, A. E., … Gorné, L. D. (2016). The global spectrum of plant form and function. Nature, 529(7585), 167-171. https://doi.org/10.1038/nature16489

Díaz, S., Lavorel, S., de Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K., & Robson, T. M. (2007a). Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(52), 20684-20689. https://doi.org/10.1073/pnas.0704716104

Díaz, S., Lavorel, S., de Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K., & Robson, T. M. (2007b). Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(52), 20684-20689. https://doi.org/10.1073/pnas.0704716104

Diekmann, M. (2003). Species indicator values as an important tool in applied plant ecology – a review. Basic and Applied Ecology, 4(6), 493-506. https://doi.org/10.1078/1439-1791-00185

Diekmann, M., & Dupré, C. (1997). Acidification and Eutrophication of Deciduous Forests in Northwestern Germany Demonstrated by Indicator Species Analysis. Journal of Vegetation Science, 8(6), Article 6. https://doi.org/10.2307/3237030

Diekmann, M., & Falkengren-Grerup, U. (2002). Prediction of species response to atmospheric nitrogen deposition by means of ecological measures and life history traits. Journal of Ecology, 90(1), 108-120. https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00639.x

Dirnböck, T., Grandin, U., Bernhardt-Römermann, M., Beudert, B., Canullo, R., Forsius, M., Grabner, M.-T., Holmberg, M., Kleemola, S., Lundin, L., Mirtl, M., Neumann, M., Pompei, E., Salemaa, M., Starlinger, F., Staszewski, T., & Uziębło, A. K. (2014). Forest floor vegetation response to nitrogen deposition in Europe. Global Change Biology, 20(2), 429-440. https://doi.org/10.1111/gcb.12440

Dölle, M., & Schmidt, W. (2009). Impact of tree species on nutrient and light availability : Evidence from a permanent plot study of old-field succession. Plant Ecology, 203(2), Article 2. https://doi.org/10.1007/s11258-008-9547-2

Dormann, C. F., Bagnara, M., Boch, S., Hinderling, J., Janeiro-Otero, A., Schäfer, D., Schall, P., & Hartig, F. (2020). Plant species richness increases with light availability, but not variability, in temperate forests understorey. BMC Ecology, 20(1), 43. https://doi.org/10.1186/s12898-020-00311-9

Du, E., van Doorn, M., & de Vries, W. (2021). Spatially divergent trends of nitrogen versus phosphorus limitation across European forests. Science of The Total Environment, 771, 145391. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145391

Du, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Zhang, Z., & Zeng, F. (2023). Vein Network and Climatic Factors Predict the Leaf Economic Spectrum of Desert Plants in Xinjiang, China. Plants, 12(3), 581. https://doi.org/10.3390/plants12030581

Dupouey, J. L., Dambrine, E., Laffite, J. D., & Moares, C. (2002). Irreversible Impact of Past Land Use on Forest Soils and Biodiversity. Ecology, 83(11), 2978-2984. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2978:IIOPLU]2.0.CO;2

Dupouey, J.-L., Thimonnier, A., Lebourgeois, F., Becker, M., Picard, J.-F., & Timbal, J. (1999). Changements de la végétation dans les forêts du Nord-Est de la France entre 1970 et 1990. Revue forestière française, 51(2), 219-230. https://doi.org/10.4267/2042/5432

Dyer, W. J., & Wrenshall, C. L. (1941). ORGANIC PHOSPHORUS IN SOILS : I. THE EXTRACTION AND SEPARATION OF ORGANIC PHOSPHORUS COMPOUNDS FROM SOIL. Soil Science, 51(2), 159.

Dzwonko, Z. (2001). Assessment of light and soil conditions in ancient and recent woodlands by Ellenberg indicator values. Journal of Applied Ecology, 38(5), 942-951. https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00649.x

E

Ellenberg, H. (1960). Ökologische Pflanzengeographie. In E. Bünning & E. Gäumann (Éds.), Bericht über das Jahr 1959 (p. 112-130). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-94778-0_8

Ellenberg, H. (1973). Ziele und Stand der Ökosystemforschung. In H. Ellenberg (Éd.), Ökosystemforschung : Ergebnisse von Symposien der Deutschen Botanischen Gesellschaft und der Gesellschaft für Angewandte Botanik in Innsbruck, Juli 1971 (p. 1-31). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61951-9_1

Ellenberg, H., Weber, H. E., Düll, R., Wirth, V., & Werner, W. (1992). Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa.

Erdenetsogt, P., Munkhbat, N., Narmandakh, E., Idree, T., Yeh, C.-M., & Tsednee, M. (2024). Effect of long-term grazing on the contents of phenolic compounds in Carex and Aster plants in Mongolia. Mongolian Journal of Chemistry, 25(52), 43-50. https://doi.org/10.5564/mjc.v25i52.3582

Ewald, J. (2003). The sensitivity of Ellenberg indicator values to the completeness of vegetation relevés. Basic and Applied Ecology, 4(6), 507-513. https://doi.org/10.1078/1439-1791-00155

F

Fajardo, A., & Siefert, A. (2018). Intraspecific trait variation and the leaf economics spectrum across resource gradients and levels of organization. Ecology, 99(5), 1024-1030. https://doi.org/10.1002/ecy.2194

Fauth, J. E., Bernardo, J., Camara, M., Resetarits, W. J., Van Buskirk, J., & McCollum, S. A. (1996). Simplifying the Jargon of Community Ecology : A Conceptual Approach. The American Naturalist, 147(2), 282-286. https://doi.org/10.1086/285850

Fløjgaard, C., Valdez, J. W., Dalby, L., Moeslund, J. E., Clausen, K. K., Ejrnæs, R., Pärtel, M., & Brunbjerg, A. K. (2020). Dark diversity reveals importance of biotic resources and competition for plant diversity across habitats. Ecology and Evolution, 10(12), 6078-6088. https://doi.org/10.1002/ece3.6351

Fortunel, C., Garnier, E., Joffre, R., Kazakou, E., Quested, H., Grigulis, K., Lavorel, S., Ansquer, P., Castro, H., Cruz, P., DoleŽal, J., Eriksson, O., Freitas, H., Golodets, C., Jouany, C., Kigel, J., Kleyer, M., Lehsten, V., Lepš, J., … Zarovali, M. (2009). Leaf traits capture the effects of land use changes and climate on litter decomposability of grasslands across Europe. Ecology, 90(3), 598-611. https://doi.org/10.1890/08-0418.1

Freschet, G. T., Cornelissen, J. H. C., Van Logtestijn, R. S. P., & Aerts, R. (2010). Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. Journal of Ecology, 98(2), 362-373. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01615.x

Fujinuma, J., & Pärtel, M. (2023). Decomposing dark diversity affinities of species and sites using Bayesian method : What accounts for absences of species at suitable sites? Methods in Ecology and Evolution, 14(7), 1796-1807. https://doi.org/10.1111/2041-210X.14109

Fukami, T. (2015). Historical Contingency in Community Assembly : Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 46(Volume 46, 2015), 1-23. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160340

G

Gálhidy, L., Mihók, B., Hagyó, A., Rajkai, K., & Standovár, T. (2006). Effects of gap size and associated changes in light and soil moisture on the understorey vegetation of a Hungarian beech forest. Plant Ecology, 183(1), 133-145. https://doi.org/10.1007/s11258-005-9012-4

Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., Bellmann, A., Neill, C., & Toussaint, J.-P. (2004). Plant Functional Markers Capture Ecosystem Properties During Secondary Succession. Ecology, 85(9), 2630-2637. https://doi.org/10.1890/03-0799

Garnier, E., & Navas, M.-L. (2012). A trait-based approach to comparative functional plant ecology : Concepts, methods and applications for agroecology. A review. Agronomy for Sustainable Development, 32(2), 365-399. https://doi.org/10.1007/s13593-011-0036-y

Garnier, M. E., & Navas, M. M.-L. (2013). Diversité fonctionnelle des plantes. De Boeck Supérieur.

Gauzere, J., Teuf, B., Davi, H., Chevin, L.-M., Caignard, T., Leys, B., Delzon, S., Ronce, O., & Chuine, I. (2020). Where is the optimum? Predicting the variation of selection along climatic gradients and the adaptive value of plasticity. A case study on tree phenology. Evolution Letters, 4(2), 109-123. https://doi.org/10.1002/evl3.160

Gégout, J.-C. (2006). Distribution et caractère bioindicateur des espèces végétales forestières françaises vis-à-vis du sol et du climat. Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (ENGREF).

Gégout, J.-C., Coudun, C., Bailly, G., & Jabiol, B. (2005). EcoPlant : A forest site database linking floristic data with soil and climate variables. Journal of Vegetation Science, 16(2), 257-260. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2005.tb02363.x

Gégout, J.-C., Hervé, J.-C., Houllier, F., & Pierrat, J.-C. (2003). Prediction of forest soil nutrient status using vegetation. Journal of Vegetation Science, 14(1), 55-62. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02127.x

Gégout, J.-C., Piedallu, C., Cornu, J.-F., & Cluzeau, C. (2008). La cartographie prédictive des stations forestières : Un nouvel outil au service du gestionnaire. Revue forestière française, 60(1), 37-60. https://doi.org/10.4267/2042/17240

Gelman, A. (2007). Struggles with Survey Weighting and Regression Modeling. Statistical Science, 22(2), 153-164. https://doi.org/10.1214/088342306000000691

Gilliam, F. (2007). The Ecological Significance of the Herbaceous Layer in Temperate Forest Ecosystems. Bioscience, 57. https://doi.org/10.1641/B571007

Gilliam, F., & Roberts, M. (2003). Introduction : Conceptual Framework for Studies of the Herbaceous Layer (p. 3-11). https://doi.org/10.1093/oso/9780195140880.003.0001

Gilliam, F. S., May, J. D., & Adams, M. B. (2018). Response of foliar nutrients of Rubus allegheniensis to nutrient amendments in a central Appalachian hardwood forest. Forest Ecology and Management, 411, 101-107. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.022

Gleason, H. A. (1917). The Structure and Development of the Plant Association. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 44(10), 463-481. https://doi.org/10.2307/2479596

Gleason, H. A. (1926). The Individualistic Concept of the Plant Association. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 53(1), 7-26. https://doi.org/10.2307/2479933

Grennfelt, P., Engleryd, A., Forsius, M., Hov, Ø., Rodhe, H., & Cowling, E. (2020). Acid rain and air pollution : 50 years of progress in environmental science and policy. Ambio, 49(4), 849-864. https://doi.org/10.1007/s13280-019-01244-4

Grime, J. (2001). Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties. In Biological Conservation—BIOL CONSERV (Vol. 107). https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00055-1

Grime, J. P. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems : Immediate, filter and founder effects. Journal of Ecology, 86(6), 902-910. https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.1998.00306.x

Grindon, L. H. (2023). The Manchester Flora. BoD – Books on Demand.

H

Habbasha, E., & Ibrahim, F. (2015). Calcium : Physiological Function, Deficiency and Absorption. https://www.semanticscholar.org/paper/Calcium%3A-Physiological-Function%2C-Deficiency-and-Habbasha-Ibrahim/369dc42b86f19bdaa0b0ae39d32a976b2634dc43

Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E. D., Robinson, B. S., Hodgson, D. J., & Inger, R. (2018). A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. PeerJ, 6, e4794. https://doi.org/10.7717/peerj.4794

Hedde, M., Aubert, M., Decaëns, T., & Bureau, F. (2008). Dynamics of soil carbon in a beechwood chronosequence forest. Forest Ecology and Management, 255(1), 193-202.

Heinrich, W. (2012). Über bodensaure Pfeifengraswiesen in Ostthüringen. Mauritiana, 24, 166-206.

Hendrick, R. L., & Pregitzer, K. S. (1996). Temporal and Depth-Related Patterns of Fine Root Dynamics in Northern Hardwood Forests. Journal of Ecology, 84(2), Article 2. https://doi.org/10.2307/2261352

Hernes, P. J., & Hedges, J. I. (2004). Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level1. Geochimica et Cosmochimica Acta, 68(6), 1293-1307. https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.09.015

HilleRisLambers, J., Adler, P. B., Harpole, W. S., Levine, J. M., & Mayfield, M. M. (2012). Rethinking Community Assembly through the Lens of Coexistence Theory. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 43(Volume 43, 2012), 227-248. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160411

Hinzke, T., Tanneberger, F., Aggenbach, C., Bog, M., Dahlke, S., Knorr, K.-H., Kotowski, W., Kozub, Ł., Lange, J., Li, G., Michaelis, D., Pronin, E., Schnittler, M., Seeber, E., & Kreyling, J. (2022). Response Patterns of Fen Sedges to a Nutrient Gradient Indicate both Geographic Origin-Specific Genotypic Differences and Phenotypic Plasticity. Wetlands, 42(8), 113. https://doi.org/10.1007/s13157-022-01629-4

Hishe, H., Giday, K., Fremout, T., Negussie, A., & Muys, B. (2022). Recruitment credit cannot compensate for extinction debt in a degraded dry Afromontane forest. Journal of Vegetation Science, 33(3), e13134. https://doi.org/10.1111/jvs.13134

Hubbell, S. P. (2011). The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography. Princeton University Press. https://doi.org/10.1515/9781400837526

Humboldt, A. von A. du texte, & Bonpland, A. (1773-1858) A. du texte. (1805). Essai sur la géographie des plantes : Accompagné d'un tableau physique des régions équinoxiales, fondé sur des mesures exécutées, depuis le dixième degré de latitude boréale jusqu'au dixième degré de latitude australe, pendant les années 1799, 1800, 1801, 1802 et 1803 ([Reprod.]) / par Al. de Humboldt et A. Bonpland ; préf. réd. par Al. de Humboldt. https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k977938

Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 22, 415-427. https://doi.org/10.1101/SQB.1957.022.01.039

I

Inouye, R. S., & Tilman, D. (1988). Convergence and Divergence of Old-Field Plant Communities Along Experimental Nitrogen Gradients. Ecology, 69(4), 995-1004. https://doi.org/10.2307/1941254

Iseli, E., Diaz Zeugin, N., Brioschi, C., Alexander, J., & Lenoir, J. (2025). Early detection of plant community responses to climate warming along mountain roads. Journal of Ecology, 113(9), 2575-2589. https://doi.org/10.1111/1365-2745.70114

J

Jabiol, B., Brêthes, A., Ponge, J.-F., Toutain, F., & Brun, J.-J. (2007). L'humus sous toutes ses formes. Engref. https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-00508410/

Jackson, S. T., & Sax, D. F. (2010). Balancing biodiversity in a changing environment : Extinction debt, immigration credit and species turnover. Trends in Ecology & Evolution, 25(3), 153-160. https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.001

Jonard, M., Fürst, A., Verstraeten, A., Thimonier, A., Timmermann, V., Potočić, N., Waldner, P., Benham, S., Hansen, K., Merilä, P., Ponette, Q., De La Cruz, A. C., Roskams, P., Nicolas, M., Croisé, L., Ingerslev, M., Matteucci, G., Decinti, B., Bascietto, M., & Rautio, P. (2015). Tree mineral nutrition is deteriorating in Europe. Global Change Biology, 21(1), 418-430. https://doi.org/10.1111/gcb.12657

Józwiak, M. A., & Józwiak, M. (2014). Bioindication as challenge in Modern Environmental Protection. 21(4), 577-591. https://doi.org/10.1515/eces-2014-0041

Jules, M. J., Sawyer, J. O., & Jules, E. S. (2008). Assessing the relationships between stand development and understory vegetation using a 420-year chronosequence. Forest Ecology and Management, 255(7), 2384-2393. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.12.042

K

Kazakou, E., Violle, C., Roumet, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kattge, J., & Garnier, E. (2014). Are trait-based species rankings consistent across data sets and spatial scales? Journal of Vegetation Science, 25(1), 235-247. https://doi.org/10.1111/jvs.12066

Keddy, P. A. (1992). A Pragmatic Approach to Functional Ecology. Functional Ecology, 6(6), 621-626. https://doi.org/10.2307/2389954

Keith, S. A., Newton, A. C., Morecroft, M. D., Bealey, C. E., & Bullock, J. M. (2009). Taxonomic homogenization of woodland plant communities over 70 years. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276(1672), 3539-3544. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0938

Kéry, M., & Schmidt, B. (2008). Imperfect detection and its consequences for monitoring for conservation. https://doi.org/10.1556/comec.9.2008.2.10

Kimberley, A., Blackburn, G. A., Whyatt, J. D., Kirby, K., & Smart, S. M. (2013). Identifying the trait syndromes of conservation indicator species : How distinct are British ancient woodland indicator plants from other woodland species? Applied Vegetation Science, 16(4), 667-675. https://doi.org/10.1111/avsc.12047

Knoepp, J. D., & Swank, W. T. (1994). Long-Term Soil Chemistry Changes in Aggrading Forest Ecosystems. Soil Science Society of America Journal, 58(2), 325-331. https://doi.org/10.2136/sssaj1994.03615995005800020010x

Kolkwitz et Marsson. (1902). Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. - Mitteilungen der königlichen Prüfanstalt für Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung. 1: 33-72 (Berlin-Dahlem).

Kraft, N. J. B., Valencia, R., & Ackerly, D. D. (2008). Functional traits and niche-based tree community assembly in an Amazonian forest. Science (New York, N.Y.), 322(5901), 580-582. https://doi.org/10.1126/science.1160662

Krüger, I., Sanders, T. G., Potočić, N., Ukonmaanaho, L., & Rautio, P. (2020). Increased evidence of nutrient imbalances in forest trees across Europe. https://jukuri.luke.fi/bitstreams/cc82410d-5236-4a1d-9a19-8f9562fa0e75/download

L

Laliberté, E. (2017). Below-ground frontiers in trait-based plant ecology. New Phytologist, 213(4), 1597-1603. https://doi.org/10.1111/nph.14247

Langlois, E. (2017). Rôle des interactions plantes-milieu dans la structuration spatiale et temporelle des communautés végétales herbacées.

Lavorel, S., & Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits : Revisiting the Holy Grail. Functional Ecology, 16(5), 545-556. https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x

Lavorel, S., & Grigulis, K. (2012). How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. Journal of Ecology, 100(1), 128-140. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01914.x

Lenoir, J., Graae, B. J., Aarrestad, P. A., Alsos, I. G., Armbruster, W. S., Austrheim, G., Bergendorff, C., Birks, H. J. B., Bråthen, K. A., Brunet, J., Bruun, H. H., Dahlberg, C. J., Decocq, G., Diekmann, M., Dynesius, M., Ejrnæs, R., Grytnes, J., Hylander, K., Klanderud, K., … Svenning, J. (2013). Local temperatures inferred from plant communities suggest strong spatial buffering of climate warming across N orthern E urope. Global Change Biology, 19(5), 1470-1481. https://doi.org/10.1111/gcb.12129

Lewis, R. J., De Bello, F., Bennett, J. A., Fibich, P., Finerty, G. E., Götzenberger, L., Hiiesalu, I., Kasari, L., Lepš, J., Májeková, M., Mudrák, O., Riibak, K., Ronk, A., Rychtecká, T., Vitová, A., & Pärtel, M. (2017). Applying the dark diversity concept to nature conservation : Dark Diversity and Nature Conservation. Conservation Biology, 31(1), 40-47. https://doi.org/10.1111/cobi.12723

Lewis, R. J., Szava-Kovats, R., & Pärtel, M. (2016). Estimating dark diversity and species pools : An empirical assessment of two methods. Methods in Ecology and Evolution, 7(1), 104-113. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12443

Lindenmayer, D. B., Lavery, T., & Scheele, B. C. (2022). Why We Need to Invest in Large-Scale, Long-Term Monitoring Programs in Landscape Ecology and Conservation Biology. Current Landscape Ecology Reports, 7(4), Article 4. https://doi.org/10.1007/s40823-022-00079-2

Linné, C. von (1707-1778) A. du texte. (1751). Philosophie botanique de Charles Linné ,... Dans laquelle sont expliqués les fondements de la botanique, avec les définitions de ses parties, les exemples des termes, des observations sur les plus rares. Enrichie de figures. Traduite du latin par Fr.-A. Quesné. https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6565416v

Liu, W., Fan, R., Yang, S., Chen, S., Huang, Y., & Ji, W. (2024). Carex parva and Carex scabrirostris adopt diverse response strategies to adapt to low-light conditions. Frontiers in Plant Science, 15. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1432539

Lopez-Cantarero, I., Lorente, F. A., & Romero, L. (1994). Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels? 1. Journal of Plant Nutrition, 17(6), 979-990. https://doi.org/10.1080/01904169409364782

Lortie, C. J., Brooker, R. W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F. I., & Callaway, R. M. (2004). Rethinking plant community theory. Oikos, 107(2), 433. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13250.x

M

française, 95-103.

MacDonald, J. A., Dise, N. B., Matzner, E., Armbruster, M., Gundersen, P., & Forsius, M. (2002). Nitrogen input together with ecosystem nitrogen enrichment predict nitrate leaching from European forests. Global Change Biology, 8(10), Article 10. https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00532.x

Mahieu, S., Novak, S., Barre, P., Delagarde, R., Niderkorn, V., Gastal, F., & Emile, J.-C. (2021). Diversity in the chemical composition and digestibility of leaves from fifty woody species in temperate areas. Agroforestry Systems, 95(7), 1295-1308. https://doi.org/10.1007/s10457-021-00662-2

Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (2003). Bioindicators and Biomonitors. Elsevier.

Maycock, P. F. (1967). JOZEF PACZOSKI : Founder of the Science of Phytosociology. Ecology, 48(6), 1031-1034. https://doi.org/10.2307/1934560

McGovern, S., Evans, C. D., Dennis, P., Walmsley, C., & McDonald, M. A. (2011). Identifying drivers of species compositional change in a semi-natural upland grassland over a 40-year period. Journal of Vegetation Science, 22(2), Article 2.

Miličić, M., Popov, S., Vujić, A., Ivošević, B., & Cardoso, P. (2020). Come to the dark side ! The role of functional traits in shaping dark diversity patterns of south-eastern European hoverflies. Ecological Entomology, 45(2), 232-242. https://doi.org/10.1111/een.12788

Moeslund, J. E., Brunbjerg, A. K., Clausen, K. K., Dalby, L., Fløjgaard, C., Juel, A., & Lenoir, J. (2017). Using dark diversity and plant characteristics to guide conservation and restoration. Journal of Applied Ecology, 54(6), 1730-1741. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12867

Mohanbabu, N., Veldhuis, M. P., Jung, D., & Ritchie, M. E. (2023). Integrating defense and leaf economic spectrum traits in a tropical savanna plant. Frontiers in Plant Science, 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1185616

Molles, M. (2010). By Manuel Molles : Ecology: Concepts and Applications Fifth (5th) Edition.

Morel, L., Jung, V., Chollet, S., Ysnel, F., & Barbe, L. (2022). From taxonomic to functional dark diversity : Exploring the causes of potential biodiversity and its implications for conservation. Journal of Applied Ecology, 59(1), 103-116. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14033

Müller, P. (1980). Biogeographie. Stuttgart, Engen Ulmer et Uni-Taschenbucher, vol. 731, 1980. https://www.persee.fr/doc/revec_0249-7395_1980_num_34_4_6472_t1_0663_0000_3

N

Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2013). A general and simple method for obtaining R2 from generalized linear mixed-effects models. Methods in Ecology and Evolution, 4(2), 133-142. https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x

Nicolas, M., Jolivet, C., Jonard, M. (2014). How monitoring networks contribute to the understanding and to the management of soil and forest ecosystems? Revue forestière française, 95-103.

Niinemets, Ü. (2015). Is there a species spectrum within the world-wide leaf economics spectrum? Major variations in leaf functional traits in the Mediterranean sclerophyll Quercus ilex. New Phytologist, 205(1), 79-96. https://doi.org/10.1111/nph.13001

O

Ordoñez, J. C., Van Bodegom, P. M., Witte, J.-P. M., Wright, I. J., Reich, P. B., & Aerts, R. (2009). A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. Global Ecology and Biogeography, 18(2), 137-149. https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2008.00441.x

P

Pärtel, M. (2002). Local Plant Diversity Patterns and Evolutionary History at the Regional Scale. Ecology, 83(9), 2361-2366. https://doi.org/10.2307/3071796

Pärtel, M. (2014). Community ecology of absent species : Hidden and dark diversity. Journal of Vegetation Science, 25(5), 1154-1159. https://doi.org/10.1111/jvs.12169

Pärtel, M., Szava-Kovats, R., & Zobel, M. (2011). Dark diversity : Shedding light on absent species. Trends in Ecology & Evolution, 26(3), 124-128. https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.12.004

Pärtel, M., Tamme, R., Carmona, C. P., Riibak, K., Moora, M., Bennett, J. A., Chiarucci, A., Chytrý, M., de Bello, F., Eriksson, O., Harrison, S., Lewis, R. J., Moles, A. T., Öpik, M., Price, J. N., Amputu, V., Askarizadeh, D., Atashgahi, Z., Aubin, I., … Zobel, M. (2025). Global impoverishment of natural vegetation revealed by dark diversity. Nature, 641(8064), 917-924. https://doi.org/10.1038/s41586-025-08814-5

Peppler-Lisbach, C., & Kleyer, M. (2009). Patterns of species richness and turnover along the pH gradient in deciduous forests : Testing the continuum hypothesis. Journal of Vegetation Science, 20(6), 984-995. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2009.01092.x

Pereira-Moura, L., Viana, C. G., Juen, L., & Couceiro, S. R. M. (2024). Dark diversity of Odonata in Amazonian streams. Science of The Total Environment, 954, 176556. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176556

Pérez-Ramos, I. M., Roumet, C., Cruz, P., Blanchard, A., Autran, P., & Garnier, E. (2012). Evidence for a 'plant community economics spectrum' driven by nutrient and water limitations in a Mediterranean rangeland of southern France. Journal of Ecology, 100(6), 1315-1327. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12000

Pescador, D. S., Bello, F. de, Valladares, F., & Escudero, A. (2015). Plant Trait Variation along an Altitudinal Gradient in Mediterranean High Mountain Grasslands : Controlling the Species Turnover Effect. PLOS ONE, 10(3), e0118876. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118876

Philippe Julve. (1998). Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Institut Catholique de Lille, Lille.

Pickett, S. T. A., Pickett, S. T., & White, P. S. (1985). The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics. Academic Press.

Pierce, S., Negreiros, D., Cerabolini, B. E. L., Kattge, J., Díaz, S., Kleyer, M., Shipley, B., Wright, S. J., Soudzilovskaia, N. A., Onipchenko, V. G., van Bodegom, P. M., Frenette-Dussault, C., Weiher, E., Pinho, B. X., Cornelissen, J. H. C., Grime, J. P., Thompson, K., Hunt, R., Wilson, P. J., … Tampucci, D. (2017). A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes world-wide. Functional Ecology, 31(2), 444-457. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12722

Piggot, C. D. (1980). [Review of Plant Strategies and Vegetation Processes., par J. P. Grime]. Journal of Ecology, 68(2), 704-706. https://doi.org/10.2307/2259438

Pihl Karlsson, G., Akselsson, C., Hellsten, S., & Karlsson, P. E. (2024). Atmospheric deposition and soil water chemistry in Swedish forests since 1985 – Effects of reduced emissions of sulphur and nitrogen. Science of The Total Environment, 913, 169734. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169734

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S. S., & Sarkar, D. (2013). Nlme : Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 31-110, 3, 1-113.

R

Reich, P. B. (2014). The world-wide 'fast–slow' plant economics spectrum : A traits manifesto. Journal of Ecology, 102(2), 275-301. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12211

Reich, P. B., Walters, M. B., & Ellsworth, D. S. (1997). From tropics to tundra : Global convergence in plant functioning. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(25), 13730-13734. https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13730

Reich, P. B., Wright, I. J., Cavender-Bares, J., Craine, J. M., Oleksyn, J., Westoby, M., & Walters, M. B. (2003). The Evolution of Plant Functional Variation : Traits, Spectra, and Strategies. International Journal of Plant Sciences, 164(S3), S143-S164. https://doi.org/10.1086/374368

Richard, B., Dupouey, J.-L., Corcket, E., Alard, D., Archaux, F., Aubert, M., Boulanger, V., Gillet, F., Langlois, E., Macé, S., Montpied, P., Beaufils, T., Begeot, C., Behr, P., Boissier, J.-M., Camaret, S., Chevalier, R., Decocq, G., Dumas, Y., … Lenoir, J. (2021). The climatic

debt is growing in the understorey of temperate forests : Stand characteristics matter. Global Ecology and Biogeography, 30(7), 1474-1487. https://doi.org/10.1111/geb.13312

Riofrio-Dillon, G. (2013). Evolution of the acidity and nitrogen availability in French forest soils over the 20th century : A spatiotemporal and multiscale approach based on the bioindicator character of plants. Evolution of the acidity and nitrogen availability in French forest soils over the 20th century: a spatiotemporal and multiscale approach based on the bioindicator character of plants (2013). https://agris.fao.org/search/en/providers/122652/records/64776101bc45d9ecdbc3186c

Riofrío-Dillon, G., Bertrand, R., & Gégout, J.-C. (2012). Toward a recovery time : Forest herbs insight related to anthropogenic acidification. Global Change Biology, 18(11), 3383-3394. https://doi.org/10.1111/gcb.12002

Ronk, A., de Bello, F., Fibich, P., & Pärtel, M. (2016). Large-scale dark diversity estimates : New perspectives with combined methods. Ecology and Evolution, 6(17), 6266-6281. https://doi.org/10.1002/ece3.2371

S

Saenger, A., André, F., Jonard, M., Nicolas, M., & Ponette, Q. (2024). Carbon sequestration and nitrogen loss drive the evolution of French forest soils. Frontiers in Forests and Global Change, 7. https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1338239

Sanczuk, P., Verheyen, K., Lenoir, J., Zellweger, F., Lembrechts, J. J., Rodríguez-Sánchez, F., Baeten, L., Bernhardt-Römermann, M., De Pauw, K., Vangansbeke, P., Perring, M. P., Berki, I., Bjorkman, A. D., Brunet, J., Chudomelová, M., De Lombaerde, E., Decocq, G., Dirnböck, T., Durak, T., … De Frenne, P. (2024). Unexpected westward range shifts in European forest plants link to nitrogen deposition. Science, 386(6718), 193-198. https://doi.org/10.1126/science.ado0878

Schaffers, A. P., & Sýkora, K. V. (2000). Reliability of Ellenberg indicator values for moisture, nitrogen and soil reaction : A comparison with field measurements. Journal of Vegetation Science, 11(2), 225-244. https://doi.org/10.2307/3236802

Schielzeth, H. (2010). Simple means to improve the interpretability of regression coefficients. Methods in Ecology and Evolution, 1(2), 103-113. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x

Šebesta, J., Samonil, P., Lacina, J., Oulehle, F., Houška, J., & Buček, A. (2011). Acidification of primeval forests in the Ukraine Carpathians : Vegetation and soil changes over six decades. Forest Ecology and Management, 262, 1265-1279. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.06.024

Shipley, B., Lechowicz, M. J., Wright, I., & Reich, P. B. (2006). Fundamental Trade-Offs Generating the Worldwide Leaf Economics Spectrum. Ecology, 87(3), 535-541. https://doi.org/10.1890/05-1051

Smart, S. M., & Scott, W. A. (2004). Bias in Ellenberg indicator values—Problems with detection of the effect of vegetation type. Journal of Vegetation Science, 15(6), 843-846. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2004.tb02327.x

Soest, P. J. V., & Wine, R. H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 50(1), 50-55. https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50

Steubing, L., & Jäger, H. J. (1982). Monitoring of Air Pollutants by Plants : Methods & Problems. Springer.

T

Talbot, J. M., & Treseder, K. K. (2012). Interactions among lignin, cellulose, and nitrogen drive litter chemistry-decay relationships. Ecology, 93(2), 345-354. https://doi.org/10.1890/11-0843.1

Talkner, U., Meiwes, K. J., Potočić, N., Seletković, I., Cools, N., De Vos, B., & Rautio, P. (2015). Phosphorus nutrition of beech (Fagus sylvatica L.) is decreasing in Europe. Annals of Forest Science, 72(7), 919-928. https://doi.org/10.1007/s13595-015-0459-8

Talluto, L., Boulangeat, I., Vissault, S., Thuiller, W., & Gravel, D. (2017). Extinction debt and colonization credit delay range shifts of eastern North American trees. Nature Ecology & Evolution, 1(7), 0182. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0182

Taylor, K. (2005). Biological Flora of the British Isles : Rubus vestitus Weihe. Journal of Ecology, 93(6), 1249-1262. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.01076.x

ter Braak, C. J. F., & Looman, C. W. N. (1986). Weighted averaging, logistic regression and the Gaussian response model. Vegetatio, 65(1), 3-11. https://doi.org/10.1007/BF00032121

ter Braak, C. J. F., & van Dame, H. (1989). Inferring pH from diatoms : A comparison of old and new calibration methods. Hydrobiologia, 178(3), 209-223. https://doi.org/10.1007/BF00006028

Thimonier, A., Dupouey, J. L., Bost, F., & Becker, M. (1994). Simultaneous eutrophication and acidification of a forest ecosystem in North-East France. The New Phytologist, 126(3), Article 3. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04252.x

Tillesse, M. de, & Devillez, F. (1995). Modélisation du niveau trophique des sols forestiers : Évaluation du pH en fonction des groupements phytosociologiques. Annales des Sciences Forestières, 52(4), 353-364. https://doi.org/10.1051/forest:19950405

Tilman, D., May, R. M., Lehman, C. L., & Nowak, M. A. (1994). Habitat destruction and the extinction debt. Nature, 371(6492), 65-66. https://doi.org/10.1038/371065a0

Tong, R., Ji, B., Wang, G. G., Lou, C., Ma, C., Zhu, N., Yuan, W., & Wu, T. (2024). Canopy gap impacts on soil organic carbon and nutrient dynamic : A meta-analysis. Annals of Forest Science, 81(1), 12. https://doi.org/10.1186/s13595-024-01224-z

Trap, J., Bureau, F., Vinceslas-Akpa, M., Chevalier, R., & Aubert, M. (2009). Changes in soil N mineralization and nitrification pathways along a mixed forest chronosequence. Forest Ecology and Management, 258(7), 1284-1292.

Trindade, D. P. F., Carmona, C. P., & Pärtel, M. (2020). Temporal lags in observed and dark diversity in the Anthropocene. Global Change Biology, 26(6), 3193-3201. https://doi.org/10.1111/gcb.15093

Trindade, D. P. F., Carmona, C. P., Reitalu, T., & Pärtel, M. (2023). Observed and dark diversity dynamics over millennial time scales : Fast life-history traits linked to expansion lags of plants in northern Europe. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 290(1990), 20221904. https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1904

Trindade, D. P. F., Pärtel, M., Carmona, C. P., Randlane, T., & Nascimbene, J. (2021). Integrating dark diversity and functional traits to enhance nature conservation of epiphytic lichens : A case study from Northern Italy. Biodiversity and Conservation, 30(8), 2565-2579. https://doi.org/10.1007/s10531-021-02211-w

Tutin, T. G. (1968). Flora Europaea. Cambridge University Press.

U

Ulrich, B., Mayer, R., & Khanna, P. K. (1980). Chemical changes due to acid precipitation in a loess-derived soil in central Europe. Soil Sci.; (United States), 130:4. https://doi.org/10.1097/00010694-198010000-00005

Ulrich, E. (1995). Le réseau renecofor : Objectifs et réalisation. Revue forestière française, 47(2), Article 2. https://doi.org/10.4267/2042/26634

V

Valladares, F., Laanisto, L., Niinemets, Ü., & Zavala, M. A. (2016). Shedding light on shade : Ecological perspectives of understorey plant life. Plant Ecology & Diversity, 9(3), 237-251. https://doi.org/10.1080/17550874.2016.1210262

Van Calster, H., Baeten, L., De Schrijver, A., De Keersmaeker, L., Rogister, J. E., Verheyen, K., & Hermy, M. (2007). Management driven changes (1967-2005) in soil acidity and the understorey plant community following conversion of a coppice-with-standards forest. FOREST ECOLOGY AND MANAGEMENT, 241(1-3), Article 1-3. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.01.007

Van Sundert, K., Radujković, D., Cools, N., De Vos, B., Etzold, S., Fernández-Martínez, M., Janssens, I. A., Merilä, P., Peñuelas, J., Sardans, J., Stendahl, J., Terrer, C., & Vicca, S. (2020). Towards comparable assessment of the soil nutrient status across scales—Review and development of nutrient metrics. Global Change Biology, 26(2), 392-409. https://doi.org/10.1111/gcb.14802

Verberk, W. C. E. P., van Noordwijk, C. G. E., & Hildrew, A. G. (2013). Delivering on a promise : Integrating species traits to transform descriptive community ecology into a predictive science. Freshwater Science, 32(2), 531-547. https://doi.org/10.1899/12-092.1

Verstraeten, G., Baeten, L., De Frenne, P., Vanhellemont, M., Thomaes, A., Boonen, W., Muys, B., & Verheyen, K. (2013). Understorey vegetation shifts following the conversion of temperate deciduous forest to spruce plantation. Forest Ecology and Management, 289, 363-370. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.049

Violle, C., Enquist, B. J., McGill, B. J., Jiang, L., Albert, C. H., Hulshof, C., Jung, V., & Messier, J. (2012). The return of the variance : Intraspecific variability in community ecology. Trends in Ecology & Evolution, 27(4), 244-252. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.014

Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! Oikos, 116(5), 882-892. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x

W

Walker, L. R., & del Moral, R. (2003). Primary Succession and Ecosystem Rehabilitation. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511615078

Wamelink, G. w. w., Joosten, V., van Dobben, H. f., & Berendse, F. (2002). Validity of Ellenberg indicator values judged from physico-chemical field measurements. Journal of Vegetation Science, 13(2), 269-278. https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2002.tb02047.x

Wang, Y.-R., Buchmann, N., Hessen, D. O., Stordal, F., Erisman, J. W., Vollsnes, A. V., Andersen, T., & Dolman, H. (2022). Disentangling effects of natural and anthropogenic drivers on forest net ecosystem production. Science of The Total Environment, 839, 156326. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156326

Weigelt, A., Mommer, L., Andraczek, K., Iversen, C. M., Bergmann, J., Bruelheide, H., Fan, Y., Freschet, G. T., Guerrero-Ramírez, N. R., Kattge, J., Kuyper, T. W., Laughlin, D. C., Meier, I. C., van der Plas, F., Poorter, H., Roumet, C., van Ruijven, J., Sabatini, F. M., Semchenko, M., … McCormack, M. L. (2021). An integrated framework of plant form and function : The belowground perspective. New Phytologist, 232(1), 42-59. https://doi.org/10.1111/nph.17590

Wernsdörfer, H., Colin, A., Bontemps, J.-D., Chevalier, H., Pignard, G., Caurla, S., Leban, J.-M., Hervé, J.-C., & Fournier, M. (2012). Large-scale dynamics of a heterogeneous forest resource are driven jointly by geographically varying growth conditions, tree species composition and stand structure. Annals of Forest Science, 69(7), 829-844. https://doi.org/10.1007/s13595-012-0196-1

Westoby, M., & Wright, I. J. (2006). Land-plant ecology on the basis of functional traits. Trends in Ecology & Evolution, 21(5), 261-268. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.02.004

Whittaker, R. H. (1953). A Consideration of Climax Theory : The Climax as a Population and Pattern. Ecological Monographs, 23(1), 41-78. https://doi.org/10.2307/1943519

Wickham, H. (2016). Ggplot2. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4

Wickham, H., & François, R. (2014). dplyr : A Grammar of Data Manipulation.

Więcław, H., Bosiacka, B., Hrivnák, R., Dajdok, Z., Mesterházy, A., & Koopman, J. (2022). Morphological variability of Carex buekii (Cyperaceae) as a function of soil conditions : A case study of the Central European populations. Scientific Reports, 12(1), 11761. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15894-0

Wilkomirski, B. (2013). HISTORY OF BIOINDICATION.

Wittig, R. (1992). Changes in the spectrum of species in forest communities as indicators of increased acidity and nitrogen levels; Veraenderungen im Artenspektrum von Waldgesellschaften als Indikatoren erhoehter Saeure- und Stickstoffeintraege. https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/30199

Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J. H. C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P. K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B. B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., … Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. Nature, 428(6985), 821-827. https://doi.org/10.1038/nature02403

Z

Zarcinas, B. A., Cartwright, B., & Spouncer, L. R. (1986). Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. Commun. Soil Sci. Plant Anal.; (United States), 18:1. https://doi.org/10.1080/00103628709367806

Zelený, D. (2018). Which results of the standard test for community-weighted mean approach are too optimistic? Journal of Vegetation Science, 29(6), 953-966. https://doi.org/10.1111/jvs.12688

Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., & Zhou, G. (2008). Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems : Global patterns and controlling factors. Journal of Plant Ecology, 1(2), 85-93. https://doi.org/10.1093/jpe/rtn002

Zhou, X., Dong, L., Zhang, Y., Li, J., Ren, Z., & Niu, K. (2024). Trait-dependent importance of intraspecific variation relative to species turnover in determining community functional composition following nutrient enrichment. Oecologia, 205(1), 107-119. https://doi.org/10.1007/s00442-024-05555-6

Zobel, M. (1997). The relative of species pools in determining plant species richness : An alternative explanation of species coexistence? Trends in Ecology & Evolution, 12(7), 266-269. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01096-3

Zobel, M. (2016). The species pool concept as a framework for studying patterns of plant diversity. Journal of Vegetation Science, 27(1), 8-18. https://doi.org/10.1111/jvs.12333

Zolotova, E., Ivanova, N., & Ivanova, S. (2023). Global Overview of Modern Research Based on Ellenberg Indicator Values. Diversity, 15(1), 14. https://doi.org/10.3390/d15010014

Annexes

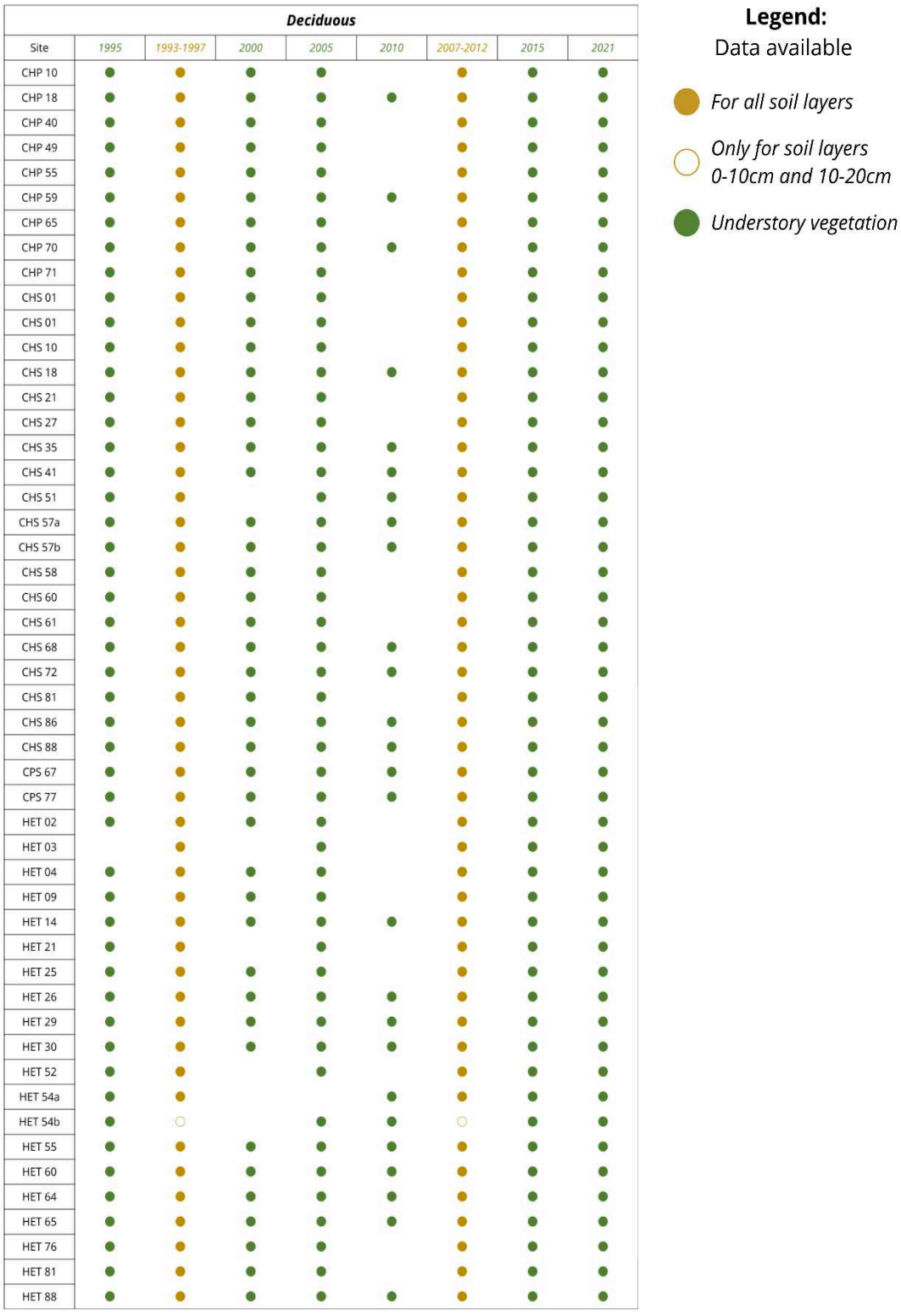


FIGURE S1A. Temporal coverage and completeness of repeated soil and vegetation surveys (Deciduous stand).

Temporal coverage and completeness of repeated soil and vegetation surveys. Brown filled circles indicate sites with complete soil data for all three soil layers (0–10, 10–20, and 20–40 cm). Brown open circles represent sites missing data only for the 20–40 cm layer. Green filled circles correspond to sites where understory species are present, i.e., species recorded in the herbaceous layer and/or the low shrub layer. Empty spaces indicate absence of data either for vegetation or soil parameters. Notably, in 2000 and 2010, storms and budget cuts prevented data collection at some sites.

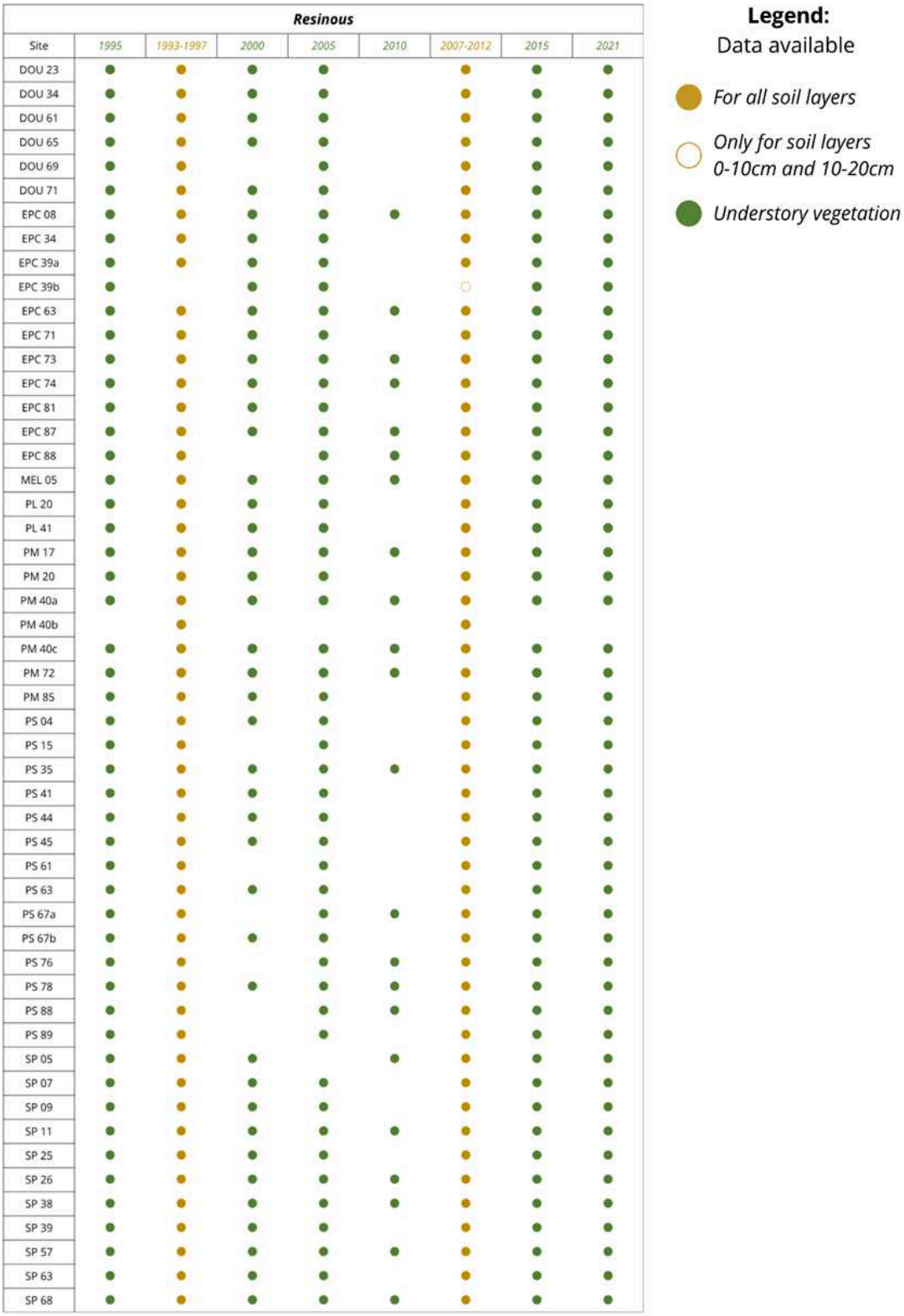


FIGURE S1B. Temporal coverage and completeness of repeated soil and vegetation surveys (Resinous stand).

Temporal coverage and completeness of repeated soil and vegetation surveys. Brown filled circles indicate sites with complete soil data for all three soil layers (0–10, 10–20, and 20–40 cm). Brown open circles represent sites missing data only for the 20–40 cm layer. Green filled circles correspond to sites where understory species are present, i.e., species recorded in the herbaceous layer and/or the low shrub layer. Empty spaces indicate absence of data either for vegetation or soil parameters. Notably, in 2000 and 2010, storms and budget cuts prevented data collection at some sites.

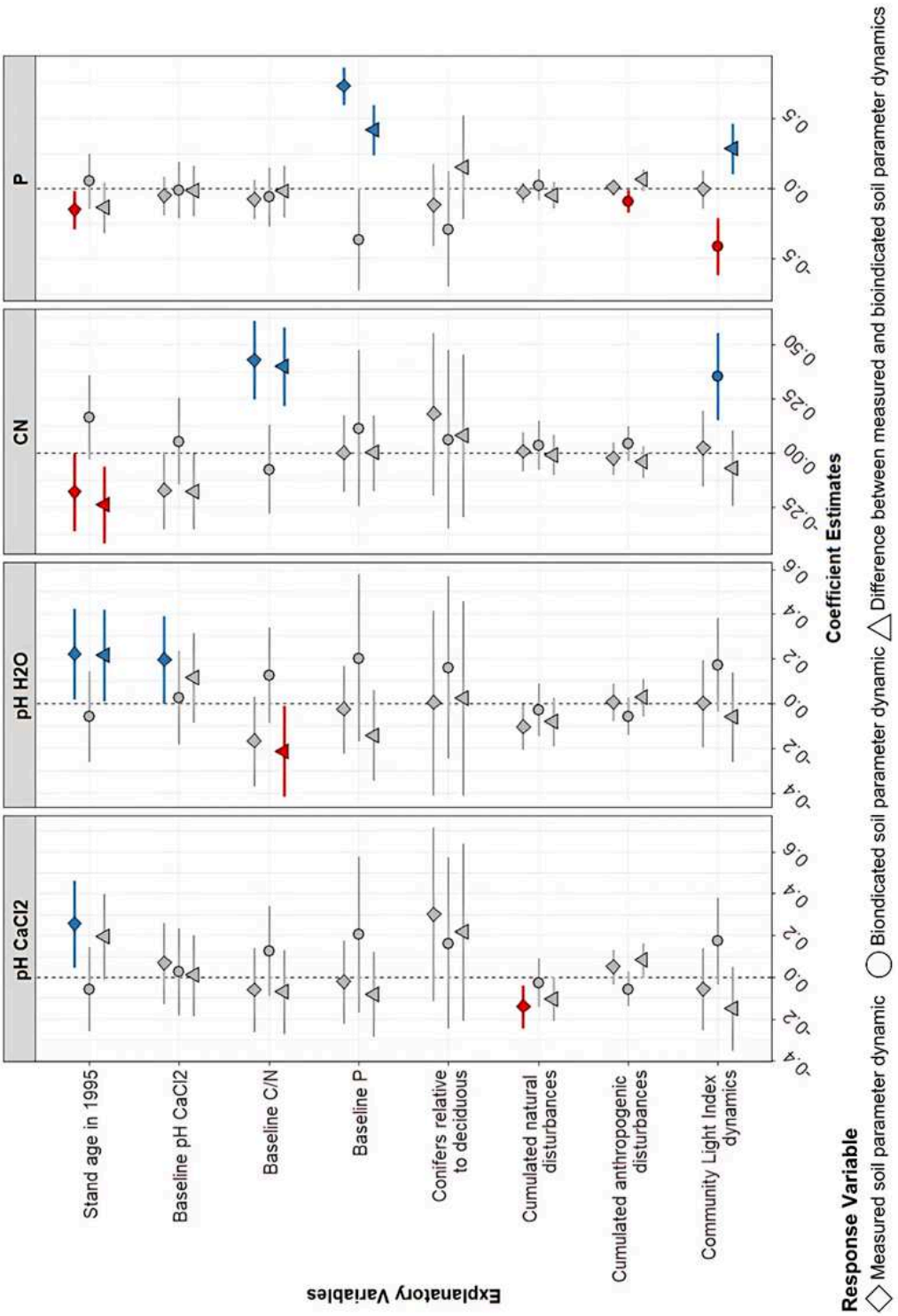


FIGURE S2. Coefficient estimates (± SD) from mixed-effects models assessing the effects of stand age, soil properties, tree type, disturbances, and canopy variation on measured and indicated soil parameter dynamics, and their differences (Soil layer 10-20cm).

Coefficient estimates and 95% confidence intervals extracted from linear mixed-effects models assessing the influence of various explanatory variables on soil parameter dynamics, both measured and bioindicated, as well as their differences. Shapes of the points correspond to the response variables in the models: diamonds represent measured soil parameter dynamics, circles indicate soil parameter dynamics derived from plant indicators (bioindicated dynamics), and triangles show the differences between measured and indicated dynamics. Explanatory variables are listed vertically and include: stand age in 1995; measured values in 1995 for pH $CaCl_2$, pH H_2O, C/N ratio, and soil phosphorus concentration; cumulative number of anthropogenic and natural disturbances from 1995 to 2021; and the dynamics of the CLI index. Points are colored based on the significance and direction of their effects: blue for significant positive effects, red for significant negative effects, and gray for non-significant effects.

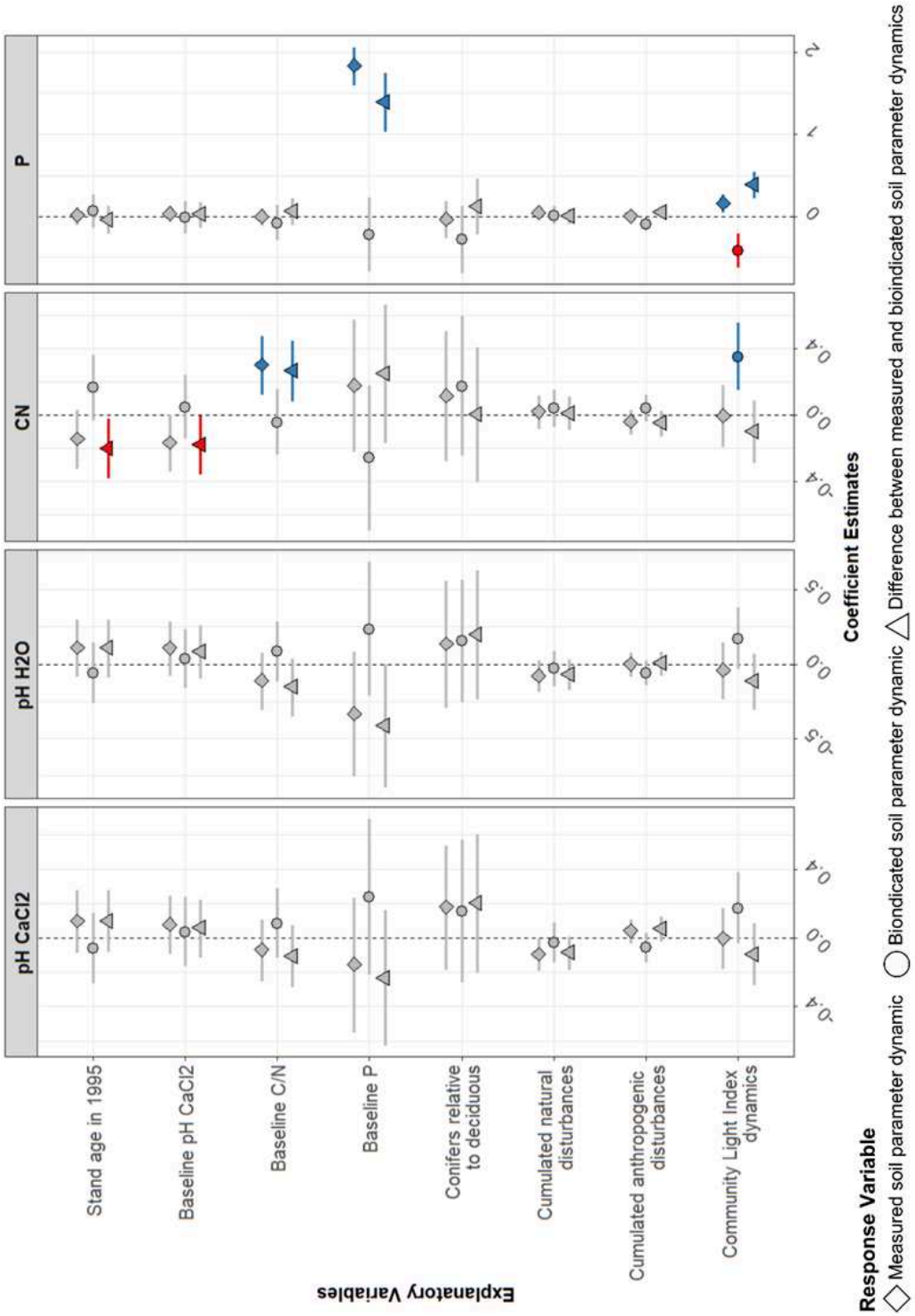


FIGURE S3. Coefficient estimates (± SD) from mixed-effects models assessing the effects of stand age, soil properties, tree type, disturbances, and canopy variation on measured and indicated soil parameter dynamics, and their differences (Soil layer 20-40cm).

Coefficient estimates and 95% confidence intervals extracted from linear mixed-effects models assessing the influence of various explanatory variables on soil parameter dynamics, both measured and bioindicated, as well as their differences. Shapes of the points correspond to the response variables in the models: diamonds represent measured soil parameter dynamics, circles indicate soil parameter dynamics derived from plant indicators (bioindicated dynamics), and triangles show the differences between measured and indicated dynamics. Explanatory variables are listed vertically and include: stand age in 1995; measured values in 1995 for pH $CaCl_2$, pH H_2O, C/N ratio, and soil phosphorus concentration; cumulative number of anthropogenic and natural disturbances from 1995 to 2021; and the dynamics of the CLI index. Points are colored based on the significance and direction of their effects: blue for significant positive effects, red for significant negative effects, and gray for non-significant effects.

TABLE S1.A Informations on sites characteristics (Decideous stand).

Site characteristics of RENECOFOR plots, including plot names, geographic coordinates (Lambert X and Y), altitude, and dominant tree species in the stands.

Site name	Lambert X (m)	Lambert Y (m)	Altitude (m)	Type of tree species	Tree species
CHP 10	745867	2373727	115	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 18	618014	2202832	175	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 40	343558	1864527	20	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 49	421400	2275500	57	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 55	850895	2452496	220	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 59	701400	2575900	149	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 65	406600	1802900	370	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 70	889781	2326133	240	Deciduous	Pedunculate oak
CHP 71	821097	2222910	190	Deciduous	Pedunculate oak
CHS 01	823999	2134129	260	Deciduous	Sessile oak
CHS 03	629785	2185285	260	Deciduous	Sessile oak
CHS 10	757648	2368639	160	Deciduous	Sessile oak
CHS 18	583990	2250441	176	Deciduous	Sessile oak
CHS 21	807880	2234930	220	Deciduous	Sessile oak
CHS 27	539320	2485580	175	Deciduous	Sessile oak
CHS 35	312100	2360200	80	Deciduous	Sessile oak
CHS 41	518900	2286000	127	Deciduous	Sessile oak
CHS 51	791868	2451427	180	Deciduous	Sessile oak
CHS 57a	904173	2438309	315	Deciduous	Sessile oak
CHS 57b	974818	2458601	320	Deciduous	Sessile oak
CHS 58	700700	2219700	270	Deciduous	Sessile oak
CHS 60	597130	2488517	55	Deciduous	Sessile oak
CHS 61	477500	2392800	220	Deciduous	Sessile oak
CHS 68	984799	2311840	256	Deciduous	Sessile oak
CHS 72	453355	2312513	170	Deciduous	Sessile oak
CHS 81	552800	1893900	300	Deciduous	Sessile oak
CHS 86	458926	2182367	116	Deciduous	Sessile oak
CHS 88	876100	2342800	330	Deciduous	Sessile oak
CPS 67	994557	2457045	350	Deciduous	Sessile or pedunculate oak
CPS 77	628115	2383949	80	Deciduous	Sessile or pedunculate oak
HET 02	657550	2467740	145	Deciduous	Beech
HET 03	651089	2132675	590	Deciduous	Beech
HET 04	877145	1909452	1300	Deciduous	Beech
HET 09	513601	1770313	1250	Deciduous	Beech
HET 14	367000	2469600	90	Deciduous	Beech
HET 21	788490	2315690	400	Deciduous	Beech
HET 25	898500	2251000	570	Deciduous	Beech
HET 26	833600	1995100	1320	Deciduous	Beech
HET 29	160100	2331700	50	Deciduous	Beech
HET 30	696563	1902135	1400	Deciduous	Beech
HET 52	804910	2314157	440	Deciduous	Beech
HET 54a	922750	2398997	325	Deciduous	Beech
HET 54b	874824	2412020	390	Deciduous	Beech
HET 55	794600	2466900	250	Deciduous	Beech
HET 60	639200	2480800	138	Deciduous	Beech
HET 64	355847	1798728	400	Deciduous	Beech
HET 65	444725	1782190	850	Deciduous	Beech
HET 76	527000	2524200	210	Deciduous	Beech
HET 81	587046	1823103	700	Deciduous	Beech
HET 88	890960	2352380	400	Deciduous	Beech

TABLE S1.B Informations on sites characteristics (Resinous stand).

Site characteristics of RENECOFOR plots, including plot names, geographic coordinates (Lambert X and Y), altitude, and dominant tree species in the stands

Site name	Lambert X (m)	Lambert Y (m)	Altitude (m)	Type of tree species	Tree species
DOU 23	560518	2129255	610	Resinous	Douglas fir
DOU 34	630548	1827102	700	Resinous	Douglas fir
DOU 61	422400	2400000	375	Resinous	Douglas fir
DOU 65	400560	1791590	420	Resinous	Douglas fir
DOU 69	765837	2107371	520	Resinous	Douglas fir
DOU 71	732738	2233951	650	Resinous	Douglas fir
EPC 08	777710	2552950	480	Resinous	Norway spruce
EPC 34	647055	1848460	1020	Resinous	Norway spruce
EPC 39a	871140	2181590	970	Resinous	Norway spruce
EPC 39b	885681	2175220	1210	Resinous	Norway spruce
EPC 63	648900	2083970	950	Resinous	Norway spruce
EPC 71	735400	2224700	600	Resinous	Norway spruce
EPC 73	947300	2074900	1700	Resinous	Norway spruce
EPC 74	909300	2144300	1200	Resinous	Norway spruce
EPC 81	607816	1826563	820	Resinous	Norway spruce
EPC 87	559565	2088980	650	Resinous	Norway spruce
EPC 88	953950	2370110	660	Resinous	Norway spruce
MEL 05	934800	1976000	1850	Resinous	European larch
PL 20	1137544	1717461	1100	Resinous	Corsican pine.
PL 41	582097	2295550	140	Resinous	Corsican pine.
PM 17	320400	2115500	15	Resinous	Maritime pine
PM 20	1172831	1663724	850	Resinous	Maritime pine
PM 40a	303615	1889201	27	Resinous	Maritime pine
PM 40b	421400	1903000	110	Resinous	Maritime pine
PM 40c	412280	1896515	150	Resinous	Maritime pine
PM 72	449780	2307125	153	Resinous	Maritime pine
PM 85	259000	2218200	5	Resinous	Maritime pine
PS 04	948106	1901075	1670	Resinous	Scots pine
PS 15	656957	1984492	1000	Resinous	Scots pine
PS 35	310602	2362920	80	Resinous	Scots pine
PS 41	581794	2294876	140	Resinous	Scots pine
PS 44	288500	2290400	38	Resinous	Scots pine
PS 45	607300	2313300	145	Resinous	Scots pine
PS 61	390185	2405553	260	Resinous	Scots pine
PS 63	706308	2045785	750	Resinous	Scots pine
PS 67a	994275	2441413	175	Resinous	Scots pine
PS 67b	973984	2449075	290	Resinous	Scots pine
PS 76	484293	2496277	70	Resinous	Scots pine
PS 78	555448	2410861	170	Resinous	Scots pine
PS 88	923712	2367435	500	Resinous	Scots pine
PS 89	703134	2328743	120	Resinous	Scots pine
SP 05	927900	1951700	1360	Resinous	Silver fir
SP 07	728918	1968959	1300	Resinous	Silver fir
SP 09	518827	1762698	1100	Resinous	Silver fir
SP 11	580677	1762582	950	Resinous	Silver fir
SP 25	913600	2227700	1000	Resinous	Silver fir
SP 26	836320	1998570	1150	Resinous	Silver fir
SP 38	896804	2053802	1100	Resinous	Silver fir
SP 39	863186	2210375	560	Resinous	Silver fir
SP 57	953713	2411979	400	Resinous	Silver fir
SP 63	693100	2050300	1040	Resinous	Silver fir
SP 68	957577	2336804	680	Resinous	Silver fir

TABLE S2. Annual averages of CSIs, CLI, and measured soil parameters, with mixed-model coefficients assessing their national dynamics.

The table reports significance levels, as well as marginal (R^2m) and conditional (R^2c) R^2 values, which represent the proportion of variance explained by the fixed effect alone, and by both fixed and random effects, respectively. In models assessing the dynamics of indicator values, the fixed effect is time (Year), and the random effect includes subplot ID nested within plot ID, on both the intercept and the slope, to account for intra- and inter-plot variability. For models assessing measured soil parameter dynamics, the fixed effect remains the same, while the random effect includes only plot ID, also on both the intercept and the slope.

Library	Indicator Value	N		Average CSI/CLI ± SD per year						Dynamic/decade ± SD $\gamma^{Bioindicated}$	Sign.	R^2m	R^2c
		Plot	Sub-plot	*1995*	*2000*	*2005*	*2010*	*2015*	*2021*				
EcoPlant	pH_{indic}	536	2141	5.27 ±0.66	5.31 ±0.67	5.32 ± 0.68	5.29 ±0.65	5.32 ±0.68	5.28 ± 0.67	0.006 ± 0.004	ns	$<10^{-3}$	0.93
	C/N_{indic}			21.23 ±5.36	21.18 ±5.22	21.29 ± 5.08	21.0 ±5.11	21.1 ±5.05	21.1 ± 5	-0.076 ± 0.038	*	$<10^{-3}$	0.90
	P_{indic}			0.12 ±0.06	0.12 ±0.06	0.11 ± 0.06	0.11 ±0.06	0.11 ±0.06	0.11 ±0.05	-0.001± 0.001	ns		0.80
CATMINT	Light			5.66 ±0.56	5.67 ±0.56	5.74 ± 0.54	5.75 ±0.55	5.76 ±0.53	5.76 ± 0.53	0.034± 0.006	***	0.003	0.80
Layer	**Parameter**			**Average measured soil parameter ± SD per period**						$\gamma^{Measured}$			
				1993-1997			***2007-2012***						
0-10 cm	pH $CaCl_2$	200	996	4.11 ± 0.97			4.04 ± 1.00			-0.045 ± 0.010	***	$<10^{-3}$	0.94
	pH H_2O	200	998	4.78 ± 0.93			4.76 ± 0.98			-0.017 ± 0.010	.	$<10^{-3}$	0.94
	C/N	200	998	19.07 ± 5.62			20.51 ± 6.29			0.964 ± 0.090	***	0.01	0.88
	P	200	988	0.04 ± 0.07			0.04± 0.07			-5e-04 ± 6.9e-04	ns	$<10^{-3}$	0.95
10-20 cm	pH $CaCl_2$	200	996	4.33 ± 0.98			4.30± 1.01			-0.022 ± 0.011	.	$<10^{-3}$	0.92
	pH H_2O	200	996	4.94 ± 0.99			4.95± 1.04			0.007 ± 0.011	ns	$<10^{-3}$	0.93
	C/N	200	998	17.91 ± 6.25			20.83 ±8.46			1.941 ± 0.124	***	0.04	0.85
	P	200	978	0.03 ± 0.08			0.03± 0.09			8.6e-04 ± 9.4e-04	ns	$<10^{-3}$	0.93
20-40 cm	pH $CaCl_2$	198	986	4.53 ± 1.01			4.54± 1.09			0.001 ± 0.013	ns	$<10^{-3}$	0.92
	pH H_2O	198	982	5.11 ± 1.05			5.18± 1.13			0.049 ± 0.012	***	0.001	0.93
	C/N	198	986	16.21 ± 5.87			19.18 ± 8.62			1.982 ± 0.130	***	0.04	0.83
	P	196	948	0.03 ± 0.09			0.04± 0.11			0.002 ± 0.001	*	$<10^{-3}$	0.92

TABLE S3. Marginal (R^2m) and conditional (R^2c) coefficients of determination from mixed-effects models assessing the effects of stand age, soil properties, tree type, disturbances, and canopy on measured and indicated soil parameter dynamics, and their differences.

Marginal (R^2m) and conditional (R^2c) coefficients of determination from linear mixed-effects models assessing the effects of stand age, baseline soil properties, tree type, natural and anthropogenic disturbances, and canopy openness variation on soil parameter dynamics. The models were applied separately to the dynamics of measured values, the dynamics of values indicated by the vegetation, and the differences between them. These are referred to $\alpha^{Measured}$, $\alpha^{Biondicated}$, and Δ dynamics, respectively, where delta dynamics corresponds to the difference between measured and bioindicated trends. Results are presented for each of the three soil depths considered: 0–10 cm, 10–20 cm, and 20–40 cm.

Parameter	$\alpha^{Bioindicated}$		$\alpha^{Measured}$						Δ dynamics					
			0-10 cm		10-20 cm		20-40 cm		0-10 cm		10-20 cm		20-40 cm	
	R^2m	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***	***R^2m***	***R^2c***
pH $CaCl_2$	0.05	0.88	0.16	0.90	0.15	0.90	0.13	0.89	0.14	0.89	0.15	0.90	0.14	0.89
pH H_2O	0.05	0.88	0.20	0.90	0.15	0.90	0.11	0.89	0.20	0.90	0.14	0.89	0.14	0.89
C/N	0.20	0.90	0.22	0.90	0.30	0.91	0.20	0.90	0.23	0.91	0.31	0.92	0.23	0.90
P	0.22	0.90	0.15	0.89	0.58	0.95	0.77	0.97	0.20	0.90	0.28	0.91	0.51	0.94

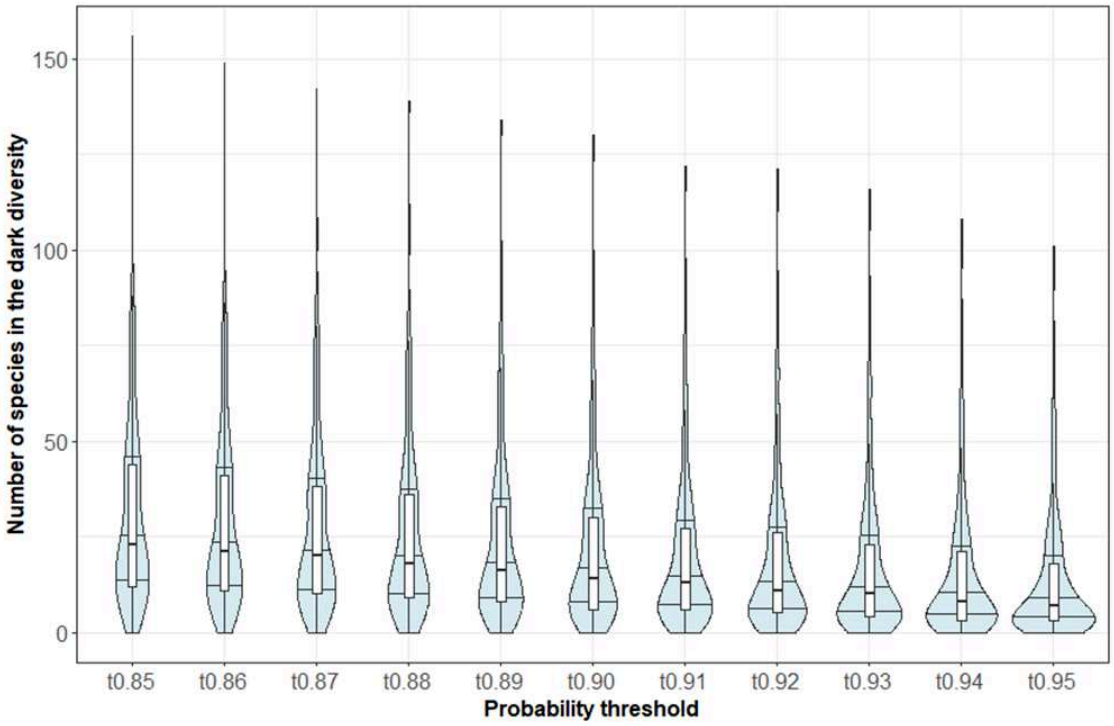


FIGURE S1. Determination of the optimal threshold for species' probability of belonging to the dark diversity.

Ten probability thresholds were tested, and the figure highlights the threshold that best separates species considered part of the dark diversity from those absent.

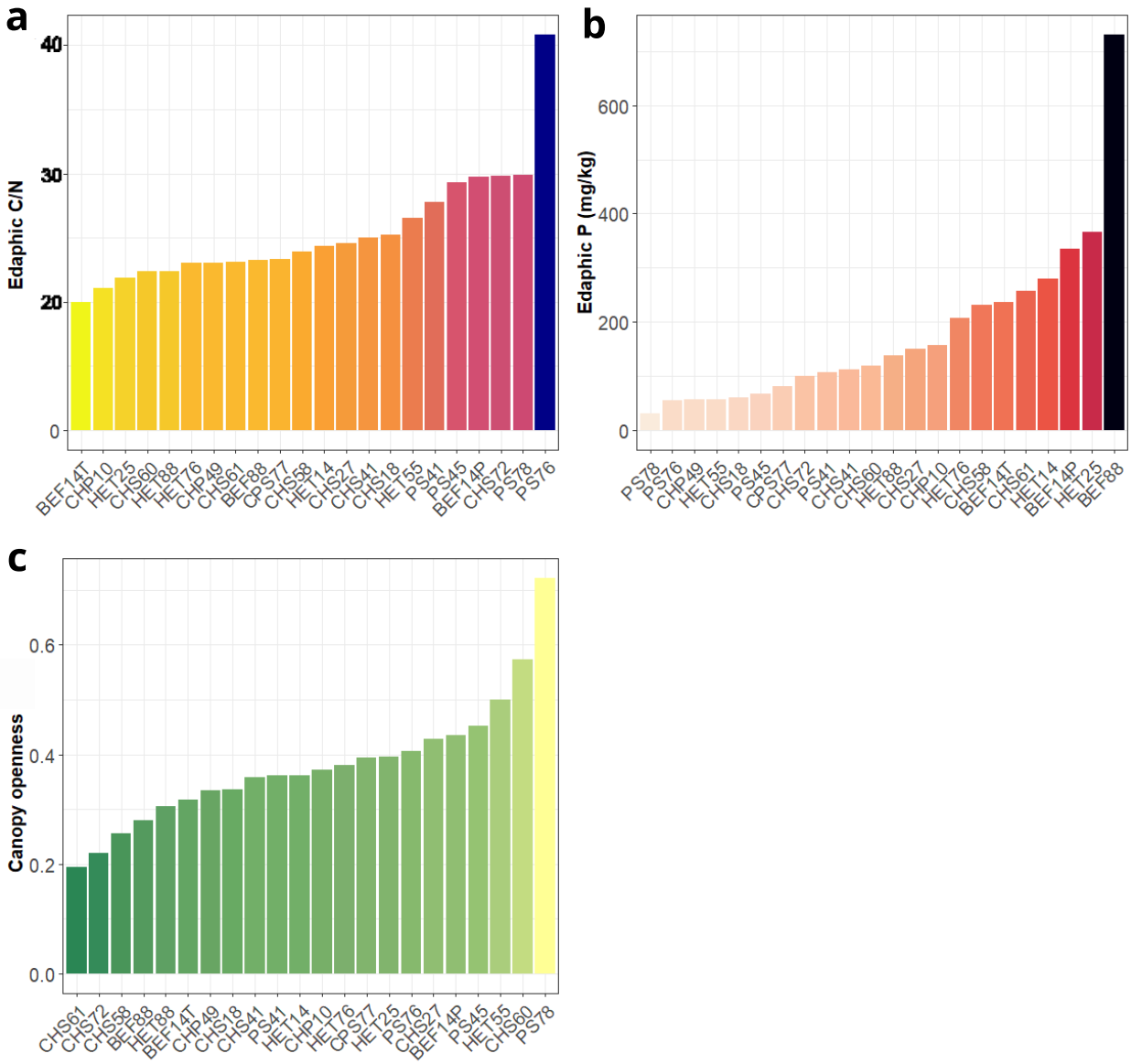


FIGURE S1. Edaphic and canopy gradients at 22 RENECOFOR and BEF sites.

Edaphic and canopy gradients across 22 selected RENECOFOR and BEF sites: C/N, phosphorus (mg/kg), and canopy openness

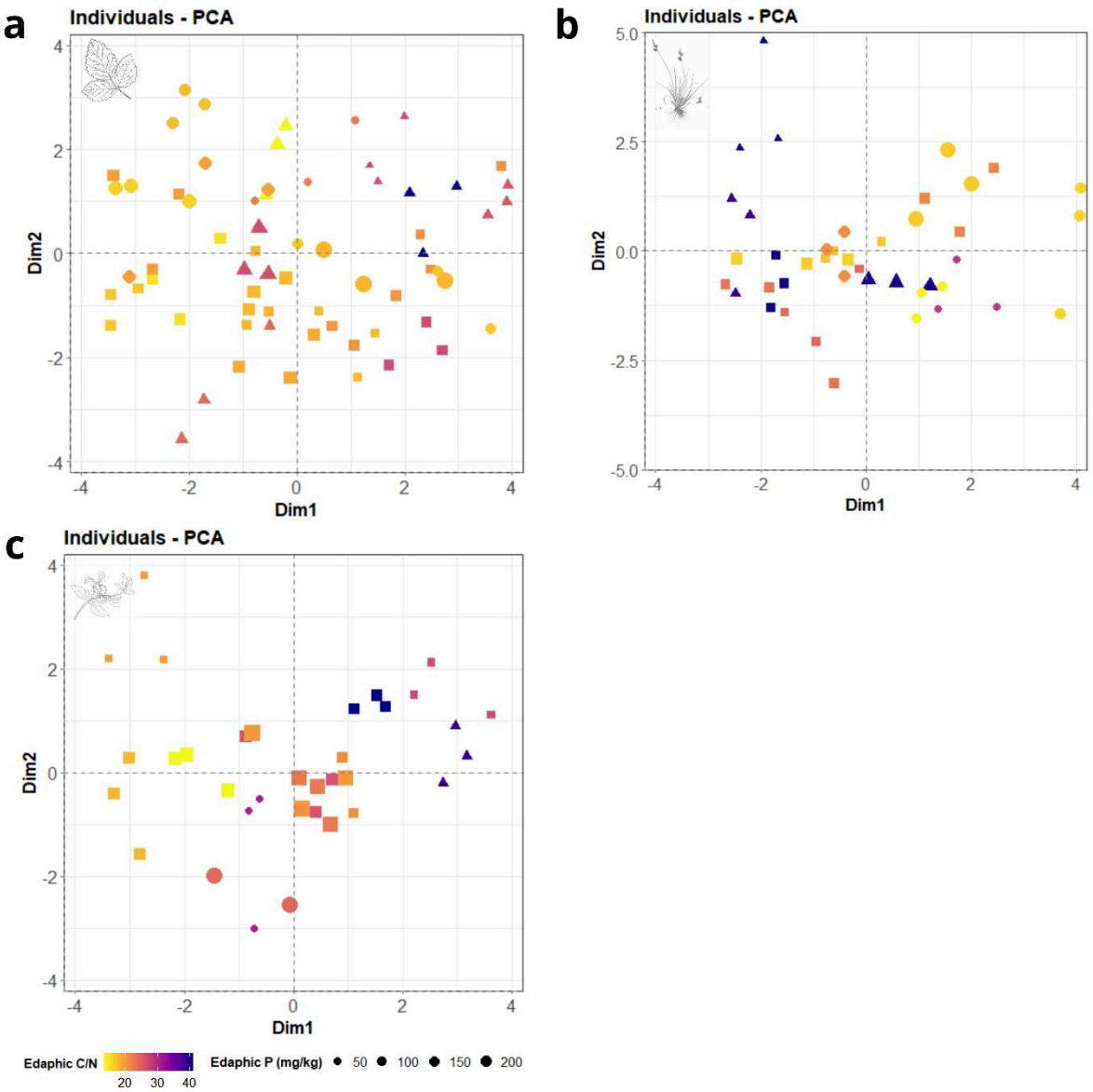


FIGURE S2. Ordination of individuals in the PCA space based on leaf functional traits.

Projection of individuals in the PCA space based on leaf functional traits. Each panel corresponds to a species: (a) Rubus fruticosus, (b) Carex pilulifera, and (c) Lonicera periclymenum.

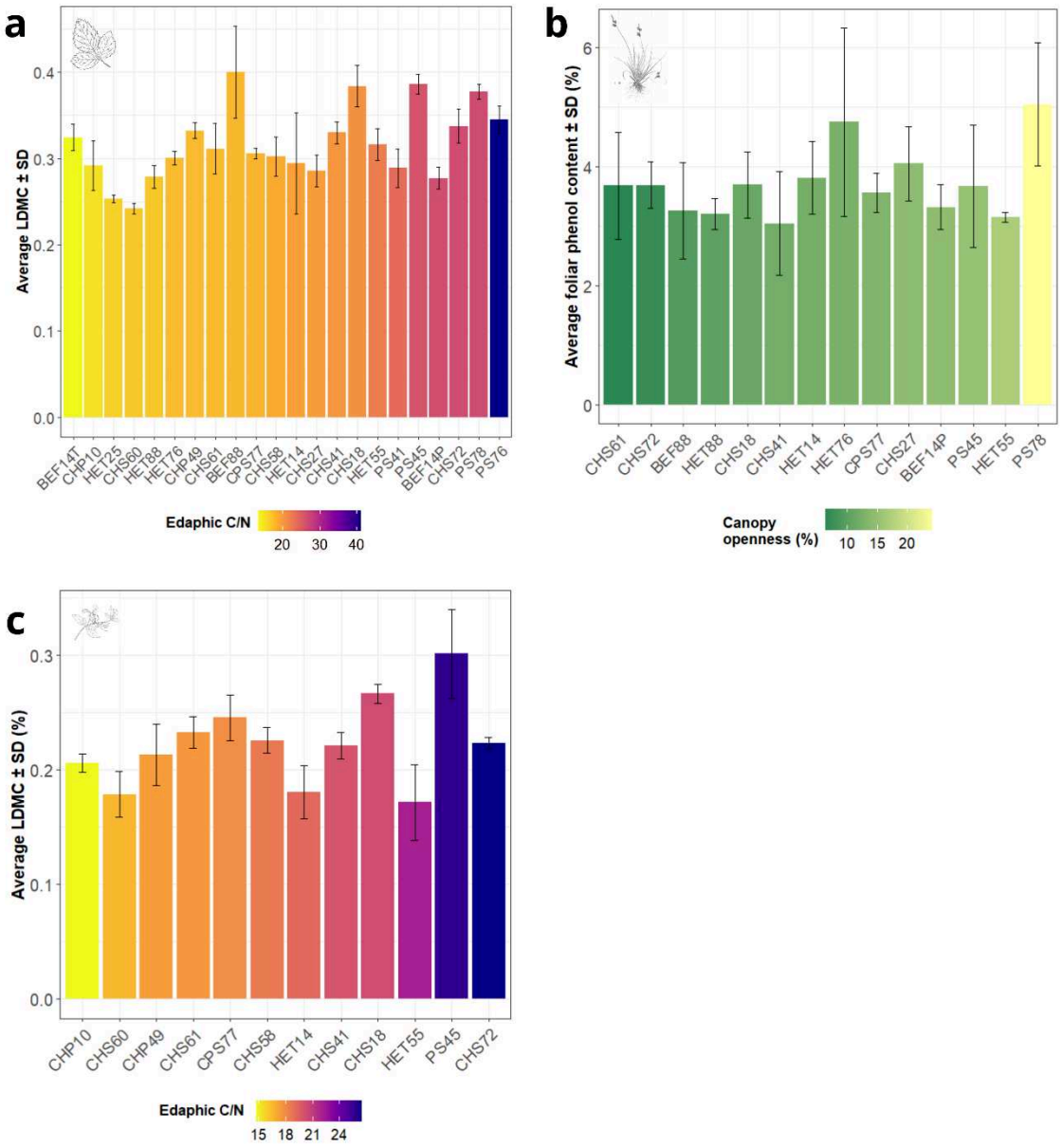


FIGURE S3. Correlation matrix of selected leaf and plant traits in relation to environmental gradients.

Representation of intraspecific variability in key traits contributing to the acquisition–conservation spectrum. For each species, the most responsive trait is shown in relation to its main environmental driver: (a) Rubus fruticosus (22 sites) – LDMC vs. soil C/N ratio; (b) Carex pilulifera (14 sites) – foliar phenolic concentration vs. canopy openness; (c) Lonicera periclymenum (12 sites) – LDMC vs. soil C/N ratio.

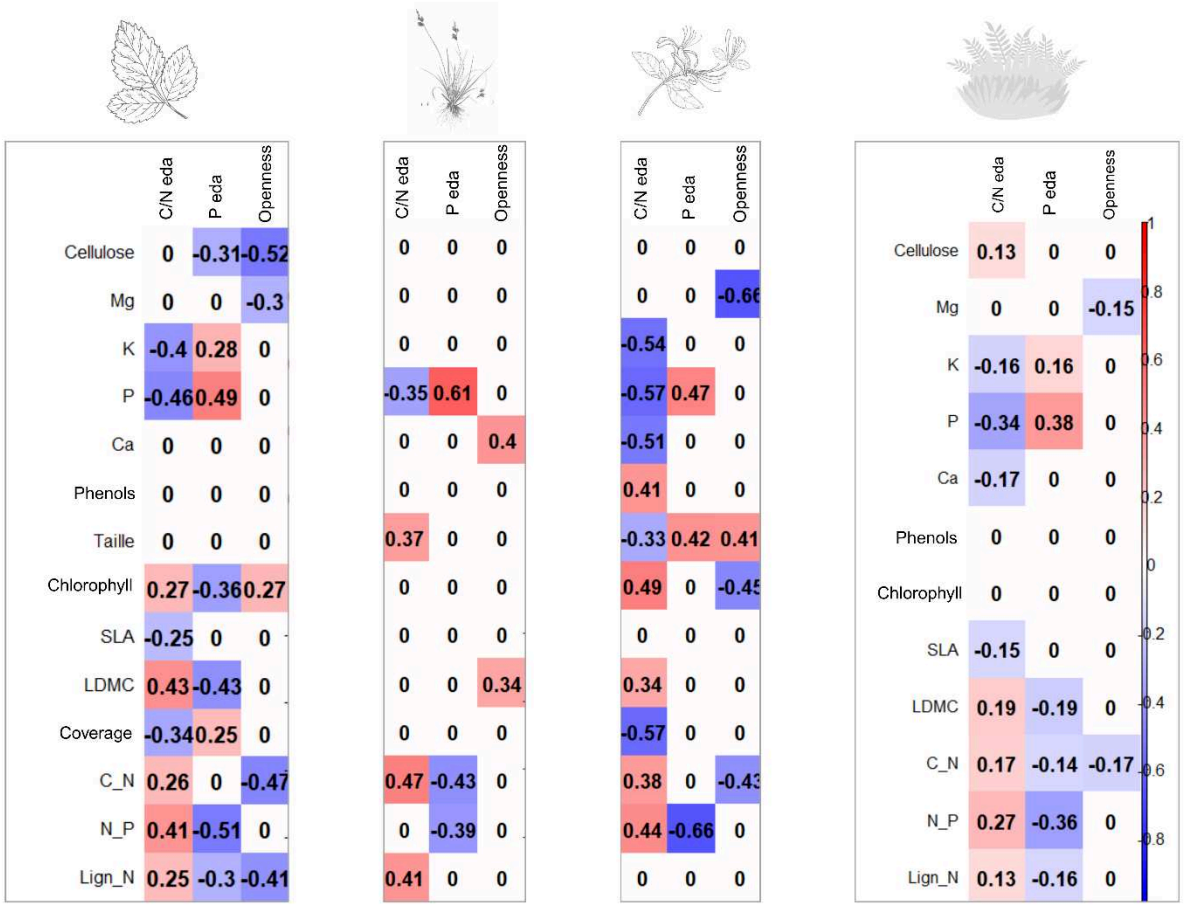


FIGURE S4. Correlation matrix of selected leaf and plant traits in relation to environmental gradients.

Correlation matrix of selected leaf and plant traits in relation to environmental gradients. Only significant correlations ($p < 0.05$) are shown. Blue shades indicate negative correlations, red shades indicate positive correlations. Pearson correlation coefficients were used. From left to right, matrices correspond to traits of Rubus fruticosus, Carex pilulifera, Lonicera periclymenum, and the dominant understory community.

TABLE S1. List of 22 species across the 22 selected sites.

Code	Complete name	Common name (FR)
C. fla	*Carex flacca*	Laîche glauque
C. pilu	*Carex pilulifera*	Laîche à pilules
C. pilo	Carex pilosa	Carex velu
C. syl	*Carex sylvatica*	Laîche des bois
C. vul	*Calluna vulgaris*	Bruyère commune
D. car	*Dryopteris carthusiana*	Dryoptéris de Chartreuse
D. ces	*Deschampsia cespitosa*	Canche cespiteuse
D. dil	*Dryopteris dilatata*	Dryoptéris dilaté
G. odo	*Galium odoratum*	Aspérule odorante
H. hel	*Hedera helix*	Lierre grimpant
L. luz	*Luzula luzuloides*	Luzule blanchâtre
L. peri	*Lonicera periclymenum*	Chèvrefeuille des bois
L. vul	*Ligustrum vulgare*	Troène commun
M. eff	*Milium effusum*	Millet diffus
M. mol	*Molinia caerulea*	Molinie bleue
M. per	*Mercurialis perennis*	Mercuriale vivace
M. uni	Melica uniflora	Melique à une fleur
P. aqui	*Pteridium aquilinum*	Fougère aigle
R. arv	*Rosa arvensis*	Rosier des champs
R. fru	*Rubus fruticosus*	Ronce commune
V. myr	*Vaccinium myrtillus*	Myrtille

TABLE S2. Proportion of variance in PCA axes 1 and 2 explained by intraspecific trait variation in Rubus fruticosus, Carex pilulifera, Lonicera periclymenum, and dominant species in the understory.

Trait	Rubus fruticosus		Carex pillulifera		Lonicera perycle-menum		Community	
Variable	PC1 (%)	PC2 (%)	PC1 (%)	PC2 (%)	PC1 (%)	PC2 (%)	PC1 (%)	PC2 (%)
C/N	11.65	6.16	17.16	8.99	10.02	4.26	5.96	21.14
Ca ($g.kg^{-1}$)	0.13	17.27	0.05	0.49	2.85	5.54	19.76	1.39
Cellulose (%)	4.22	17.58	8.71	0.90	2.05	7.00	25.89	4.21
Chlorophyll (%)	3.51	5.57	0.33	1.69	9.79	0.20	5.06	3.21
Coverage (%)	9.45	3.00	11.75	0.28	9.77	8.51		
K ($g.kg^{-1}$)	5.66	0.04	8.90	13.90	12.79	4.60	9.20	10.84
LDMC	12.99	1.66	9.33	9.22	12.42	8.26	0.86	12.33
Lignin/N	9.31	7.34	6.47	7.87	4.44	12.84	8.43	10.91
Mg ($g.kg^{-1}$)	0.34	17.12	5.46	2.40	0.00	4.80	15.49	4.88
N/P (%)	10.90	4.58	0.65	20.41	6.65	8.54	2.05	1.30
P ($g.kg^{-1}$)	19.13	0.08	14.99	0.85	13.39	15.27	0.07	18.94
Phenols (%)	0.04	3.66	0.18	23.23	13.06	3.60	6.42	2.71
SLA	7.07	10.95	3.76	9.37	2.71	3.16	0.81	8.12
Internods or Size (cm)	5.59	4.99	12.27	0.39	0.06	13.42		

TABLE S3. Intraspecific trait variability (minimum, mean ± SD, maximum) for Rubus fruticosus, Carex pilulifera, and Lonicera periclymenum, and interspecific trait variability for dominant understory species.

Leaf trait	*Rubus fruticosus*			*Carex pillulifera*			*Lonicera peryclemenum*			Community		
Variable	Min	Mean ± SD	Max	Min	Mean ± SD	Max	Min	Mean ± SD	Max	Min	Mean ± SD	Max
C/N	10.6	17.90 ± 3.14	25.1	14.9	20.80 ± 3.73	29.4	14.4	19.90 ± 3.43	28.1	10.6	20.6 ± 5.73	47.3
Ca ($g.kg^{-1}$)	1.89	5.83 ± 1.76	10.69	1.35	1.89 ± 0.31	2.48	5.58	10.71 ± 2.58	15.57	0.65	5.38 ± 4.23	24.31
Cellulose (%)	4.75	6.96 ± 1.05	8.95	11.4	13.00 ± 0.68	14.2	3.69	4.19 ± 0.28	4.85	3.69	8.77 ± 3.42	16.3
Chlorophyll (SPAD index)	28.9	35.80 ± 3.79	45.4	23.8	29.40 ± 3.45	39.8	24.6	34.20 ± 3.68	40.7	5.77	34.8 ± 10.1	141
Coverage (%)	0.25	12 ± 15	45	0.13	0.56 ± 0.48	2	1	8.89 ± 11	38.30			
K ($g.kg^{-1}$)	6.67	13.40 ± 2.27	18.73	16.39	19.58 ± 1.54	22.28	12.69	20.08 ± 4.13	28.42	6.39	16.75 ± 5.27	33.34
LDMC	0.24	0.32 ± 0.05	0.44	0.26	0.42 ± 0.13	0.82	0.14	0.22 ± 0.04	0.35	0.11	0.33 ± 0.19	2.66
Lignin/N	0.354	0.84 ± 0.23	1.43	0.331	0.54 ± 0.15	0.867	0.505	0.79 ± 0.18	1.17	0.278	1.17 ± 0.79	4.18
Mg ($g.kg^{-1}$)	3.00	4.13 ± 0.59	5.44	0.74	1.02 ± 0.13	1.25	1.50	3.14 ± 0.69	4.28	7.38	2.18 ± 1.43	5.44
N/P (%)	0.001	0.19 ± 0.05	0.33	0.14	0.21 ± 0.03	0.26	0.13	0.19 ± 0.04	0.30	0.06	0.18 ± 0.05	0.37
P ($g.kg^{-1}$)	0.72	1.63 ± 0.50	2.86	0.67	1.12 ± 0.23	1.60	0.81	1.34 ± 0.36	2.23	0.67	1.45 ± 0.55	4.08
Phenols (%)	4.89	8.94 ± 2.86	17.8	2.09	3.71 ± 0.86	6.57	2.86	4.38 ± 0.81	6.21	0.787	5.59 ± 3.31	18.9
SLA	186	314 ± 75	630	61.4	182 ± 84	293	267	616 ± 663	2988	61.4	311 ± 280	2988
Internods or Size (cm)	2.2	5.74 ± 1.40	8.6	14.5	28.9 ± 9.10	43.4	3.1	9.49 ± 7.62	48.8			

Résumé général

Depuis les années 1980, face aux préoccupations croissantes liées aux dépôts atmosphériques de soufre et d'azote ainsi qu'aux effets des pluies acides, plusieurs réseaux de suivi à long terme ont été mis en place afin d'évaluer l'état de santé des forêts européennes, parmi lesquels le programme ICP Forests. En France, le réseau RENECOFOR assure un suivi harmonisé de la végétation du sous-bois, de la chimie des sols et des arbres sur un ensemble de placettes permanentes réparties sur tout le territoire.

Les données issues de ce dispositif montrent une dégradation progressive du statut nutritionnel des arbres, particulièrement marquée pour le phosphore, et dans une moindre mesure pour l'azote. En revanche, les propriétés édaphiques présentent des évolutions contrastées, parfois stables ou divergentes selon les horizons de sol. Ce découplage entre la dynamique des sols et celle des arbres interroge la capacité des autres strates forestières, en particulier celle du sous-bois, à refléter fidèlement les variations des conditions édaphiques.

Constituée d'espèces herbacées, de fougères, de mousses et de petits arbustes, la strate du sous-bois est particulièrement sensible aux gradients environnementaux locaux. Elle est donc couramment utilisée comme indicateur indirect des conditions du sol, tant dans l'espace que dans le temps. Néanmoins, sa capacité à suivre de manière fiable les changements édaphiques à long terme n'avait jusqu'à présent jamais été évaluée à partir de suivis standardisés et permanents.

Cette thèse vise à évaluer la cohérence entre les variations mesurées dans les sols et celles bioindiquées par la végétation du sous-bois des forêts tempérées françaises, à partir des données du réseau RENECOFOR. Trois approches complémentaires ont été mobilisées afin de tester la sensibilité écologique du sous-bois :(1) la composition floristique observée, qui reflète directement les filtres écologiques locaux ; (2) la diversité sombre, intégrant les espèces absentes mais écologiquement compatibles avec le site ; et (3) les traits fonctionnels foliaires, révélant les stratégies d'acquisition et de conservation des ressources en réponse aux contraintes abiotiques et biotiques. Ces approches permettent d'examiner la capacité du sous-bois à bioindiquer les gradients édaphiques dans l'espace et le temps, et d'identifier les mécanismes susceptibles d'améliorer la fiabilité de la bioindication.

Le premier chapitre évalue la sensibilité des indices communautaires de sol (ICS), calculés à partir des valeurs indicatrices des espèces, pour détecter les changements temporels des propriétés édaphiques. En combinant six campagnes de suivi de la végétation (1995–2021) et deux enquêtes pédologiques (1993–1997 et 2007–2012) sur 102 placettes, nous avons comparé les dynamiques des ICS à celles du pH, du rapport C/N et du phosphore assimilable. Les résultats indiquent que les ICS traduisent avant tout les effets de l'ouverture du couvert et des perturbations anthropiques, tandis qu'ils ne reflètent pas les variations des propriétés édaphiques, révélant une sensibilité limitée du sous-bois aux changements pédologiques à long terme.

Le deuxième chapitre explore la contribution de la diversité sombre, c'est-à-dire des espèces absentes mais écologiquement adaptées aux conditions locales, pour affiner la bioindication. À partir des relevés floristiques et des mesures de sol de 99 placettes RENECOFOR (1995–2015), nous avons estimé la diversité sombre et constitué pour chaque site un pool spécifique combinant diversité observée et diversité sombre. L'analyse des ICS relatifs au rapport C/N montre que l'intégration de la diversité sombre améliore nettement la bioindication, tant dans sa dimension spatiale que temporelle. Le turnover d'espèces entre diversité observée et diversité sombre explique la majorité des variations des valeurs indicatrices, soulignant l'intérêt de cette approche pour restaurer la cohérence entre dynamiques édaphiques mesurées et bioindiquées.

Enfin, le troisième chapitre s'intéresse aux traits fonctionnels foliaires associés au Leaf Economics Spectrum (LES) pour affiner la bioindication de la fertilité du sol. Sur 22 sites forestiers (RENECOFOR et BEF) couvrant de larges gradients de rapport C/N et de phosphore, des mesures de traits foliaires ont été réalisées sur trois espèces de sous-bois largement répandues, puis comparées aux valeurs indicatrices classiques. Les résultats montrent que les traits du LES capturent de manière cohérente le continuum acquisition–conservation à la fois au niveau individuel et communautaire, et détectent plus finement les gradients de fertilité que les ICS traditionnels. À l'échelle des assemblages dominants, la variation de stratégie le long du gradient de fertilité résulte à la fois du turnover spécifique et de la variabilité intraspécifique, démontrant la capacité des traits fonctionnels à révéler des réponses écologiques fines et sensibles aux conditions édaphiques.

Dans son ensemble, cette thèse met en évidence les limites des valeurs indicatrices classiques pour suivre les changements temporels des sols, tout en proposant deux approches complémentaires, l'intégration de la diversité sombre et l'utilisation des traits fonctionnels du LES, pour renforcer la sensibilité et la robustesse de la bioindication. Ces travaux fournissent un cadre conceptuel et méthodologique solide pour mieux interpréter les dynamiques pédologiques à long terme à partir de la végétation du sous-bois, et contribuent à améliorer la fiabilité des indicateurs écologiques dans le suivi des écosystèmes forestiers.

Mots-clés : forêt tempérée, sous-bois, bioindication, diversité sombre, traits fonctionnels, Leaf Economics Spectrum, fertilité du sol, suivi à long terme.

Abstract

Since the 1980s, growing concerns about acid rain and atmospheric sulfur and nitrogen deposition have led to the establishment of long-term monitoring networks to assess the health of European forests, among which the ICP Forests program is a key initiative. In France, the RENECOFOR network ensures harmonized monitoring of understory vegetation, soil chemistry, and tree nutrition across a set of permanent plots distributed nationwide.

Data from this network reveal a progressive decline in tree nutritional status, particularly for phosphorus, and to a lesser extent for nitrogen. In contrast, soil properties show more variable trends, remaining stable or even diverging between horizons. This decoupling between soil and tree dynamics raises questions about the ability of other forest layers—particularly the understory—to reliably reflect edaphic variability.

Composed of herbaceous species, ferns, mosses, and small shrubs, the understory layer is highly sensitive to local environmental gradients and is therefore widely used as an indirect indicator of soil conditions at both spatial and temporal scales. However, its ability to accurately track long-term changes in soil properties has never been rigorously evaluated using standardized and permanent monitoring data.

This thesis aims to assess the coherence between measured changes in soil properties and those bioindicated by understory vegetation in temperate French forests, using data from the RENECOFOR network. Three complementary approaches were developed to test the ecological sensitivity of the understory: (1) observed floristic composition, directly reflecting local ecological filters; (2) dark diversity, encompassing species absent but ecologically suitable for the site; and (3) leaf functional traits, which reveal plant resource-use strategies along abiotic and biotic gradients. Together, these approaches make it possible to examine the ability of the understory to bioindicate edaphic gradients across space and time, and to identify the ecological mechanisms that may enhance bioindication reliability.

The first chapter evaluates the sensitivity of community-weighted soil indices (ICS), derived from traditional species indicator values, to detect temporal changes in edaphic properties. By combining six vegetation surveys (1995–2021) with two soil sampling campaigns (1993–1997 and 2007–2012) on 102 plots, we compared ICS dynamics with measured changes in soil pH, C/N ratio, and extractable phosphorus. Results show that ICS primarily capture canopy openness and anthropogenic disturbances, while failing to reflect soil dynamics, revealing a limited sensitivity of the understory to long-term pedological change.

The second chapter investigates the contribution of dark diversity—species absent but ecologically compatible with local conditions—to improving bioindication. Using floristic and soil data from 99 RENECOFOR plots (1995–2015), dark diversity was estimated and combined with observed species to define a site-specific species pool. Analyses of community C/N indices show that integrating dark diversity significantly improves bioindication, both spatially and temporally. Species turnover between observed and dark diversity accounts for most changes in indicator values, emphasizing the potential of this approach to restore coherence between measured and bioindicated edaphic dynamics.

Finally, the third chapter focuses on leaf functional traits associated with the Leaf Economics Spectrum (LES) to refine soil fertility bioindication. Across 22 forest sites (RENECOFOR and BEF networks) covering broad gradients of soil C/N ratio and phosphorus availability, we measured foliar traits for three widespread understory species and compared their variation with traditional indicator values. Results show that LES traits consistently capture the acquisition–conservation continuum at both individual and community levels, and detect fertility gradients more sharply than conventional ICS. At the scale of dominant assemblages, trait shifts along fertility gradients result from both species turnover and intraspecific variability, demonstrating the ability of functional traits to reveal fine-scale ecological responses to edaphic conditions.

Overall, this thesis highlights the limitations of traditional indicator values for tracking temporal soil change, while proposing two complementary approaches—the integration of dark diversity and the use of LES functional traits—to strengthen the sensitivity and robustness of bioindication. Together, these findings provide a solid conceptual and methodological framework to better interpret long-term soil dynamics through understory vegetation, and contribute to improving the reliability of vegetation-based indicators in forest ecosystem monitoring.

Keywords: temperate forest, understory vegetation, bioindication, dark diversity, functional traits, Leaf Economics Spectrum, soil fertility, long-term monitoring