

---

## Evaluation sur quatre ans de différents types de buttes permacoles : analyse d'indicateurs de qualité du sol et de la biomasse des légumes

**Auteur :** Fripiat, Valentine

**Promoteur(s) :** De Clerck, Caroline

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2023-2024

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/21439>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**ÉVALUATION SUR QUATRE ANS DE  
DIFFÉRENTS TYPES DE BUTTES  
PERMACOLES : ANALYSE D'INDICATEURS DE  
QUALITÉ DU SOL ET DE LA BIOMASSE DES  
LÉGUMES**

**VALENTINE FRIPIAT**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER  
BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024**

**PROMOTRICE : CAROLINE DE CLERCK**





Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech. Le présent document n'engage que son auteur.

**ÉVALUATION SUR QUATRE ANS DE  
DIFFÉRENTS TYPES DE BUTTES  
PERMACOLES : ANALYSE D'INDICATEURS DE  
QUALITÉ DU SOL ET DE LA BIOMASSE DES  
LÉGUMES**

**VALENTINE FRIPIAT**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER  
BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2023-2024**

**PROMOTRICE : CAROLINE DE CLERCK**



---

## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite avant tout exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice, Caroline De Clerck, sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Merci infiniment pour tes conseils avisés, tes encouragements et ton humanité tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier chaleureusement Marie Dincher, qui a été ma co-promotrice durant plusieurs mois. Merci pour ta bienveillance, ta motivation et d'avoir toujours répondu à mes questions avec patience et bonne humeur.

Je remercie tout particulièrement Hadrien Nuydt, maraîcher en charge de la plateforme WASABI, avec qui j'ai battu des records de vitesse de plantation, sauvé des hérissons et appris le cri des faucons crécerelles. Ce mémoire n'aurait pas été pareil sans toi.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont aidée sur le terrain, que ce soit pour le désherbage ou le tamisage des sols, vous avez été formidables. Un merci tout particulier à Emma, qui a désherbé les buttes autant de fois que moi, et m'a initiée aux mots normands des adventices.

Je souhaite également remercier Adrien, Jimmy et Sok Lay pour leur précieux accompagnement en laboratoire, ainsi que Macha pour son aide et ses conseils avisés au cours des différentes expériences.

Un merci particulier à tous mes collègues mémorants, Anne-Sophie, Astrid, Emilie, Florent, Matthieu, Pierre, Shannah et Simon avec lesquels j'ai passé les six derniers mois. Cette expérience n'aurait pas été similaire sans chacun d'entre vous. Un merci tout particulier à Shannah, avec qui j'ai partagé toutes les émotions possibles ces dernières semaines.

Merci à ma maman, Aline et Igor pour leur relecture attentive et leurs conseils judicieux.

Je remercie du fond du cœur ma famille, en particulier mes parents, pour leur soutien indéfectible tout au long de ces années et pour avoir toujours cru en moi.

Je suis également profondément reconnaissante envers tous mes amis pour leur soutien inconditionnel. Je me sens incroyablement chanceuse de vous avoir dans ma vie.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Aline, pour sa sagesse infinie et son dévouement sans faille tout au long de ce travail.

Enfin, un merci spécial à Igor, pour son soutien tout au long de ces années, ses encouragements continuels et sa présence ensoleillée dans ma vie.

Et pour finir, une pensée émue pour mon chat, qui a veillé avec moi lors des longues soirées de travail, de ma première année d'études jusqu'à la dernière. Merci pour tes initiatives de rédaction impromptues, même si elles ont dû être retirées, l'attention était appréciée.



---

## RÉSUMÉ

---

L'agriculture conventionnelle est arrivée à un tournant critique, connaissant une crise économique, sociale et environnementale inédite, dans un environnement menacé par le changement climatique, la perte de biodiversité et la dégradation rapide des sols. Dans ce contexte, de nouvelles méthodes comme la permaculture et les technosols construits pourraient proposer une alternative résiliente. Les buttes de permaculture, constituées en grande partie de matière organique, permettraient une auto-fertilité sur plusieurs années, tout en améliorant l'activité biologique et les rendements.

Ce travail a pour objectif l'évaluation de la fertilité de 4 types de buttes, de composition différente, ainsi que d'un témoin non butté durant 4 années d'étude. Ce sujet est peu abordé dans la littérature scientifique et contribuera à l'enrichir. Des indicateurs de qualité du sol basés sur des propriétés physiques, chimiques et biologiques ont été utilisés sur deux horizons de sol différents.

Les résultats indiquent que la 4<sup>e</sup> année, toutes les buttes contenant de la matière organique ont des taux plus élevés en éléments disponibles, en carbone organique et en respiration microbienne carbonée dans l'horizon 2. Elles ont des rendements plus élevés que les buttes en terre et les témoins non buttés et obtiennent de meilleurs rendements que les moyennes des cultures conventionnelles en Wallonie pour les cultures d'oignons ciboules et de fenouil. L'humidité est plus importante dans les témoins non buttés que dans les autres buttes, mais les buttes riches en matière organique ont des taux d'humidité plus élevés que les buttes en terre. Les buttes composées uniquement de résidus carbonés semblent connaître une faim d'azote les 2 premières années, donnant des rendements beaucoup plus faibles que les autres types de buttes.

Après 4 années d'études, des tendances plus nettes se dégagent au travers des différents indicateurs de qualité des sols et du rendement, montrant que les buttes riches en matière organique semblent avoir des sols plus fertiles. Cette étude donne un premier aperçu de l'évolution de ces nouveaux sols, mais nécessite le suivi des indicateurs de qualité des sols pour les années à venir.

### *Mots clés*

---

Permaculture, Technosols construits, Buttes de permaculture, Fertilité du sol, Matière organique, Activité microbienne, Activité enzymatique.

---

## ABSTRACT

---

Conventional agriculture has reached a critical turning point, experiencing an unprecedented economic, social, and environmental crisis in an environment threatened by climate change, biodiversity loss, and rapid soil degradation. In this context, new methods such as permaculture and constructed technosols could offer a resilient alternative. Permaculture raised beds, mostly constituted of organic matter, could enable self-sufficiency in fertility over several years while improving biological activity and producing better yields.

This work focuses on evaluating the fertility over four years of study on four types of raised beds with different compositions, in addition to the control beds, to enrich the scientific literature, in which this subject is overlooked. Soil quality indicators were used, based on physical, chemical, and biological properties, across two different soil horizons.

Results indicate that in the fourth year, all raised beds containing organic matter show higher levels of available elements, organic carbon, and soil microbial respiration in horizon 2. They also show higher yields compared to the soil-only beds and the non-raised control beds and achieve better yields than the average for conventional crops in Wallonia, particularly for scallions and fennel. Moisture levels are higher in the non-raised control beds than in the other raised beds but raised beds rich in organic matter have higher moisture levels than the soil-only beds. Raised beds composed solely of carbon-rich residues appear to experience nitrogen deficiency in the first two years, resulting in significantly lower yields than other types of raised beds.

After four years of study, clearer trends are emerging across various soil quality indicators and yield measurements, showing that raised beds rich in organic matter tend to have more fertile soils. This study provides an initial insight into the evolution of these new soils but requires ongoing monitoring of soil quality indicators in the coming years.

### *Keywords*

---

Permaculture, Constructed technosols, Raised-beds, Soil fertility, Organic matter, Microbial activity, Enzymatic activity.

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADNr : ADN ribosomique

ANOVA : analyse de la variance

C/N : carbone organique/azote total

C : carbone

Ca : calcium

CEC : capacité d'échange cationique

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

COT : carbone organique total

F : buttes forestières

FAO : Food and Agricultural Organisation

FDA : diacétate de fluorescéine

IRM : Institut Royal Météorologique

K : potassium

L : buttes lasagnes

Mg : magnésium

MO : matière organique

N : azote

P : phosphore

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

qPCR : PCR quantitative

S : buttes sandwichs

T : buttes en terre

WASABI : plateforme Wallonne de Systèmes innovants en Agriculture et Biodiversité urbaine

WRB : World Reference Base for soil resources

Z : témoins non buttés

---

## TABLE DES MATIÈRES

---

1 Introduction.....	1
2 État de l'art.....	3
2.1 Le sol, une ressource précieuse.....	3
2.1.1 L'homme et les sols .....	3
2.1.2 Les technosols.....	4
2.1.3 Les technosols construits.....	4
2.2 La permaculture.....	6
2.2.1 Introduction .....	6
2.2.2 Les buttes permacoles .....	6
2.2.3 Les différents types de buttes existantes .....	7
2.3 La qualité des sols.....	10
2.3.1 Définition des concepts de fertilité et de qualité des sols.....	10
2.3.2 La matière organique du sol : dynamique et impact sur les propriétés du sol .....	10
2.4 Évaluation de la qualité d'un sol.....	13
2.4.1 Indicateurs chimiques.....	13
2.4.2 Indicateurs physiques .....	14
2.4.3 Indicateurs biologiques.....	14
3 Matériel et méthodes.....	16
3.1 Localisation de l'essai .....	16
3.2 Conditions climatiques .....	16
3.3 Modalités étudiées .....	17
3.4 Dispositif expérimental.....	18
3.5 Mise en place des cultures .....	19
3.6 Récolte et quantification de la biomasse aérienne .....	20
3.7 Échantillonnage de sol.....	21
3.7.1 Caractéristiques chimiques du sol .....	22
3.7.2 Caractéristiques biologiques du sol .....	22
3.8 Récapitulatif des années précédentes .....	24
3.9 Traitement et structuration des données brutes .....	26
3.10 Analyses statistiques .....	27

4 Résultats .....	28
4.1 Année 2024.....	28
4.1.1 Quantification de la biomasse aérienne.....	28
4.1.2 Caractéristiques chimiques du sol .....	32
4.1.3 Caractéristiques biologiques du sol .....	36
4.2 Compilation des années 2021 à 2024.....	40
4.2.1 Quantification de la biomasse aérienne fraîche et sèche .....	40
4.2.2 Caractéristiques chimiques du sol .....	43
4.2.3 Caractéristiques biologiques du sol .....	46
4.2.4 Caractéristiques physiques du sol .....	49
5 Discussion .....	50
6 Conclusion et perspectives.....	55
7 Contribution personnelle .....	57
8 Bibliographie.....	58
9 Annexes .....	69

---

## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1 : Schéma de la butte sandwich ou Morez (Hoffmann, 2018).....	8
Figure 2 : Schéma de la butte lasagne (Hoffmann, 2018). ....	8
Figure 3 : Schéma de la butte forestière (Hoffmann, 2018). ....	9
Figure 4 : Représentation schématique des flux d'azote et de carbone dans le sol (Amin, 2012). ....	11
Figure 5 : Composition des différents types de buttes en coupe transversale (Jacques, 2021). ....	17
Figure 6 : Dispositif expérimental (Lerogeron, 2022).....	18
Figure 7 : Plan de culture sur une butte en 2024. ....	19
Figure 8 : Emplacement des prélèvements de sol sur le sommet d'une butte.....	21
Figure 9 : Prélèvements du sol avec une tarière et séparation visuelle des échantillons en deux horizons. ....	21
Figure 10 : Schéma d'un puits profond connecté à un puits de détection (Campbell et al., 2003).....	22
Figure 11 : Illustration du kit microresp™ (The James Hutton Institute, 2019). ....	23
Figure 12 : Biomasse fraîche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen, d'épinard à gauche et d'oignon à droite. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ).....	29
Figure 13 : À gauche : Photo prise le jour de la récolte des épinards (24/05), on observe les différences de taille des épinards entre les 3 buttes de même modalité. Au milieu et à droite, photo prise le jour de la récolte des oignons (17/05), on observe les différences au sein de la même butte. ....	29
Figure 14 : Biomasse sèche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen d'épinard à gauche et d'oignon à droite. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ).....	31
Figure 15 : Quantité de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g) en fonction du type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	33
Figure 16 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	35
Figure 17 : Taux de CO <sub>2</sub> émis ( $\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$ ), selon le type de butte, séparé par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux de CO <sub>2</sub> (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	36
Figure 18 : Activité enzymatique de la FDA selon le type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur l'activité enzymatique mesurée (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	37
Figure 19 : Quantité de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) selon le type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le nombre de gènes (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ).....	39
Figure 20 : Biomasse fraîche d'un plant moyen (g) par type de butte, séparée par année (1= 2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ).....	41
Figure 21 : Quantité de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g) en fonction du type de butte, pour l'horizon 2 pour chaque année (1= 2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ).....	43

Figure 22 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, pour l'horizon 2, pour chaque année (1= 2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). .....	45
Figure 23 : Taux de CO <sub>2</sub> émis ( $\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$ ), selon le type de butte, séparé par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux de CO <sub>2</sub> (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). .....	46
Figure 24 : Activité enzymatique de la FDA selon le type de butte, séparée par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur l'activité enzymatique mesurée (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). .....	47
Figure 25 : Quantité de gènes bactériens (16S) selon le type de butte, séparée par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le nombre de gènes (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). .....	48
Figure 26 : Humidité dans le sol ( $\text{m}^3$ d'eau/ $\text{m}^3$ de sol), selon le type de butte, séparée par position. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux d'humidité (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). .....	49

---

## TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Calendrier des opérations culturales des légumes cultivés sur les buttes.....	19
Tableau 2 : Dates de récolte des différentes cultures.....	20
Tableau 3 : Récapitulatif des expériences sur 4 ans.....	25
Tableau 4 : Tableau reprenant les éléments disponibles et échangeables dans le sol (de Tombeur et al., 2018).....	53



---

## TABLE DES ANNEXES

---

Annexe 1 : Profondeur des horizons des différentes buttes, estimée lors de l'échantillonnage le 10/05/24.....	69
Annexe 2 : Protocole d'étude de la respiration microbienne dans le sol. ....	70
Annexe 3: Extraction d'ADN (QIAGEN, 2019).....	78
Annexe 4: Quantification de l'ADN extrait par fluorescence. ....	80
Annexe 5: NanoDrop 1000 user manual (QIAGEN, 2019). ....	81
Annexe 6: Quantification des populations bactériennes et fongiques par qPCR (Grossemy, 2023). ...	83
Annexe 7 : Étude de l'activité enzymatique par fluorescence de l'hydrolyse de la FDA (Grossemy, 2023). .....	85
Annexe 8 : Biomasses fraîches d'un plant moyen de fenouil et de laitue de 2024 en grammes. ....	88
Annexe 9 : Biomasses sèches d'un plant moyen de fenouil et de laitue de 2024 en grammes. ....	88
Annexe 10 : Rendements moyens des biomasses fraîches des légumes (en kg/m <sup>2</sup> ) de 2024, comparées aux rendements moyens du CIM (Centre Interprofessionnel Maraîcher) en culture conventionnelle (F. Hawotte et M.Eck, communication personnelle, 30/07/24). ....	89
Annexe 11 : Rapport entre la quantité de gènes fongiques sur la quantité de gènes bactériens, pour chaque horizon en 2024. ....	89
Annexe 12 : Biomasse sèche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen, séparée par année. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	90
Annexe 13 : Quantités de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g TS) en fonction du type de butte, pour l'horizon 1 pour chaque année. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). Caractéristiques chimiques du sol, compilation des années 2022-2024 pour l'horizon 1.....	91
Annexe 14 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, pour l'horizon 1 pour chaque année. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité : $\alpha < 0,05$ ). ....	92
Annexe 15 : Résultats des analyses chimiques par le laboratoire de la Hulpe de 2021 (Jacques, 2021). .....	93
Annexe 16 : Quantités de gènes fongiques (18S) selon le type de butte, séparé par horizon et par année. .....	94
Annexe 17 : Rapport entre le nombre de gènes fongiques (18S) sur bactériens (16S) selon le type de butte, séparé par horizon et par année. ....	94

# 1 Introduction

---

Le système agricole est aujourd'hui confronté à de nombreux défis qui menacent sa durabilité et sa capacité à nourrir une population mondiale estimée à plus de 9,7 milliards d'habitants en 2050 (Du et al., 2024). L'agriculture conventionnelle a conduit à une dégradation alarmante des sols, principalement due à des pratiques intensives telles que la monoculture, l'utilisation excessive de produits chimiques et une gestion inadéquate des terres (FAO & ITPS, 2015). Environ 33 % des sols de la terre sont déjà dégradés, et ce chiffre pourrait dépasser 90 % d'ici 2050 si des mesures adéquates ne sont pas prises (FAO & ITPS, 2015). La perte de fertilité, l'érosion, la diminution de la matière organique et de la biodiversité des sols compromettent gravement leur capacité à rester productifs (Fiebrig et al., 2020; Giller et al., 2021). Réduire leur dégradation et restaurer les terres nécessitent des actions concrètes et urgentes qui contribueront à atténuer le changement climatique, à préserver les écosystèmes et la biodiversité (Keesstra et al., 2016).

La problématique est d'autant plus urgente dans les milieux urbains où la migration croissante des populations exerce une pression accrue en un même lieu, compliquant les demandes d'approvisionnement alimentaire et d'espaces verts, tout en générant de grandes quantités de déchets organiques (Fabbri et al., 2021). Il devient, dès lors, impératif de repenser notre approche de l'agriculture pour répondre aux besoins alimentaires croissants tout en préservant la santé des écosystèmes (Hunter et al., 2017).

Face à ces défis, des méthodes innovantes et durables d'utilisation des terres telles que les technosols, offrent une solution prometteuse. Les technosols construits sont des sols créés à partir de matériaux artificiels et naturels, conçus pour réhabiliter les terres polluées ou créer de nouveaux sols dans des environnements urbains ou inhospitaliers (Deeb et al., 2020). Les matériaux, généralement choisis en fonction de leur disponibilité locale, permettent de minimiser l'utilisation des ressources naturelles, tout en instaurant un cycle vertueux où les déchets deviennent une source de production alimentaire (Fabbri et al., 2021).

Toutefois, la création de technosols ne se limite pas à la gestion des matériaux : un aspect crucial est leur capacité à maintenir une fertilité et une qualité suffisantes pour soutenir la vie végétale (Fourvel et al., 2019). Les engrais synthétiques utilisés en grande quantité peuvent mener à la perte de la biodiversité et à la pollution de l'environnement. Il est dès lors préférable de les éviter dans des contextes d'agriculture urbaine ou de remédiation de sols pollués (Khangura et al., 2023). La composition de ces nouveaux technosols doit donc être capable de soutenir la croissance des plantes, du point de vue physico-chimique et biologique (Rokia et al., 2014).

Dans le même esprit de durabilité et d'innovation, des approches alternatives d'agriculture comme la permaculture viennent compléter les solutions offertes par les technosols. La permaculture est un système de conception écologique qui s'inspire des écosystèmes naturels pour créer des environnements agricoles durables et autosuffisants (Hazan et al., 2020). En combinant des pratiques respectueuses de l'environnement avec une gestion holistique des ressources, elle répond également aux défis liés à la fertilité et à la qualité des sols (Ferguson & Lovell, 2014; Morel et al., 2017).

Parmi les techniques de permaculture, les buttes permacoles se distinguent comme des technosols construits innovants. Ces monticules de terre sont enrichis de matière organique et conçus pour maximiser la fertilité du sol (de Tombeur et al., 2018), la conservation de l'eau (Hazan et al., 2020) et les services écosystémiques (Grard et al., 2017), tout en soutenant la production alimentaire.

Cependant, malgré un potentiel intéressant, peu de données existent sur leur évolution à long terme, ainsi que sur la qualité de leurs sols dans la littérature scientifique (Fiebrig et al., 2020).

Le présent mémoire a pour objectif l'étude de l'évolution de différents types de buttes avec des cultures légumières, sur une période de quatre ans, tout en se concentrant sur la qualité des sols. Il vise à combler les lacunes actuelles dans la littérature scientifique, à apporter des preuves tangibles des éventuels bénéfices des buttes permacoles, ainsi qu'à contribuer au développement de pratiques agricoles plus durables et résilientes.

Pour cela, quatre buttes différentes, ainsi qu'un témoin non butté, seront étudiées. Les analyses porteront sur le rendement de cinq cultures légumières ainsi que sur différents indicateurs de qualité du sol, concernant les propriétés physiques, chimiques et biologiques.

## 2 État de l'art

---

### 2.1 Le sol, une ressource précieuse

#### 2.1.1 L'homme et les sols

Le sol représente le fondement de toute vie sur terre, en fournissant une multitude de ressources cruciales. De la végétation qui alimente tant les êtres humains que les animaux, aux matériaux de construction comme le bois et les fibres textiles, en passant par les biocarburants, son importance est inestimable. Outre ces contributions directes, le sol joue un rôle essentiel dans la régulation des cycles de l'eau, du carbone, de l'azote et d'autres éléments (Van Breemen & Buurman, 2002). De plus, il influence la composition chimique de l'atmosphère, accueille 25% des espèces de notre planète (Lemanceau, 2020) et fournit des services culturels (esthétiques, récréatifs, éducatifs) (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

Le sol est un complexe vivant, qui est formé sous l'influence du matériel parent, des conditions climatiques et topographiques, des organismes biologiques et du temps (Van Breemen & Buurman, 2002). À ces éléments traditionnels s'ajoute désormais un sixième facteur, celui de l'activité anthropique (Dudal, 2004).

Depuis le Néolithique, l'homme interagit avec les sols de manière directe par le labour, la fertilisation ou le chaulage, et de manière indirecte en altérant les facteurs naturels de leur formation, à travers des pratiques telles que la déforestation, les modifications du relief et du régime hydrique, ainsi que l'exploitation de la tourbe et de la roche, ou encore à travers l'érosion qui en découle (Dudal, 2004). Les processus de formation des sols nécessitent plusieurs siècles voire millénaires, mais seulement quelques années de mauvaise gestion humaine suffisent à les détruire (Reece et al., 2012). Cette dégradation du sol est irréversible à l'échelle d'une vie humaine (Lemanceau, 2020). D'après la FAO, « 33 % des sols terrestres sont déjà dégradés et plus de 90 % pourraient l'être d'ici 2050 » (FAO et ITPS, 2015).

Les dégradations des sols sont causées non seulement par l'exploitation intensive des terres agricoles et la déforestation, mais aussi par les zones minières, les chantiers de construction, les sites industriels et les zones urbaines bétonnées. Cela entraîne la perte d'habitats et de biodiversité, l'érosion des sols, et la diminution de la résilience des écosystèmes et des services écosystémiques qu'ils fournissent, tout en mettant en danger la production alimentaire et énergétique mondiale (Fabbri et al., 2021).

En 2015, les États membres des Nations Unies ont adopté 17 objectifs de développement durable (ODD), appelant tous les pays à agir dans un partenariat mondial. Parmi ces objectifs, l'ODD 15 vise à « protéger et à restaurer les écosystèmes terrestres, gérer durablement les forêts, lutter contre la désertification, stopper et inverser la dégradation des sols et enrayer la perte de biodiversité » (Nations Unies, 2015).

Pour tenter de préserver les sols agricoles, de nombreuses techniques culturelles peuvent être mises en place, telles que l'agriculture de conservation, les couverts permanents, les rotations culturales et bien d'autres. Cependant, il est également nécessaire de comprendre et de régénérer les sols sévèrement dégradés, comme les anciennes mines et les sols urbanisés. D'après le programme des Nations unies pour l'environnement de 2022, 70% des surfaces continentales ont été altérées par les actions humaines (Cheval, 2023). Dans ce cadre, il est pertinent de se pencher plus spécifiquement sur les sols fortement altérés par l'homme, ainsi que la construction de nouveaux sols.

### 2.1.2 Les technosols

Depuis 2006, un nouveau type de sol a fait son apparition dans la base de référence mondiale pour les ressources en sols (WRB) : les technosols. Les technosols désignent les sols fortement dominés par l'origine technique (c'est-à-dire anthropique) de leurs constituants. Ils sont définis sur base de plusieurs critères : soit (1) d'une teneur en artéfacts de plus de 20% (matériel construit ou modifié par l'homme tel que des fragments de ferraille, verre, matériaux de construction) dans les 100 premiers centimètres du sol, soit (2) par la présence d'une géomembrane construite continue, légèrement perméable à imperméable commençant à  $\leq 100$  cm de la surface du sol, soit (3) par la présence de matériaux techniques durs (d'origine anthropique) à différentes profondeurs (Cheval, 2023; Grard, 2017; IUSS Working Group WRB, 2022).

Bien que l'introduction du terme technosols dans le WRB soit relativement récente, on trouve ces sols artificiels dans toutes les régions du monde où l'activité humaine a conduit à leur formation. L'étude des technosols se concentre souvent sur d'anciennes zones industrielles ou contaminées afin de comprendre leur pédogenèse et l'évolution de leur qualité, dans l'optique de les revaloriser (Ahirwal & Pandey, 2021; Napoletano et al., 2021; Ruiz et al., 2020). En plus des anciennes zones industrielles ou minières, une grande partie des technosols se retrouve en milieu urbain. Or, à l'horizon 2050, plus de 66 % de la population mondiale résidera dans des zones urbaines (Bas, 2024). Cette concentration de la population mène à de nouveaux défis, tels que l'accès à l'alimentation, la préservation de la qualité de l'air et de l'eau, la gestion des déchets, l'adaptation au changement climatique et bien d'autres.

Afin de répondre à ces défis, la recherche se penche sur les infrastructures vertes, qui sont définies comme la création d'éléments visant à préserver les valeurs et les fonctions des écosystèmes naturels tout en procurant des avantages aux populations humaines (Deeb et al., 2020; Nieuwenhuijsen, 2021).

Cependant, ces infrastructures nécessitent un support, le sol, qui dans les milieux urbains est souvent dégradé ou bétonné. De plus, les infrastructures vertes en milieu urbain peuvent entrer en concurrence face à l'utilisation des terres pour les usages résidentiels, commerciaux ou de services (Deeb et al., 2020). En outre, l'aménagement de nouveaux espaces verts requiert des ressources financières, de la main-d'œuvre et des matières premières telles que du sol, souvent prélevé et importé des zones agricoles, ce qui déplace simplement le problème. Pour surmonter ces obstacles, les technosols construits offrent une réponse prometteuse.

### 2.1.3 Les technosols construits

Les technosols construits (appelés « constructed technosols » dans la littérature scientifique) sont des sols qui sont construits par l'homme pour répondre à des besoins spécifiques, comme introduire une fonction ou des services écosystémiques particuliers (Cheval, 2023). À ce jour, il n'y a pas de définition universelle des technosols construits, et ils ne sont d'ailleurs pas repris dans la WRB 2022.

L'un des avantages clés des technosols construits réside dans la possibilité de sélectionner les matériaux à utiliser, leur agencement et leur quantité, afin de créer des sols parfaitement adaptés aux fonctions qu'ils doivent remplir. Cette approche doit tenir compte de tous les paramètres essentiels pour la croissance végétale, tels que la disponibilité en nutriments, la rétention en eau et la perméabilité, la compaction, une profondeur de sol suffisante, ainsi que les éléments chimiques nécessaires pour la végétation ciblée. Il faut également prêter attention aux concentrations en polluants si les matériaux utilisés en contiennent (Cheval, 2023; Deeb et al., 2020).

Les technosols construits sont composés de mélanges de déchets recyclés, organiques et minéraux, ainsi que de sous-produits urbains non valorisés, et visent à réhabiliter des sites contaminés et/ou créer de nouveaux sols en zone urbaine, sans recourir à l'importation de sols agricoles fertiles ni l'utilisation de nouvelles ressources (Fabbri et al., 2021). Dans la grande majorité des cas, les produits résiduels organiques sont présents dans de grandes proportions (Séré, 2018).

En effet, l'apport de composants organiques présente de nombreux avantages grâce à la restitution de matière organique, qui améliore les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Cette restitution favorise notamment le développement de micro-organismes qui accélèrent la minéralisation dès les premières étapes de la pédogenèse de ces nouveaux sols (Cheval, 2023). Parmi ces matériaux organiques, on retrouve le fumier, le compost, les déchets verts, les résidus de bois et de cultures, les boues des usines de pâte et papier, ainsi que les déchets de transformation alimentaire. L'ajout massif de ces amendements organiques peut favoriser la réhabilitation initiale du sol en zone verte et mener à un écosystème stable (Fabbri et al., 2021). De plus, ces matériaux organiques sont souvent considérés comme des déchets, et leur réutilisation permet d'éviter les coûts liés à leur élimination, favorisant une économie circulaire et durable. Cette solution est particulièrement pertinente dans les grandes villes, où l'accumulation rapide de déchets organiques (résidus de parcs et de jardins) est courante (Grard et al., 2017). Il y a cependant des désavantages à l'utilisation de ces matériaux, tels que le rétrécissement du substrat, le risque de perte de nutriments par lixiviation, les émissions de dioxyde de carbone par la respiration du substrat et l'accumulation potentielle de polluants si les matériaux utilisés sont pollués (Grard et al., 2017).

Bien qu'il soit difficile de catégoriser la pédogenèse des technosols construits en raison de la grande diversité de leurs constituants, il est observé que leur évolution est similaire à celle des sols naturels, mais se déroule beaucoup plus rapidement. Alors que les sols naturels mettent plusieurs décennies, voire des siècles à se former, l'évolution des propriétés des technosols construits peut être observée en seulement une décennie. L'influence des matériaux parentaux des technosols tend à diminuer avec le temps, ce qui peut entraîner leur évolution vers d'autres groupes de sols en fonction des processus dominants (Huot et al., 2015).

Dans le cadre de ce travail, de nouveaux sols construits à partir de matières végétales, de compost et de terre seront étudiés. Ces sols ne rentrent pas dans une catégorie de sols précis ; ils ne possèdent pas les critères requis pour être considérés comme des technosols, cités plus haut, ni les critères pour être des anthrosols. Les anthrosols, également appelés anthroposols selon le Référentiel pédologique français, désignent des sols profondément modifiés suite à une utilisation agricole prolongée et intensive et par des interventions visant à améliorer leur fertilité (IUSS Working Group WRB, 2022). Cependant, on retrouve dans les anthroposols la sous-catégorie des anthroposols construits, définis comme « issus des opérations de génie pédologique : actes volontaires de fabrication d'un sol avec des objectifs précis, en particulier pour obtenir un milieu aussi fertile que possible dans le cadre d'opérations de végétalisation » (AFES, 2008). Les sols de ce travail se situent donc dans les anthroposols construits, cependant, dans la littérature scientifique, on retrouve des sols similaires sous le terme « constructed technosols », c'est donc sous ce nom-là que les sols seront appelés.

## 2.2 La permaculture

### 2.2.1 Introduction

La permaculture (contraction de *permanent agriculture*), développée par David Holmgren et Bill Mollison dans les années 70, est d'abord une approche agricole qui tire son inspiration de la nature pour créer des systèmes agricoles performants, durables et résilients (Youmatter, 2018). Masanobu Fukuoka, précurseur de l'agriculture naturelle et auteur du livre "La Révolution d'un seul brin de paille" publié en 1975, préconisant l'absence totale d'engrais, de désherbants et de labour, a inspiré les concepteurs de la permaculture.

Depuis, elle est devenue à la fois une science et un art visant à créer des écosystèmes régénératifs inspirés par le fonctionnement du vivant et en harmonie avec celui-ci. Elle combine une éthique, des principes et des outils méthodologiques pour concevoir divers systèmes, allant de petits potagers familiaux jusqu'à des aménagements de fermes moyennes, en favorisant la diversité, la résilience et la productivité. En plus d'être une méthode de conception, la permaculture est un mouvement social à la croisée de la science, de la technique et de la politique, promouvant une société harmonieuse et durable à travers trois principes éthiques : prendre soin de la terre, prendre soin des humains et favoriser le partage équitable des ressources (Centemeri, 2023; Ferguson & Lovell, 2014).

De même que l'agroécologie, la permaculture englobe la production agricole, l'écologie et la transition agroécologique, notamment à travers des mouvements populaires principalement constitués d'utilisateurs de la terre. Ce mouvement éducatif, qui tend à diffuser et rendre accessible les principes scientifiques fondamentaux sur le fonctionnement des écosystèmes, s'est propagé à l'échelle mondiale (Centemeri, 2023). En effet, l'inquiétude face aux impacts socio-environnementaux de l'urbanisation, de l'agriculture industrielle, ainsi que de l'extraction et de l'épuisement des ressources n'a cessé de croître au cours des dernières décennies. La permaculture offre des outils et techniques afin de contrer ces problématiques, permettant aux individus d'agir à leur échelle.

Malgré une popularité croissante, la permaculture est très peu représentée dans le milieu scientifique. Cela s'explique par sa définition floue qui entraîne la confusion et entrave une recherche systématique rigoureuse. De plus, dans une optique de vulgarisation à grande échelle, de nombreuses affirmations sont exagérées ou simplifiées à l'excès par les adeptes du mouvement (Ferguson & Lovell, 2014).

Parmi les nombreuses techniques proposées par les adeptes de la permaculture, on retrouve les buttes permacoles. Ces dernières sont présentées comme productives, intégrées au cycle naturel grâce à l'utilisation de déchets végétaux et respectueuses de la vie du sol puisqu'elles ne nécessitent pas de labour ni de fertilisation minérale. Ces pratiques sont en accord avec les principes actuels de la permaculture et répondent aux enjeux environnementaux contemporains.

### 2.2.2 Les buttes permacoles

La culture sur buttes surélevées, ou « Hügelkultur » en allemand, signifiant « culture sur butte », remonte au Moyen Âge où les agriculteurs allemands l'utilisaient pour améliorer le drainage et la fertilité de leurs sols (Olle Gardens, 2022). Cette technique a été popularisée par Sepp Holzer, fermier et permaculteur autrichien, dans les années 2000 (Laffoon, 2016). Bien que largement adoptées dans les pratiques de permaculture actuelles, les buttes auraient été intégrées à la permaculture de manière fortuite lors des visites du jardin d'Emilia Hazelip, l'une des pionnières de cette discipline, dans les années 1980.

Son jardin en butte servait alors de support pour illustrer les principes de la permaculture lors de ses stages (Domenech, 2015). Incontournables pour certains, aberrantes pour d'autres (Domenech, 2015; Gatineau, 2022), elles suscitent de vifs débats sur les réseaux sociaux, tandis que la littérature scientifique à leur sujet est quasiment inexistante (Laffoon, 2016). Cette absence de recherches approfondies souligne l'importance d'examiner plus rigoureusement la culture sur buttes surélevées pour démêler les faits des conjectures et enrichir les connaissances scientifiques sur ce sujet polarisé.

La composition des buttes peut inclure des troncs d'arbres, des branchages broyés ou non, de l'herbe tondue, des déchets organiques, du compost, et, en somme, tous les déchets végétaux qui seraient autrement jetés. Souvent, un paillage est ajouté par-dessus pour limiter l'évaporation et enrichir le sol. Une préférence est accordée à des matériaux plus gros, permettant de réduire le tassement, d'augmenter l'aération et d'éviter l'acidification ; par exemple, une bûche de bois est préférée à des copeaux. Les buttes peuvent être à même le sol ou entourées par un support, tel qu'un bac en bois, des plots en béton, des tuiles, ou des ballots de paille. Leur forme varie du rectangle classique à des demi-lunes, des cercles ou des formes de cratère (Holzer, 2011). La taille des buttes peut aller d'une quinzaine de centimètres jusqu'à plus d'un mètre cinquante de hauteur. Selon l'orientation de la butte, la distribution des paramètres climatiques tels que la température, l'humidité, l'exposition au vent et au soleil peut varier, donnant lieu à une diversité de microclimats sur une même butte.

La composition riche en matière organique des buttes permettrait de relâcher progressivement les nutriments essentiels aux plantes, tout en absorbant l'eau comme une éponge, et en maintenant une aération suffisante et un bon drainage. Le processus de décomposition de la matière organique par les macro et micro-organismes réchaufferait naturellement le sol, ce qui est bénéfique à la germination et à la croissance des plantes. De plus, le sommet des buttes se réchaufferait et s'assècherait plus rapidement, prolongeant ainsi la saison de culture (Collie, 2024; Holzer, 2011). Enfin, les buttes permacoles permettraient de bloquer le ruissellement, limitant ainsi l'érosion, et stockeraient du carbone dans le sol, qui autrement serait libéré dans l'atmosphère.

Malgré les théories affirmant que la composition des buttes permacoles permettrait de relarguer les éléments minéraux au fil du temps et d'assurer une fertilité sur le long terme sans apport supplémentaire de fertilisants, aucun consensus n'existe quant à la durée de cette auto-fertilité. Les sources bibliographiques mentionnent de 5 (Bogdanowicz, 2017) à plus de 10 ans (Holzer, 2011) selon leurs compositions.

En résumé, les buttes de permaculture sont décrites comme des espaces de culture surélevés qui optimisent l'utilisation de l'espace, améliorent le drainage, aèrent le sol et contiennent diverses matières organiques fournissant des nutriments aux plantes à mesure que la matière organique se décompose. Leur principal avantage résiderait dans leur autonomie en ce qui concerne la fertilité, l'irrigation et le travail du sol (Meyer, 2020), tout en offrant des rendements supérieurs et une bonne santé des plantes (Collie, 2024). Ces buttes seraient particulièrement utiles dans les petits espaces d'agriculture urbaine hors sol, pour la remédiation des sols pollués ou lorsque les sols sont peu profonds ou très compactés. Elles permettraient également de soulager les personnes souffrant de maux de dos ou ayant des handicaps moteurs (Nolan, 2016).

### 2.2.3 Les différents types de buttes existantes

Plusieurs types de buttes reviennent sur le devant de la scène, chacune portée par un précurseur de la permaculture, ou redécouvert par l'un d'eux.



La butte en terre, introduite par Emilia Hazelip et inspirée par les travaux de Masanobu Fukuoka, se caractérise par l'utilisation de terre buttée, recouverte d'un paillage conséquent composé de paille ou de végétaux. Ce paillage vise à réduire l'évaporation et à limiter le développement des adventices, tout en améliorant la vie du sol grâce à l'apport de matière organique et au non-travail du sol. Cependant, l'efficacité de cette technique dépend fortement de la qualité initiale du sol (Abéguilé, 2020).

La butte sandwich, ou butte Robert Morez, du nom de son créateur, est composée principalement de matières organiques difficilement utilisables par une agriculture classique (branches, broussailles, ronces, épineux, feuilles, écorces). Elle possède également une couche plus fine de matières azotées (Figure 1). La butte est ensuite recouverte de compost et de terre. Des petits fagots de bois peuvent être introduits verticalement afin d'améliorer la pénétration de l'eau. La butte sandwich favoriserait une décomposition lente, mais régulière de ses éléments constitutifs, ce qui conduirait à la formation d'un sol fertile pendant une période allant de 2 à 4 ans, tout en réduisant les besoins en irrigation et en augmentant la productivité de 50% (Foudral, 2011; Morez, 2018). La première année donnerait des rendements élevés (Hoffmann, 2018).

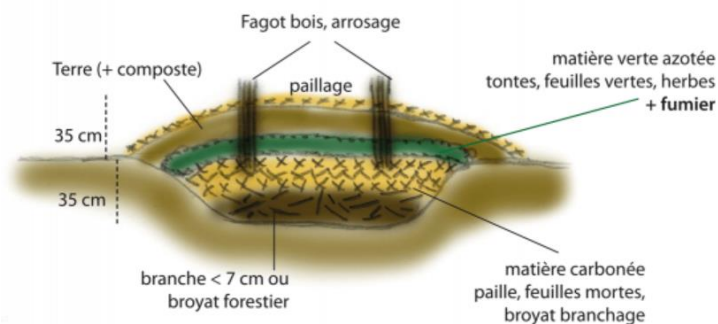


Figure 1 : Schéma de la butte sandwich ou Morez (Hoffmann, 2018).

La butte lasagne est constituée d'une alternance de couches riches en carbone (telles que la paille, les feuilles mortes et le bois raméal fragmenté - BRF) et d'éléments riches en azote (comme la tonte de pelouse, les déchets de cuisine et les feuilles vertes) (Figure 2). Ces couches sont ensuite recouvertes d'une couche de terre ou de compost (Foudral, 2011). Cette méthode présente l'avantage de créer un sol fertile rapidement grâce à la décomposition accélérée des matériaux organiques. Cependant, la butte se tasse vite et nécessite d'être reconstituée chaque année pour maintenir sa structure et sa fertilité (Hoffmann, 2018; Kadijevic, 2024).

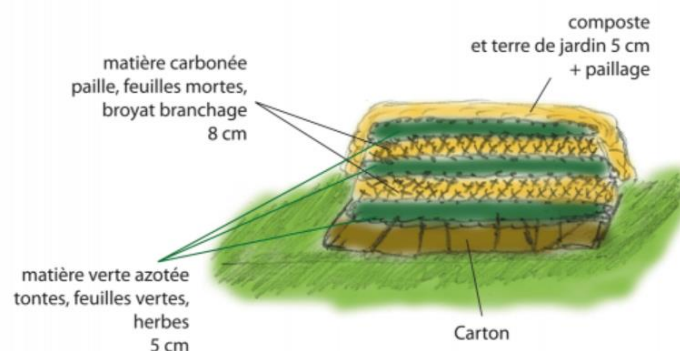


Figure 2 : Schéma de la butte lasagne (Hoffmann, 2018).

La butte forestière, parfois désignée sous le nom « Hügelkultur », a été popularisée par Sepp Holzer (Figure 3). Cette butte repose sur l'utilisation de troncs d'arbres en décomposition, conférant une fertilité à long terme pouvant atteindre jusqu'à 20 ans selon les auteurs grâce à la libération progressive d'éléments minéraux au cours de la décomposition. Pour minimiser le risque de faim d'azote, une couche de matière verte riche en azote peut être ajoutée au-dessus des troncs, suivie d'une couche de terre ou de compost (Foudral, 2011; Hoffmann, 2018).

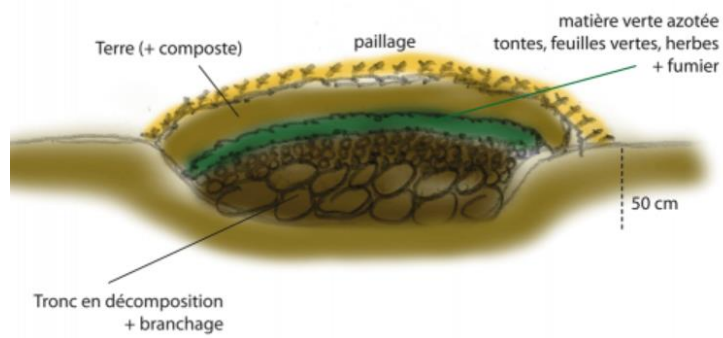


Figure 3 : Schéma de la butte forestière (Hoffmann, 2018).

## 2.3 La qualité des sols

### 2.3.1 Définition des concepts de fertilité et de qualité des sols

D'après la FAO (2024), la fertilité du sol désigne la capacité d'un sol à soutenir la croissance des plantes en leur fournissant les nutriments essentiels et en offrant des caractéristiques chimiques, physiques et biologiques propices à leur développement. La fertilité du sol peut être liée au rendement obtenu. Cependant, le concept de fertilité est contesté, car il représente un potentiel à un moment donné et dans des conditions de culture spécifiques. De plus, il est difficilement mesurable en raison des variations des facteurs pris en compte selon les différentes définitions (Patzel et al., 2000).

Pour ces raisons, certains agronomes préfèrent utiliser le terme "qualité des sols", qui englobe non seulement la fertilité du sol, mais également d'autres indicateurs, comme la structure, la texture et la vie du sol. Ce concept permet d'évaluer la capacité du sol à fonctionner dans les limites de l'écosystème pour soutenir la productivité biologique, maintenir la qualité de l'environnement et promouvoir la santé des plantes et des animaux (Karlen et al., 1997). La gestion du sol, la matière organique et la biologie du sol jouent un rôle majeur dans la qualité du sol (Genot et al., 2009).

Surveiller la qualité du sol au fil du temps permet d'évaluer les effets des pratiques culturales, d'identifier les impacts négatifs et d'ajuster les stratégies de gestion. Cette approche est essentielle, notamment dans le cas de pratiques agricoles intensives, afin de maintenir et améliorer la qualité des sols sur le long terme (Gayan et al., 2020).

### 2.3.2 La matière organique du sol : dynamique et impact sur les propriétés du sol

La matière organique (MO) est produite par les êtres vivants et est composée de différents éléments comme de la biomasse animale, végétale et microbienne, morte ou vivante, et des éléments décomposés tels que la lignine, la cellulose ou des protéines et l'humus, qui est le produit final de la décomposition des éléments organiques (Fenton et al., 2008; Swift, 1996). Elle est régulièrement accumulée puis décomposée, ce qui entraîne des fluctuations du taux de carbone dans les sols et l'atmosphère (Genot et al., 2012). En effet, la MO est composée en majorité de carbone, son taux est calculé sur base de la teneur en carbone organique multiplié par 1,72 (Arvalis, 2022). Lors de sa décomposition, le carbone se retrouve libéré dans l'air sous forme de CO<sub>2</sub> et il peut ensuite être recapturé par les plantes lors de la photosynthèse.

En moyenne, les sols agricoles contiennent entre 3 et 6% de MO dans les horizons superficiels, et ce taux diminue avec la profondeur (Fenton et al., 2008). La quantité de MO dans les sols agricoles dépend notamment, de l'apport en amendements organiques ou en compost, des résidus de cultures et de l'installation de cultures de couvertures (Cotrufo & Lavelle, 2022; Fenton et al., 2008).

#### 2.3.2.1 La décomposition de la matière organique

La décomposition de la MO dépend de divers facteurs tels que :

- sa composition : ses propriétés biochimiques et son état physique
- l'environnement du sol : la température, l'humidité, le pH, la présence-ou non d'oxygène et la communauté microbienne présente (Chartin et al., 2015; Grosbellet, 2008)

Ces facteurs jouent sur l'activité des organismes décomposeurs, provoquant une décomposition discontinue. La disponibilité en azote est un facteur limitant, car il est indispensable pour la synthèse des protéines et d'autres composés cellulaires essentiels. Un rapport carbone/azote (C/N) élevé dans la matière organique ralentit l'activité biologique, car les micro-organismes tendent à immobiliser l'azote disponible dans le sol, le rendant ainsi inaccessible aux plantes. Ce phénomène est connu sous le nom de « faim d'azote » (Passicouset et al., 2021; Sierra & Desfontaines, 2018). Un autre facteur limitant est le contenu en lignine, qui est difficilement décomposable et ralentit la vitesse de décomposition (Cotrufo et al., 2022). Ainsi, les cycles du carbone et de l'azote sont directement liés, par leurs effets sur les réactions biochimiques, sur la production primaire, la respiration et la décomposition (Finzi et al., 2011). De plus, une inhibition physiologique microbienne sera induite lors de températures fraîches ou en cas de manque d'oxygène (Cotrufo et al., 2022).

La macrofaune et la mésofaune, en tant que décomposeurs primaires, vont fragmenter la litière végétale et autres résidus organiques, permettant ensuite aux décomposeurs secondaires (bactéries et champignons), communément appelés « biomasse microbienne », de continuer la dégradation par minéralisation et humification (Amin, 2012).

Comme l'illustre la Figure 4, de multiples processus entrent en jeu lors de la décomposition de la MO. Ils sont décrits dans les paragraphes suivants.

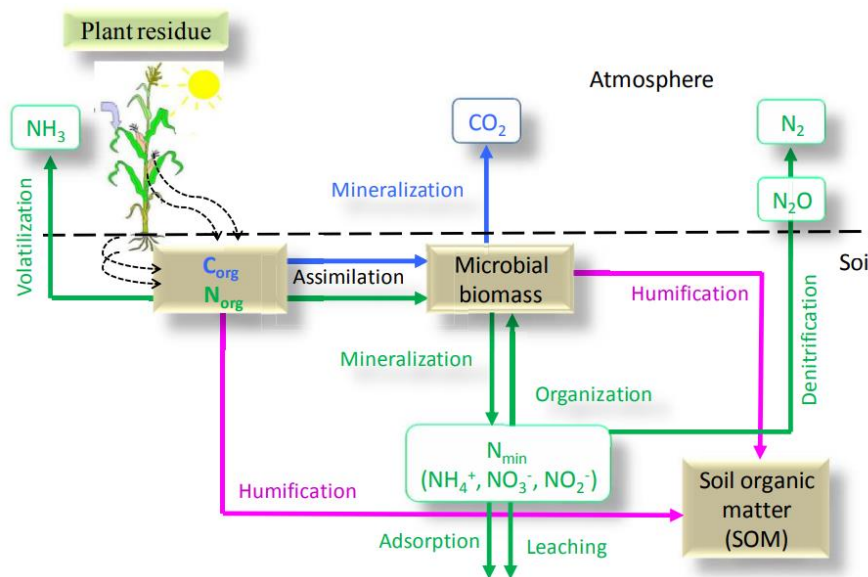


Figure 4 : Représentation schématique des flux d'azote et de carbone dans le sol (Amin, 2012).

### 2.3.2.2 La minéralisation

La minéralisation est un processus de décomposition par l'oxydation de la MO via des micro-organismes hétérotrophes qui utilisent la MO comme source d'énergie (Lehmann et al., 2015). Cette transformation est cruciale pour la minéralisation des éléments essentiels tels que l'azote, le carbone, le phosphore et le soufre, rendant ces éléments dissous disponibles pour l'absorption racinaire (Amin, 2012; Genot et al., 2009). Le cycle du carbone est étroitement lié à celui de l'azote, en raison de l'application simultanée de ces éléments dans la MO, ainsi que dans les cycles de croissance des plantes et de dégradation par les micro-organismes (Amin, 2012).

### 2.3.2.3 L'humification

Lors de la dégradation des matières végétales, la réduction de la taille des molécules entraîne une augmentation des groupes polaires et ionisables, améliorant ainsi leur solubilité dans l'eau. Parallèlement, la protection contre une dégradation ultérieure est renforcée par une réactivité accrue avec les surfaces minérales et l'incorporation dans les agrégats. Ce processus permet à la MO décomposée de s'adsorber sur les surfaces minérales et de s'intégrer dans les agrégats du sol, offrant une protection temporaire. À terme, les substances humiques stables finissent par être minéralisées (Lehmann et al., 2015). Cependant, des incertitudes subsistent quant au processus d'humification, à son existence éventuelle, ainsi qu'à la nature et à la dégradation des matériaux humiques, en grande partie en raison du manque de méthodes efficaces pour les quantifier et de leur composition extrêmement variable, qualifiée de mélange complexe de biopolymères microbiens et végétaux avec leurs produits de dégradation (Garcia et al., 2018; Lehmann & Kleber, 2015).

### 2.3.2.4 Les rôles de la matière organique

Les rôles de la MO dans les sols sont nombreux. Premièrement, elle contribue à la formation d'une structure de sol favorable pour les plantes en améliorant la stabilité et la cohésion des agrégats, ce qui se traduit par une meilleure infiltration de l'eau, une porosité accrue, une aération améliorée, et une réduction du ruissellement et de l'érosion (Commission Européenne, 2002; Genot et al., 2009; Mustin, 1987). De plus, la MO intervient dans l'adsorption de polluants organiques peu solubles (Pignatello, 1998) ainsi que la sorption de pesticides, influençant leur disponibilité et leur mobilité dans l'environnement (Sadegh-Zadeh et al., 2017). Enfin, la MO constitue également un réservoir majeur de carbone, jouant un rôle essentiel dans le cycle global du carbone (Richardson et al., 2019).

La dégradation de la MO contribue à la rétention et la mise à disposition d'éléments nutritifs pour les plantes lors de la minéralisation (Gerke, 2022; Lehmann & Kleber, 2015)). En effet, les charges négatives à la surface du complexe argilo-humique, une structure résultant de l'association de particules d'argile et de MO stable, permettent l'échange et la rétention des cations présents dans la solution du sol par adsorption.

Par ailleurs, la MO constitue une source d'énergie essentielle pour la biomasse microbienne du sol, qui joue un rôle clé dans le cycle des nutriments, la structuration du sol et de nombreux autres services écologiques (Kaviya et al., 2019).

Pour évoluer vers un système de gestion des sols agricoles plus responsable, il est essentiel de quantifier la qualité des sols en relation avec les pratiques culturales. À cette fin, des indicateurs de qualité sont utilisés pour refléter la santé des sols, incluant l'activité microbienne, la biodiversité des sols et la disponibilité des nutriments essentiels. De plus, les facteurs favorables à la croissance des plantes, englobant des aspects physiques, chimiques et biologiques, sont également considérés comme des indicateurs de qualité (Genot et al., 2009; Thibault & Lecompte, 2018).

## 2.4 Évaluation de la qualité d'un sol

La qualité des sols n'est pas directement mesurable et demeure une évaluation qualitative et fonctionnelle. Pour se rapprocher d'une évaluation précise, divers indicateurs de qualité des sols (IQS) existent, fournissant des informations sur les propriétés, les processus et les caractéristiques du sol. Ces indicateurs permettent de suivre l'évolution de la qualité du sol au fil du temps, en observant l'impact des pratiques culturales (Estrada-Herrera et al., 2017; Thibault & Lecompte, 2018). Les indicateurs définis ci-dessous se limitent à ceux utilisés pour ce travail, mais ils ne sont pas exhaustifs.

### 2.4.1 Indicateurs chimiques

Le premier indicateur couramment utilisé est la teneur en éléments nutritifs, indispensables à la croissance des plantes et présents dans l'air, l'eau et le sol. Chaque élément joue un rôle spécifique dans les processus biologiques et physiologiques des plantes (Hodges, 2010). On peut distinguer les éléments non-minéraux (C,O,H) présents dans l'air et l'eau, des éléments minéraux, qui sont classés en deux catégories : les macronutriments (N,P, K, Ca, Mg, S) nécessaires en grandes proportions, des micronutriments (Fe, Mn, Cu, Zn, etc.) nécessaires en quantités plus réduites. Ces éléments ne sont prélevables par les plantes que dans le sol, sous forme minérale. L'ensemble des éléments essentiels doit être continuellement disponible pour soutenir la production de biomasse par la photosynthèse et d'autres voies métaboliques. Si l'un de ces éléments manque, la croissance de la plante sera limitée, voire arrêtée. Le principe des facteurs limitants stipule que le niveau de production ne peut excéder celui permis par le facteur de croissance des plantes le plus limitant (Hodges, 2010). La disponibilité de ces éléments peut être mesurée dans la solution du sol (Thibault et al., 2018) ou sur le complexe absorbant du sol, sous forme de cations.

Le pH est un autre indicateur intéressant. Le pH mesure la quantité d'ions  $H^+$  dans la solution du sol, ce qui reflète son statut acido-basique. Il reflète également les conditions physico-chimiques (Genot et al., 2012), influençant la disponibilité des éléments nutritifs. Chaque élément a une gamme de pH optimale autour de laquelle il est le plus facilement disponible pour les plantes (Genot et al., 2009). De plus, le pH affecte la fixation des éléments nutritifs par le complexe argilo-humique, où les ions  $H^+$  peuvent être échangés contre des cations, les rendant ainsi accessibles aux plantes (Reece et al., 2011). Pour les grandes cultures, un pH idéal se situe généralement entre 6 et 7, bien que cette valeur puisse varier avec le temps et selon le climat. Un pH trop acide solubilise les ions aluminium ( $Al^{3+}$ ), qui sont toxiques pour les plantes (Reece et al., 2011) tout en augmentant la disponibilité des cations nutritifs dans la solution du sol, ce qui les rend vulnérables à la lixiviation. L'activité microbienne dépend également du pH, notamment pour les processus de minéralisation et humification (Genot et al., 2012). La gamme idéale de pH pour les bactéries se situe entre 6 et 8 tandis que pour les champignons, elle peut varier de 5 à 8,5 (Mustin, 1987).

La teneur en carbone organique total (COT) permet d'estimer la teneur en MO dans les sols agricoles (SPW, 2020; Trigalet et al., 2017). En effet, la MO est composée d'environ 58% de carbone, qui peut varier selon les conditions édaphiques. Comme mentionné précédemment, la MO est un indicateur important pour la qualité des sols. Les sols ayant une COT inférieure à 20 gC/kg présentent une sensibilité accrue à l'érosion. En Wallonie entre 2015 et 2019, 90% des sols prélevés étaient en dessous de ce seuil (SPW, 2020).

Enfin, le carbone et l'azote interviennent dans l'état qualitatif de la MO au travers du rapport C/N. Celui-ci indique les conditions de minéralisation de la MO dans le sol ainsi que de son état de dégradation (Genot et al., 2012). Ce rapport est calculé à partir des teneurs en carbone organique et en azote total du sol. Les MO avec un rapport C/N élevé seront plus difficiles à décomposer en raison d'une proportion élevée de carbone par rapport à l'azote (Amin, 2012), limitant ainsi la disponibilité d'azote nécessaire aux micro-organismes pour former leurs protéines. En cas de pénurie d'azote, il y a une compétition accrue pour cet élément, ce qui peut immobiliser l'azote disponible, empêchant les plantes de l'absorber (Hodges, 2010). En général, plus le matériel végétal est immature, plus le rapport C/N est faible, plus il sera vite dégradé et inversement. Le rapport tend à diminuer avec la décomposition de la MO, car les micro-organismes libèrent plus de carbone, sous forme de CO<sub>2</sub> que d'azote. Le rapport optimal de C/N pour un sol se trouve autour de 10 (Thibault et al., 2018).

#### 2.4.2 Indicateurs physiques

Dans ce travail, seule l'humidité du sol sera abordée comme indicateur physique, bien qu'il en existe de nombreux autres comme la texture, la teneur en eau du sol, la porosité, la stabilité des agrégats, la densité apparente, etc. (Schoenholtz et al., 2000). L'humidité du sol est importante dans la fertilité du sol, car la disponibilité en eau est souvent ce qui limite la croissance végétale (Reece et al., 2011). De plus, l'humidité du sol exerce une forte influence sur l'activité microbienne (Lisetskii et al., 2018) ainsi que sur la composition des communautés microbiennes (Romanowicz et al., 2016).

#### 2.4.3 Indicateurs biologiques

Les indicateurs biologiques se concentrent sur l'étude de la vie du sol à travers l'analyse de la quantité, la diversité et l'activité des (micro)organismes présents. Selon les concepts de qualité des sols, un sol considéré comme sain soutient des niveaux élevés de diversité et d'activité biologiques, favorisant ainsi le cycle interne des nutriments et la résilience face aux perturbations (Sharma et al., 2010). Ces indicateurs permettent de mesurer la qualité du sol en fournissant des informations cruciales sur sa capacité à maintenir des écosystèmes fonctionnels et productifs (Gayan et al., 2020).

Comme mentionné précédemment, les micro-organismes de la rhizosphère peuvent influencer la croissance et la santé des plantes par la minéralisation des nutriments et la fixation de l'azote (Zhang et al., 2012). En outre, ils améliorent aussi la structure du sol, notamment par la production d'exsudats qui renforcent la cohésion et la stabilité des agrégats (Cosentino, 2006). L'ajout de MO stimule l'activité microbienne (Hodges, 2010; Sharma et al., 2010) laquelle est influencée par des facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité du sol (Chartin et al., 2015). Malgré ces connaissances, de nombreux aspects restent encore à découvrir, notamment les relations entre les souches microbiennes spécifiques et leur rôle prépondérant dans la nutrition des plantes, ainsi que l'impact de la disponibilité des nutriments sur la composition du microbiome de la rhizosphère (Jacoby et al., 2017).

Bien que la relation entre la qualité des sols et la diversité microbienne ne soit pas entièrement comprise, une diversité moyenne à élevée dans les sols agricoles est généralement considérée comme un indicateur de bonne qualité de sol (Sharma et al., 2010). La diversité microbienne évalue la proportion de populations bactériennes et fongiques dans le sol.

Certaines études ont établi des liens entre la structure des communautés microbiennes et le fonctionnement du sol, mais ces changements fonctionnels sont souvent associés à des espèces clés plutôt qu'à la richesse globale.

L'activité microbienne dans le sol peut être exprimée par la respiration des micro-organismes (approximation du taux de minéralisation du carbone) ainsi que par leur activité enzymatique. Selon Zhang et al. (2012), la respiration du sol est un indicateur représentatif et proportionnel de l'activité des micro-organismes aérobies. Une respiration élevée peut témoigner d'une activité intense du sol. Elle se mesure par la quantité de CO<sub>2</sub> émis lors de la décomposition et la minéralisation du carbone organique par la biomasse microbienne du sol (Thibault et al., 2018). Parallèlement, la mesure de l'activité de certaines enzymes permet de quantifier la présence et l'activité des micro-organismes dans le sol. Différentes enzymes peuvent être ciblées, celles-ci jouant un rôle central dans la facilitation du cycle des nutriments des écosystèmes terrestres (Steinweg & McMahon, 2012).



## 3 Matériel et méthodes

---

### 3.1 Localisation de l'essai

L'essai se déroule dans les jardins TERRA-Terre, faisant partie de la plateforme WASABI (Wallonne de Systèmes innovants en Agriculture et Biodiversité urbaine), implantée sur le campus de Gembloux Agro-Bio Tech de l'Université de Liège (50°33'48.2"N 4°41'58.3"E). Lancé en 2021 avec comme objectif d'évaluer l'évolution de la qualité du sol de différents types de buttes permacoles, cet essai s'étend sur une superficie d'environ 600 m<sup>2</sup>.

### 3.2 Conditions climatiques

Selon les valeurs moyennes de l'Institut Royal Météorologique (IRM) pour la période 1991-2020, les précipitations annuelles moyennes à Gembloux s'élèvent à 793,4 mm, tandis que la température annuelle moyenne est de 10,2°C. Les vents dominants proviennent du sud-ouest (IRM, 2024).

De janvier à juillet 2024, les conditions météorologiques ont été exceptionnellement pluvieuses et fraîches, avec un total de 567,4 mm de précipitations, comparé à la moyenne de 377,1 mm enregistrée à la station météorologique d'Uccle (IRM, 2024). Le mois de juin 2024 a marqué le neuvième mois consécutif de précipitations supérieures à la moyenne, établissant un nouveau record historique depuis 1905 (IRM, 2024). Ces conditions météorologiques ont eu un impact significatif sur la croissance des cultures ainsi que sur les populations de ravageurs, notamment les limaces.

### 3.3 Modalités étudiées

Afin d'évaluer le rendement et les propriétés physico-chimiques et biologiques de différents types de buttes, cinq modalités ont été mises en place. Nous avons la butte sandwich (S), la butte lasagne (L), la butte forestière (F), la butte en terre (T) et un témoin non butté (Z). Chaque modalité a été construite dans un bac en bois de robinier sans fond, de 4,20 mètres de long, 1,20 mètre de large et 0,60 mètre de haut.

Les compositions des buttes varient en fonction du type et de la disposition de la matière végétale utilisée, collectée dans les environs de la plateforme maraîchère WASABI. Le détail de la composition des buttes se trouve dans la figure ci-dessous (Figure 5). Chaque butte est composée d'une couche de terre de fond et de terre de surface (de texture limoneuse), qui proviennent du site où sont implantées les buttes. Une couche de lombricompost et un paillage en miscanthus ont été placés la première année.

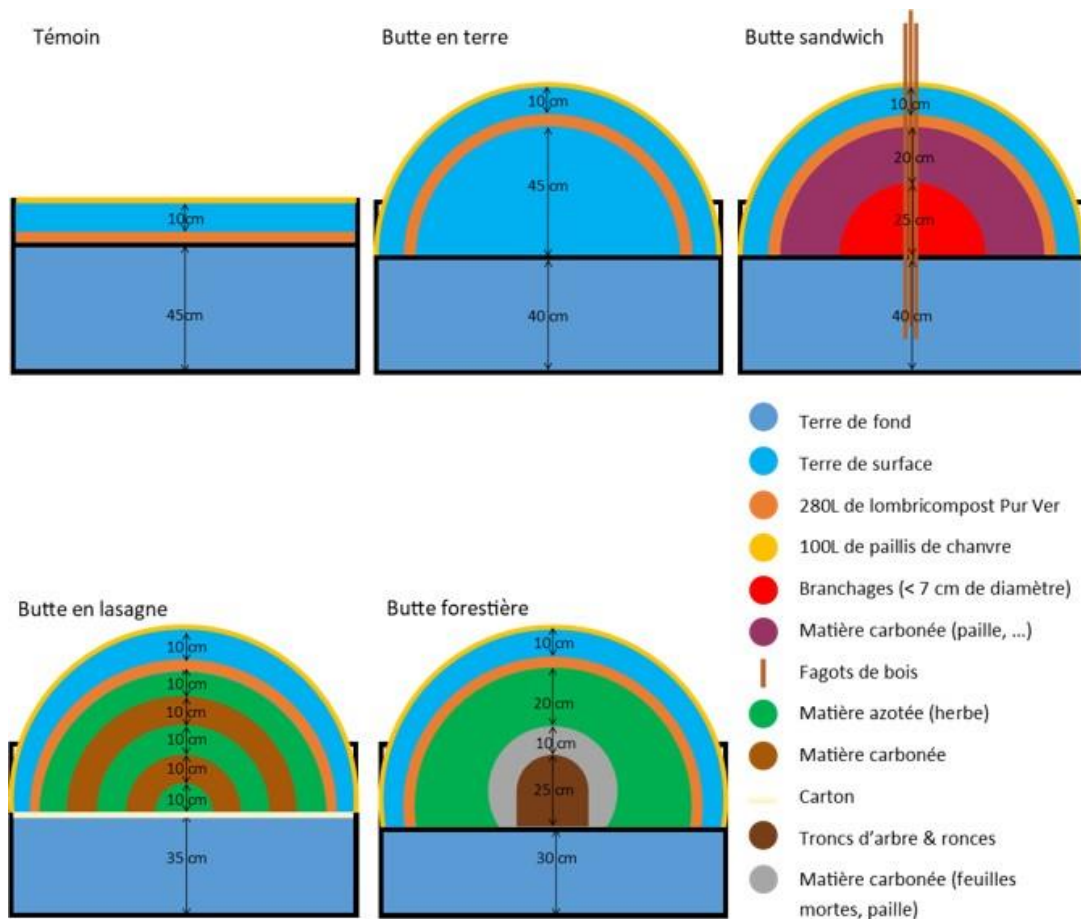


Figure 5 : Composition des différents types de buttes en coupe transversale (Jacques, 2021).

Le paillage, initialement employé pour conserver l'humidité du sol, a été retiré cette année. L'objectif de l'étude est de suivre l'évolution de la fertilité des buttes, cependant l'apport de paillage introduisait une nouvelle source de matière organique, ce qui s'opposait à l'objectif final. Pour remédier à l'exposition du sol durant les périodes de non-culture, une deuxième rotation sera mise en place à l'été 2024, succédant aux cultures implantées dans le cadre de ce mémoire.

### 3.4 Dispositif expérimental

L'essai est subdivisé en 3 blocs aléatoires, reprenant chacun les 5 modalités (F, L, S, T, Z), répétées trois fois au sein de chaque bloc. Chaque butte est nommée par une lettre ainsi qu'un numéro, les buttes de même modalité et de même bloc partagent la même lettre (A1, A2, A3). Il y a 45 buttes au total, possédant chacune un identifiant supplémentaire relatif à leur date de mise en place. En effet, toutes les buttes n'ont pas été mises en place au même moment, pour certaines c'était entre mai et août 2020 « avs2020 », certaines entre septembre et décembre 2020 « aps 2020 » et d'autres entre mars à mai 2021 « avs2021 » (Figure 6). Fin 2023, une couche azotée (tonte de pelouse), une couche carbonée (paille) et de la terre provenant du site de l'essai ont été remises sur les buttes lasagnes, celles-ci s'étant trop affaissées au point de ne plus avoir une forme de butte.

Chaque année, différentes buttes ont été sélectionnées pour les prélèvements, certaines buttes n'ont jamais été échantillonnées tandis que d'autres l'ont été à plusieurs reprises. Afin d'homogénéiser les prélèvements, toutes les buttes seront prélevées cette année. Un échantillon composite, comprenant un mélange des 3 répétitions dans les buttes partageant une même lettre, sera réalisé (l'échantillon « A » sera composé des buttes A1, A2, A3).

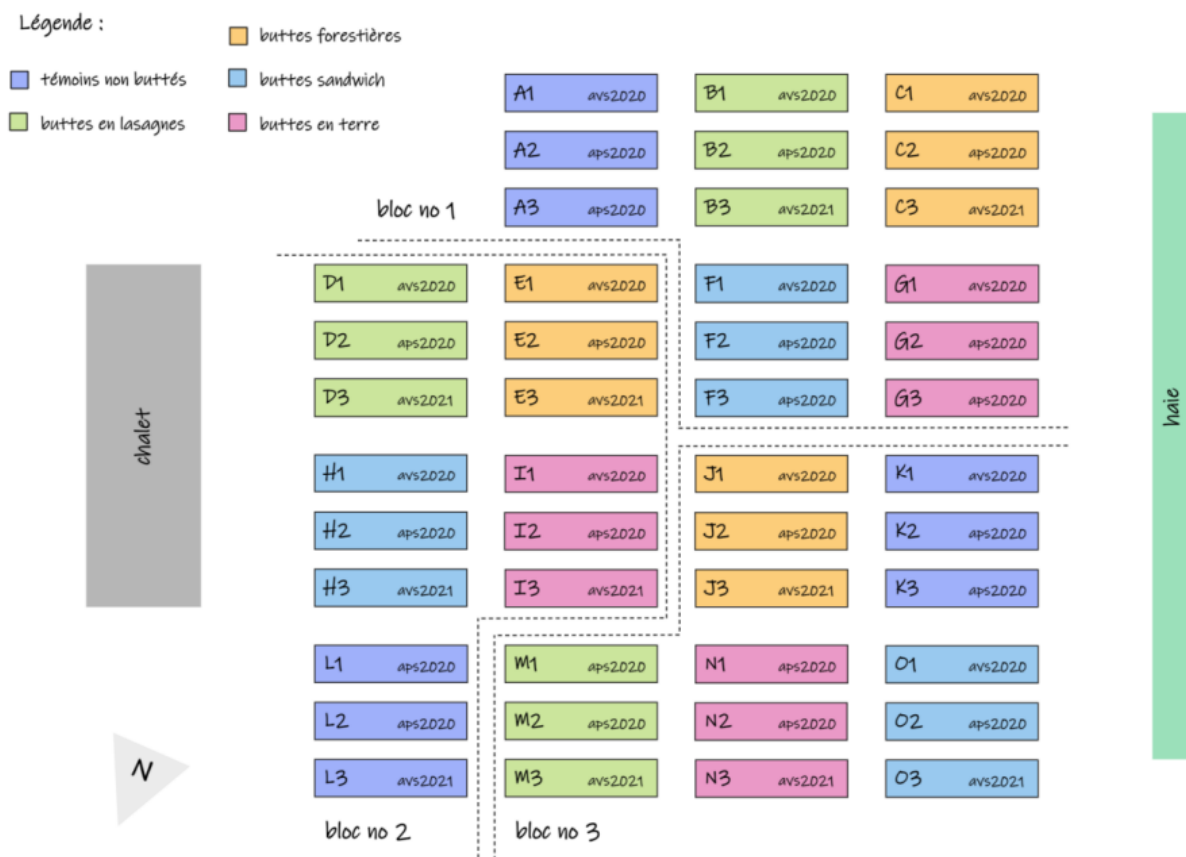


Figure 6 : Dispositif expérimental (Lerogeron, 2022).

### 3.5 Mise en place des cultures

Depuis le début de l'expérience, les mêmes cultures ont été plantées chaque année afin d'observer l'évolution de la fertilité des buttes. Les cultures ont été sélectionnées pour leur diversité selon leur nutrition, la date de mise en place et de récolte, ainsi que pour leurs besoins nutritifs et leur architecture aérienne et racinaire. Les légumes comprennent l'oignon tige, le fenouil, la laitue, l'épinard et le haricot, qui a remplacé la culture initiale de pois il y a deux ans. Chaque année, une rotation des cultures est effectuée au sein des buttes, décalant de deux rangées les cultures, afin de prévenir l'épuisement localisé des buttes. Les plants viennent du Centre Technique Horticole de Gembloux et ont été repiqués aux dates ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Calendrier des opérations culturales des légumes cultivés sur les buttes.

Culture	Date	Opération culturale
Oignons (Tycoon®)	10/04/24	1 <sup>er</sup> Repiquage
	29/04/24	2 <sup>e</sup> Repiquage
Épinards (Bandera®)	11/04/24	1 <sup>er</sup> Repiquage
	29/04/24	2 <sup>e</sup> Repiquage
Laitue (Tombelo®)	26/04/24	1 <sup>er</sup> Repiquage
	13/05/24	2 <sup>e</sup> Repiquage
Fenouil (Rondo®)	26/04/24	1 <sup>er</sup> Repiquage
	14/05/24	2 <sup>e</sup> Repiquage
Haricots (Minidor®)	03/05/24	1 <sup>er</sup> Semis
	10/05/24	2 <sup>e</sup> Semis
	28/05/24	1 <sup>er</sup> Repiquage
		2 <sup>e</sup> Repiquage

L'implantation des légumes s'est faite parallèlement à la largeur de la butte, en maintenant un espacement uniforme entre chaque rangée de plants (Figure 7). Chaque butte comporte 11 plants de laitues et de fenouils et 20 plants d'épinards, de haricots et d'oignons tiges. Les plants morts (majoritairement suite aux dégâts de limaces) ont été remplacés le 29 avril pour les épinards et les oignons tiges et, le 13 et 14 mai, pour les laitues et le fenouil. Les haricots ont été semés et repiqués à plusieurs reprises.

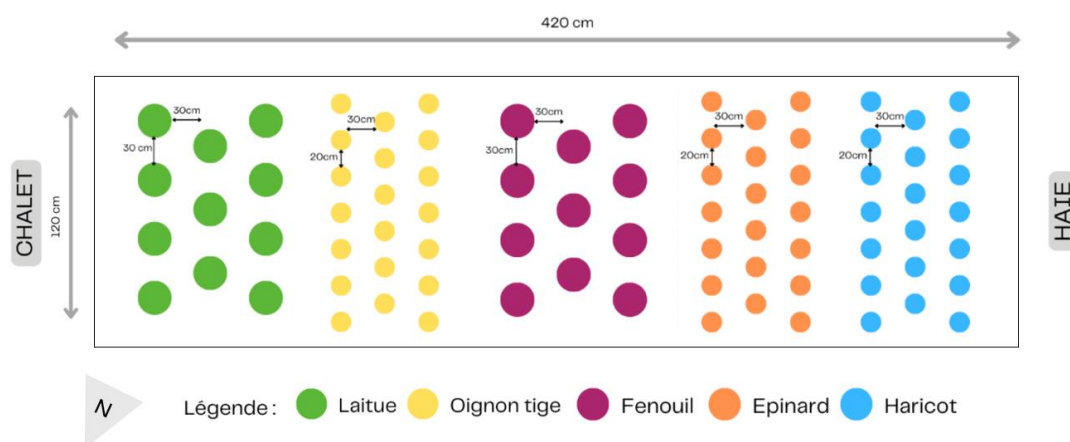


Figure 7 : Plan de culture sur une butte en 2024.

### 3.6 Récolte et quantification de la biomasse aérienne

Lors de la récolte, les épinards, fenouils et laitues ont été coupés au niveau du collet et les oignons ont été arrachés. Les dates de récoltes sont répertoriées dans le Tableau 2. Le nombre de plants récoltés par butte a été noté et la biomasse fraîche totale de chaque culture par butte, a été mesurée. Ainsi, le poids moyen d'un plant par butte peut être calculé afin de pouvoir comparer les biomasses d'année en année. Les haricots n'ont pas pu être récoltés, car ils ne sont pas arrivés à maturité avant le mois d'août, à cause des températures particulièrement fraîches et des attaques de limaces.

Une fois la récolte effectuée, un sous-échantillon représentatif est pris aléatoirement par butte, placé dans un sachet microperforé et placé à l'étuve à 60° pendant au moins 72 heures. Enfin, les sous-échantillons séchés de chaque butte sont pesés afin d'obtenir la biomasse sèche.

Tableau 2 : Dates de récolte des différentes cultures.

<b>Culture</b>	<b>Date de récolte</b>	<b>Sous-échantillon</b>
<b>Épinard</b>	24/05/24	3 plants/butte
<b>Oignon</b>	17/06/24	3 bottes/butte
<b>Laitue</b>	24/06/24	2 plants/butte
<b>Fenouil</b>	05/07/24	2 plants/butte

### 3.7 Échantillonnage de sol

Pour caractériser les composantes chimiques et biologiques du sol, des prélèvements ont été effectués sur le sol des buttes le 10 mai. Toutes les buttes ont été échantillonnées afin d'homogénéiser les prélèvements de terre. Des prélèvements ont été réalisés en 4 points au sommet de chaque butte, à l'aide d'une tarière gouge manuelle de 25 cm de long et 2,5 cm de diamètre (Figure 8). Lors de ces prélèvements, deux horizons ont été distingués sur base de critères visuels (couleurs et textures) et séparés (Figure 9). La hauteur des horizons a été estimée pour chaque type de butte (Annexe 1). En raison de la grande variabilité observée dans les buttes, notamment due à la présence de bûches et de branchages au fond des buttes sandwich et forestière, seuls ces deux horizons, accessibles dans toutes les buttes, ont été considérés. Des échantillons composites d'au moins 200 grammes ont été formés en combinant les échantillons des buttes portant la même lettre (A1, A2, A3 = A), en séparant chaque horizon. Ainsi, 30 échantillons composites ont été formés, chacun composé de 12 prélèvements, issus de trois buttes d'une même lettre, séparé en deux horizons. Ces échantillons ont ensuite été tamisés avec un tamis (mailles de < 3mm) et stockés dans un frigo à 5°C, de manière à préserver la vie du sol en attendant d'être analysés. Pour garantir la pérennité des buttes, les trous créés par la tarière ont été bouchés avec de la terre de surface, protégeant ainsi l'intérieur des buttes des perturbations externes.

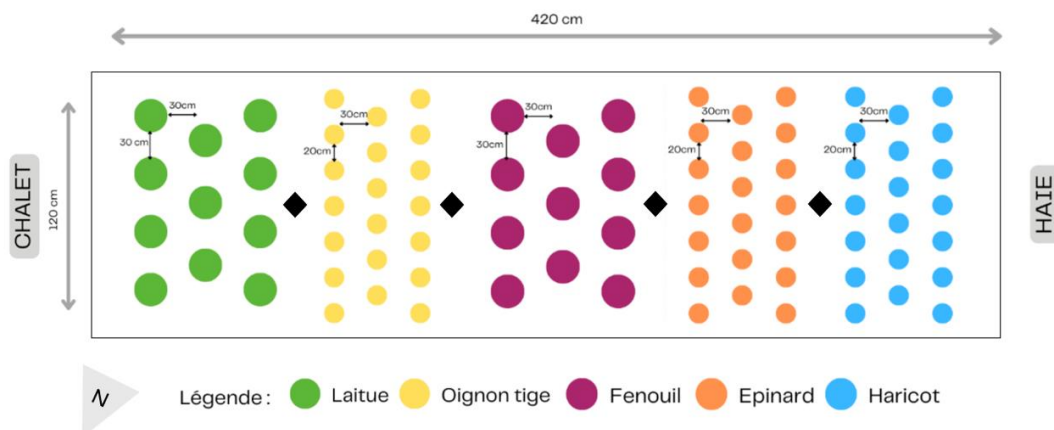


Figure 8 : Emplacement des prélèvements de sol sur le sommet d'une butte.



Figure 9 : Prélèvements du sol avec une tarière et séparation visuelle des échantillons en deux horizons.

### 3.7.1 Caractéristiques chimiques du sol

Depuis le début de l'expérience, les analyses chimiques sont effectuées par le pôle « Laboratoire d'analyses agricoles » du Centre provincial de l'agriculture et de la ruralité (CPAR) à la Hulpe. Les échantillons de sols de minimum 200 grammes y sont envoyés pour mesurer le pH KCl, les quantités en éléments phosphore (P), potassium (K), magnésium (Mg) et calcium (Ca), l'azote total, le rapport carbone sur azote (C/N), le taux d'humus et de carbone organique. Les analyses sont réalisées sous accréditation BELAC et les méthodes utilisées sont consultables sur le site du Brabant Wallon (Le Brabant wallon, 2023).

### 3.7.2 Caractéristiques biologiques du sol

Tous les échantillons de sol prélevés ont été analysés, représentant un total de 30 échantillons composites.

#### 3.7.2.1 Étude de la respiration microbienne

Le kit « MicroResp™ » développé par Campbell et al. (2003) a été utilisé afin de refléter l'activité microbienne, sur base du taux de CO<sub>2</sub> émis par les micro-organismes du sol. Cette technologie repose sur l'utilisation d'un indicateur coloré, le rouge de crésol, qui est un colorant pH-sensible qui change de couleur en fonction de l'acidité du milieu. Lorsque le pH diminue, indiquant une acidification, le rouge de crésol s'éclaircit. Cette acidification résulte de la production de CO<sub>2</sub> par les micro-organismes du sol, qui réagit avec le bicarbonate présent pour former des ions carbonates et des ions H<sup>+</sup>, ce qui acidifie le milieu (The James Hutton Institute, 2019). La réaction chimique suivante illustre ce processus :

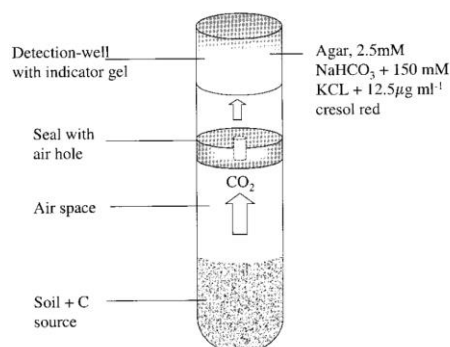


Figure 10 : Schéma d'un puits profond connecté à un puits de détection (Campbell et al., 2003).

Le kit inclut une plaque à 96 puits profonds (1,2 ml), dans lesquels les échantillons de sol sont placés. Une fermeture en caoutchouc percée permet le passage du CO<sub>2</sub> émis par les micro-organismes du sol. Placée au-dessus, une microplaque de 96 puits contenant le gel de détection est utilisée pour capturer et mesurer le CO<sub>2</sub> (Figure 10). Enfin, un dispositif de fermeture en métal est fourni pour maintenir les plaques en position et assurer un environnement hermétique (Figure 11).



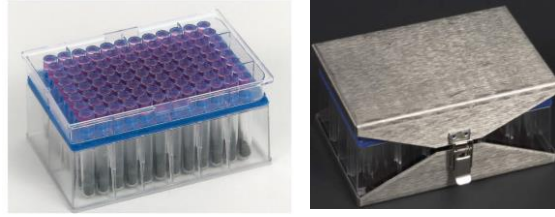


Figure 11 : Illustration du kit microresp™ (The James Hutton Institute, 2019).

L'absorbance de la microplaque de détection a été lue à 570nm à 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN Spark®. Le taux d'émission de CO<sub>2</sub> (µg CO<sub>2</sub>-C/g/h) est calculé avec les formules qui se trouvent dans le protocole en Annexe 2.

### 3.7.2.2 Étude de l'activité microbienne par l'analyse de l'activité enzymatique par fluorescence

Afin de quantifier l'activité microbienne présente dans les différentes buttes, l'activité enzymatique des micro-organismes du sol a été mesurée par fluorescence via l'ajout du diacétate fluorescéine (FDA). L'hydrolyse de la FDA est catalysée par plusieurs enzymes différentes, y compris les lipases, les protéases et les estérases, omniprésentes parmi les champignons et les bactéries, qui sont les principaux décomposeurs dans le sol (Prosser et al., 2011). Par conséquent, la dégradation de la FDA devrait refléter l'activité microbienne.

Lorsque la FDA est hydrolysée par les enzymes microbiennes, elle libère de la fluorescéine, un produit coloré qui peut être mesuré par spectrophotométrie (Adam & Duncan, 2001). La fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, le TECAN Spark®, à 465nm en excitation et 535 nm en émission. Le protocole complet se trouve en Annexe 7.

### 3.7.2.3 Étude de la biomasse microbienne par quantification des bactéries et champignons du sol par qPCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN d'intérêt permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques (amplicons). Les régions conservées présentes dans les gènes d'ADN ribosomique (ADNr), telles que les gènes 16S pour les bactéries et 18S pour les champignons, facilitent la conception d'amorces spécifiques ciblant ces groupes distincts (Sharma et al., 2010). La PCR quantitative (qPCR) permet d'amplifier et de quantifier simultanément les amplicons en utilisant un signal fluorescent en temps réel pour détecter et mesurer la présence des fragments d'ADN amplifiés.

L'ADN présent dans les sols a d'abord été extrait à l'aide du kit DNeasy PowerSoil® de QIAGEN, en suivant le protocole en Annexe 3 (QIAGEN, 2019). Une fois extrait, l'ADN a été quantifié en suivant le protocole décrit en Annexe 4, utilisant le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. Après quantification, la concentration de l'ensemble des échantillons a été normalisée à 10ng/ µL d'ADN, pour un volume final de 50 µL.

La PCR en temps réel a été réalisée avec le thermocycleur Applied Biosystems™ et le programme QuantStudio 3, sur des plaques à 96 puits, chaque puits contenant un volume de réaction de 10 µL par puits, comprenant 5 µL de KAPA SYBR® FAST, 1 µL par amorce, 2 µL d'eau sans nucléase et 1 µL d'ADN extrait concentré à 10µl.



Les amorces pour l'amplification de l'ADNr 16S sont :

- 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
- 5'-ATT ACC GCT GCT GGC A-3'

Les amorces pour l'amplification de l'ADNr 18S sont :

- 5'-AI CCA TTC AAT CGG TAIT-3'
- 5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'

Les conditions de réaction pour l'amplification du gène 16S et 18S sont de 95°C pendant 5 minutes, puis 40 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C. Pour chaque paire d'amorces, des dilutions en série ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  copies) de l'amplicon correspondant intégré dans un plasmide sont effectuées et utilisées pour construire une droite d'étalonnage. Le protocole détaillé se trouve en Annexe 6.

### 3.8 Récapitulatif des années précédentes

Le tableau à la page suivante illustre l'évolution des pratiques culturelles au fil des années (Tableau 3), reflétant l'orientation progressive de l'étude.

Tableau 3 : Récapitulatif des expériences sur 4 ans.

	<b>Année 1 (2021)</b>	<b>Année 2 (2022)</b>	<b>Année 3 (2023)</b>	<b>Année 4 (2024)</b>
Paillage	Chanvre	Paille	Miscanthus	
Légumes cultivés	Pois mangetout (de Grace®) Laitue (Tombelo®) Épinard (Harp®) Oignon tige (Totem®) Fenouil (Prelude®)	Pois mangetout (de Grace®) Laitue (Tombelo®) Épinard (Harp®) Oignon tige (Totem®) Fenouil (Prelude®)	Haricots (Minidor®) Laitues (Shanaia®) Épinards (Bandera®) Oignons tige (Tycoon®) Fenouil (Rondo®)	Haricots (Minidor®) Laitues (Tombelo®) Épinards (Bandera®) Oignons tige (Tycoon®) Fenouil (Rondo®)
Opérations techniques	Buttes mises en place entre mai 2020 à mai 2021		25/08 : Travail du sol en superficie pour redonner une forme butte (excepté pour le témoin et les butte lasagne)  19/09 : Renouvellement d'une couche pour les buttes lasagnes (tonte-paille-terre)	
Engrais vert	Automne : Semis engrais vert (moutarde et vesce d'hiver)	Automne : Semis engrais vert	25/08 : Semis engrais vert (phacélie, vesce, moutarde, avoine)	
Application anti-limaces				11/04 et 29/04 : Applications de phosphate de fer
Indicateurs physiques analysés	Teneur en eau du sol Température du sol Eau disponible Densité apparente sèche Porosité totale	Température du sol Humidité du sol	Humidité du sol	
Indicateurs chimiques analysés	P, K Mg, Ca pH KCl CO N total Rapport C/N	P, K Mg, Ca pH KCl CO N total Rapport C/N CEC	P, K Mg, Ca pH KCl CO N total Rapport C/N % humus CaCO3 C total	P, K Mg, Ca pH KCl CO N total Rapport C/N % humus
Indicateurs biologiques analysés	<b>Activité microbienne :</b> FDA  <b>Biomasse microbienne :</b> fumigation chloroforme	<b>Activité microbienne :</b> FDA	<b>Activité microbienne :</b> FDA, BG, NAG, respiration microbienne <b>Biomasse microbienne :</b> fumigation chloroforme <b>Quantification microbienne :</b> qPCR	<b>Activité microbienne :</b> FDA, respiration microbienne  <b>Quantification microbienne :</b> qPCR
Observations des cultures	<b>Biomasse fraîche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, pois  <b>Biomasse sèche :</b> épinards, laitues Pois : levée et stade de développement, comptage des nodosités, abondance CMA dans les racines	<b>Biomasse fraîche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, pois	<b>Biomasse fraîche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, haricots <b>Biomasse sèche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, haricots	<b>Biomasse fraîche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, haricots <b>Biomasse sèche :</b> épinards, laitues, fenouils, oignons, haricots

### 3.9 Traitement et structuration des données brutes

Afin de comparer les données des années précédentes avec celles de 2024 et d'observer l'évolution des variables sur les différents types de buttes, un nettoyage et une structuration des données ont été nécessaires. Toutes les données des années antérieures ont été formatées de manière uniforme dans un fichier Excel, chaque ligne d'information étant séparée par le type de butte, son identifiant, le bloc auquel elle appartient et l'année. Pour les analyses de sol, les données ont été séparées par horizon, tandis que pour les prélèvements d'humidité, la position du prélèvement a été spécifiée.

Certaines données ont dû être mises de côté lorsque leur analyse n'était pas reprise sur plusieurs années consécutives (par exemple, la disponibilité en eau pour les plantes, la porosité totale, la température du sol, etc.). D'autres mesures ont été exclues en raison de l'impossibilité de les comparer. En effet, lors de la première année, les prélèvements de sol ont été réalisés dans différentes buttes ayant la même composition, mais des lettres différentes, formant ainsi des échantillons composites. Cependant, les années suivantes, les prélèvements ont été effectués uniquement dans certaines buttes, créant des échantillons composites au sein d'une seule et même butte.

Pour permettre une comparaison interannuelle, les données ont été simplifiées à l'échelle de la lettre (un trio de trois buttes de la même composition), en calculant la moyenne des trois buttes lorsque les données étaient disponibles pour chacune. Ainsi, les données prises de manière différente chaque année pouvaient être comparées. Certaines données n'ont toutefois pas pu être conservées, car elles étaient inutilisables, comme les analyses chimiques de la Hulpe en 2021, où les prélèvements n'étaient pas séparés par horizon et les échantillons composites étaient formés de différentes buttes avec des numéros distincts.

### 3.10 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R (R-4.2.2). Les analyses pour les données récoltées en 2024 ainsi que pour la compilation des données de toutes les années (2021 à 2024) ont été effectuées de manière identique.

Pour toutes les analyses, le type de butte a été considéré comme le facteur principal, avec un facteur aléatoire « bloc » en fonction des différentes variables mesurées. Pour l'analyse de la respiration microbienne, l'analyse enzymatique et la qPCR, un facteur additionnel a été inclus pour prendre en compte l'horizon dans lequel le prélèvement de sol a été effectué. Dans l'analyse de l'humidité du sol, un facteur position a été ajouté, correspondant à l'endroit du prélèvement sur la butte.

Dans le cadre de l'analyse statistique, la fonction *lmer* (Linear Mixed-Effect Regression) a été utilisée sur R pour étudier les relations entre les variables. Ce choix s'explique par la nature des données utilisées, la fonction *lmer* permettant de prendre en compte les effets aléatoires, renforçant ainsi la validité des résultats. La fonction *anova* a été employée pour vérifier s'il existait une différence significative entre les buttes pour chaque variable. Lorsque des différences significatives ont été observées entre les groupes étudiés, la fonction *emmeans* a été employée pour effectuer des comparaisons entre les moyennes estimées. Cette méthode a permis d'identifier précisément les variations entre les différents types de buttes, en tenant compte des effets fixes et aléatoires du modèle. Une comparaison multiple des moyennes a été réalisée à l'aide du test post hoc de Tukey, permettant d'indiquer la significativité entre les types de buttes sur les graphiques.

Pour évaluer si les conditions d'application des modèles étaient respectées, des diagnostics graphiques avec des Q-Q plots ont été réalisés. Ces graphiques ont permis d'évaluer la normalité des résidus et l'homoscédasticité des données, garantissant ainsi la validité des conclusions statistiques tirées des analyses.

Pour évaluer l'effet à long terme du type de butte, un facteur supplémentaire « année » a été ajouté au modèle. Les mêmes tests statistiques que ceux décrits précédemment ont été effectués sur ce nouveau modèle. L'inclusion de ce facteur permet de prendre en compte les variations temporelles et d'analyser l'évolution des variables au fil des années.

Un seuil de significativité de  $p < 0,05$  a été utilisé pour chaque test.

## 4 Résultats

---

### 4.1 Année 2024

#### 4.1.1 Quantification de la biomasse aérienne

##### 4.1.1.1 Biomasses fraîches

L'analyse statistique révèle qu'il existe une différence significative entre les types de buttes pour les biomasses fraîches des épinards (Figure 12). Le test de Tukey met en évidence que les buttes lasagnes ( $93,86 \pm 13,04$  g/plant en moyenne) ainsi que les buttes sandwiches ( $90,36 \pm 27,58$  g/plant) ont une biomasse significativement plus grande que les buttes en terre ( $46,83 \pm 10,69$  g/plant). Les témoins non buttés et les buttes forestières ne sont pas significativement différents des buttes en terre, des lasagnes et des sandwiches, et les buttes sandwiches ne sont pas significativement différentes des buttes lasagnes. Les biomasses par plant au sein d'une même modalité peuvent présenter de grandes variabilités (Figure 13).

Pour les biomasses fraîches des oignons, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différences significatives entre les types de buttes. Cependant, les buttes lasagnes ( $38,91 \pm 19,77$  g/plant), forestières ( $56,15 \pm 20,82$  g/plant) et sandwiches ( $54,01 \pm 24,44$  g/plant) ont une biomasse moyenne et une variabilité de rendements plus élevées que les buttes en terre ( $18,18 \pm 8,76$  g/plant) et les témoins ( $19,01 \pm 9,08$  g/plant).

Les biomasses fraîches de laitue et de fenouil se trouvent en Annexe 8, il n'y a pas de différence significative entre les différents types de buttes. De plus, il n'y a pas ou très peu de données pour les témoins et les buttes en terre pour ces légumes, soumis aux attaques des ravageurs.

La moyenne des biomasses a également été calculée en kg/m<sup>2</sup> pour pouvoir les comparer aux valeurs moyennes de rendement données par le CIM. Ces résultats se trouvent en Annexe 10.

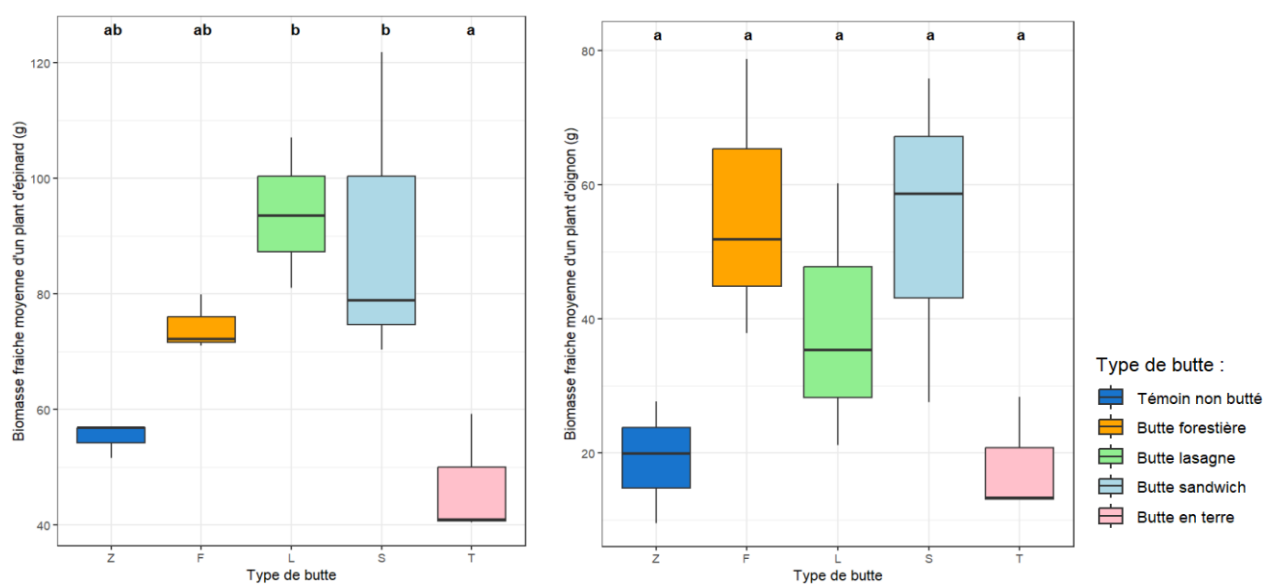


Figure 12 : Biomasse fraîche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen, d'épinard à gauche et d'oignon à droite. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



Figure 13 : À gauche : Photo prise le jour de la récolte des épinards (24/05), on observe les différences de taille des épinards entre les 3 buttes de même modalité. Au milieu et à droite, photo prise le jour de la récolte des oignons (17/05), on observe les différences au sein de la même butte.

#### 4.1.1.2 Biomasses sèches

L'analyse statistique de la biomasse sèche des épinards révèle une différence significative entre les différents types de buttes. Le test de Tukey met en évidence que les buttes lasagnes ( $9,69 \pm 0,69$  g/plant en moyenne) ont une biomasse significativement plus élevée que les buttes en terre ( $5,17 \pm 0,84$  g/plant). Les témoins non buttés, les buttes forestières et sandwiches, ne présentent pas de différences significatives par rapport aux buttes en terre et lasagnes et ne diffèrent pas significativement entre elles (Figure 14).

Aucune différence significative n'a été observée dans la biomasse sèche des oignons, laitues et fenouils (Annexe 9) entre les types de buttes, bien que les buttes forestières, lasagnes et sandwiches présentent des biomasses sèches moyennes plus élevées, mais l'évaluation est limitée par la faible quantité de données en raison des attaques de ravageurs.

De manière générale, bien que les différences ne soient pas toujours statistiquement significatives, les buttes riches en matière organique (buttes forestières, lasagnes, et sandwiches) tendent à présenter des rendements en biomasse, tant fraîche que sèche, plus élevés que les buttes en terre et les témoins non buttés.

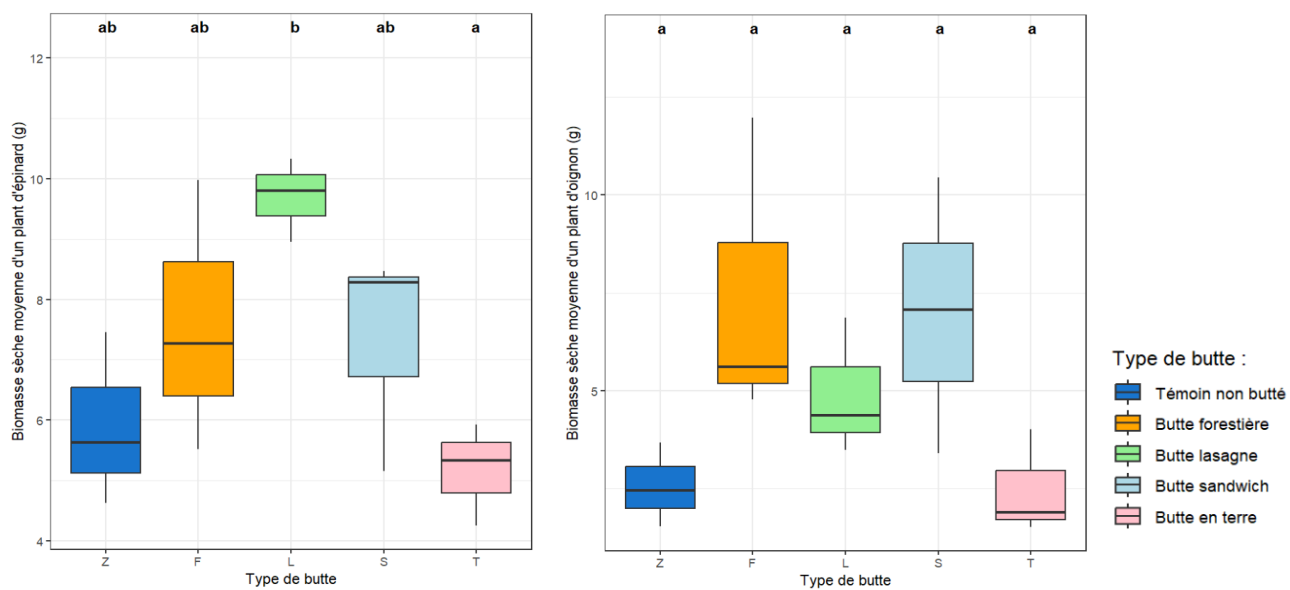


Figure 14 : Biomasse sèche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen d'épinard à gauche et d'oignon à droite. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



#### 4.1.2 Caractéristiques chimiques du sol

L'analyse statistique pour chaque horizon indique une différence significative entre les types de buttes pour le phosphore (P), le potassium (K), le magnésium (Mg) et le calcium (Ca).

Pour l'horizon 1, le test de Tukey montre que les concentrations en éléments disponibles dans les buttes lasagnes sont significativement inférieures par rapport aux buttes en terre et aux témoins pour le P, Mg et Ca (Figure 15).

Pour l'horizon 2, les concentrations d'éléments disponibles dans les buttes en terre et les témoins non buttés sont significativement différentes, deux à trois fois plus faibles que celles observées dans les buttes forestières, lasagnes et sandwiches.

Les buttes forestières, lasagnes et sandwiches affichent des teneurs en nutriments plus élevées dans l'horizon 2 comparativement à l'horizon 1. En revanche, pour les buttes en terre et les témoins non buttés, les concentrations en éléments disponibles sont plus élevées dans l'horizon 1, sauf pour le potassium, où la différence entre les horizons est moins marquée.

L'horizon 2 des buttes forestières montre la plus grande variabilité pour les éléments nutritifs mesurés, tandis que l'horizon 1 des buttes lasagnes présente très peu de variabilité.

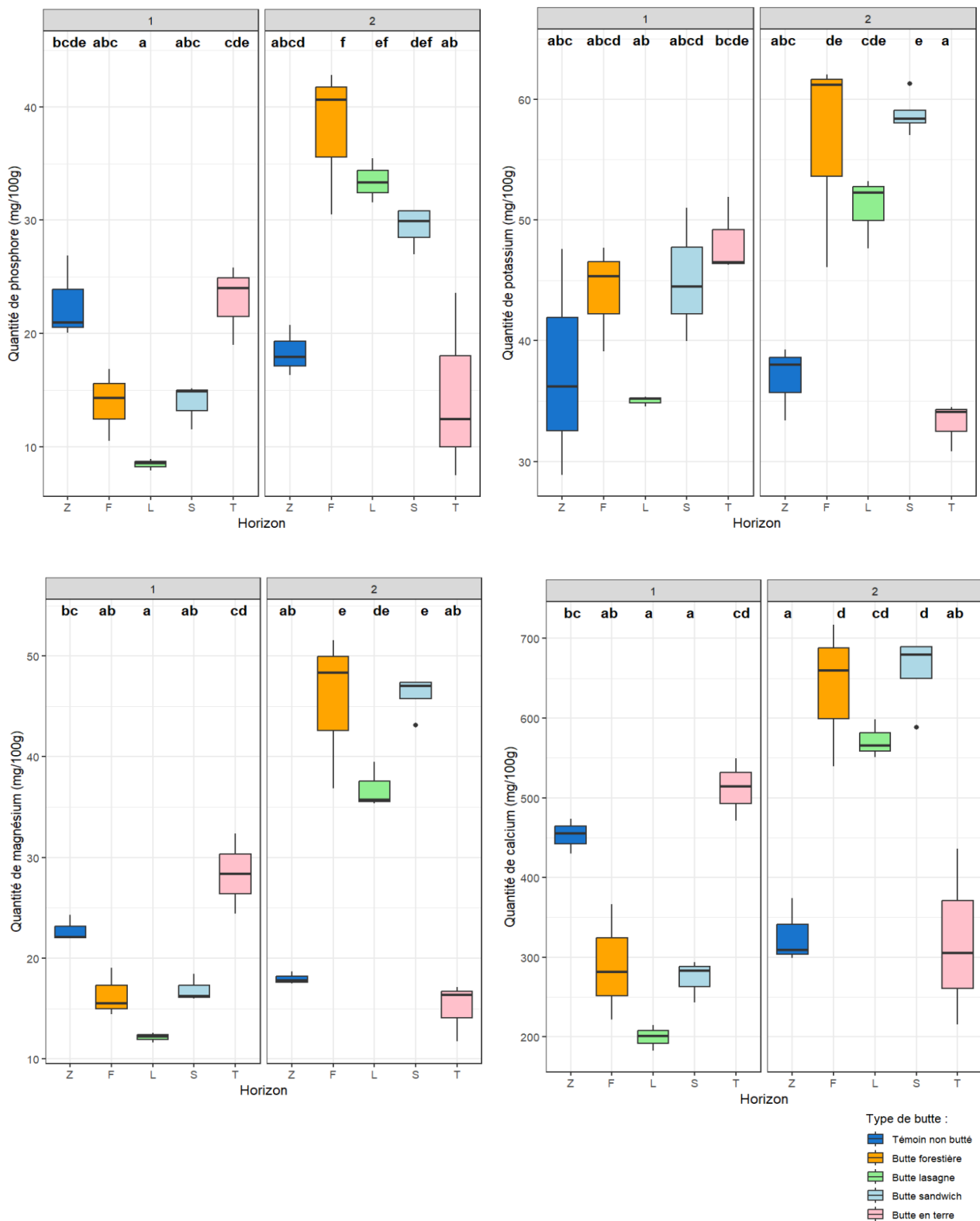


Figure 15 : Quantité de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g) en fonction du type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

Pour la quantité d'azote total et le pH KCl, l'analyse statistique de l'horizon 1 révèle une différence significative entre les types de buttes (Figure 16).

La quantité d'azote total mesurée dans l'horizon 1 indique une concentration significativement plus basse pour les buttes lasagnes ( $0,167\% \pm 0,006$ ) comparées aux buttes en terre ( $0,317\% \pm 0,072$ ). Les buttes lasagnes en horizon 1 ont également des teneurs en carbone organique plus faibles que les autres buttes, bien que ce ne soit pas significativement différent. Le pH mesuré dans l'horizon 1 est significativement plus faible pour la butte lasagne ( $5,66 \pm 0,22$ ) comparé aux buttes en terre ( $7,02 \pm 0,06$ ) et témoins ( $7,01 \pm 0,10$ ). Le pH des buttes forestières et sandwichs est significativement plus bas que celui des buttes en terre.

L'analyse de l'horizon 2 montre des différences significatives entre les types de buttes pour la quantité d'azote total et le carbone organique.

La quantité d'azote total dans l'horizon 2 indique des teneurs plus élevées dans les buttes forestières, lasagnes et sandwichs qui sont significativement différentes des buttes en terre et des témoins. Les mêmes tendances s'observent avec la quantité de carbone organique en horizon 2, qui présente des teneurs significativement plus élevées pour les buttes riches en MO comparées à celles des buttes en terre et des témoins.

Il n'existe pas de différences significatives de pH entre les buttes dans l'horizon 2.

Aucune différence significative n'est observée entre les types de buttes pour le rapport carbone/azote. L'analyse révèle que dans l'horizon 1, les valeurs de C/N sont très similaires entre les buttes. Dans l'horizon 2, les buttes lasagnes ont les valeurs de C/N les plus faibles, suivies par les buttes forestières et sandwichs.

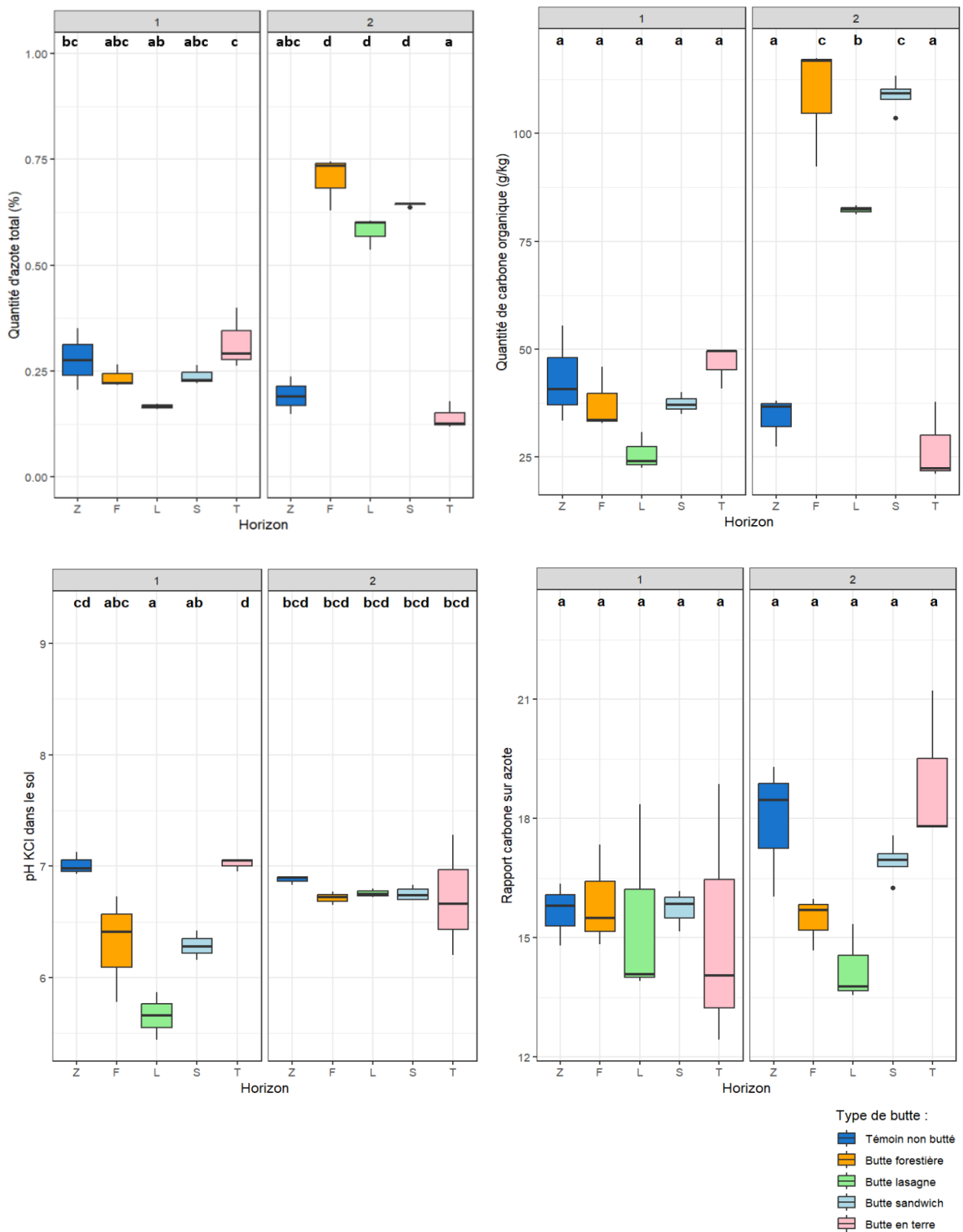


Figure 16 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

## 4.1.3 Caractéristiques biologiques du sol

### 4.1.3.1 Taux d'émission de CO<sub>2</sub>

Les analyses statistiques indiquent une différence hautement significative liée au type de butte, à l'horizon et à l'interaction entre les deux.

Dans le premier horizon, il n'existe pas de différences significatives entre les buttes, mais les témoins et les buttes en terre sont repris dans un groupe et les buttes forestières, lasagnes et sandwichs dans un autre (Figure 17).

Dans le deuxième horizon, le taux de CO<sub>2</sub> des témoins non buttés ( $0,72 \pm 0,15 \mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$ ) et des buttes en terre ( $0,53 \pm 0,14$ ), qui forment à nouveau un même groupe, est significativement plus faible que celui des buttes forestières, lasagnes et sandwichs. Les buttes sandwichs ( $2,32 \pm 0,44$ ) ont un taux de CO<sub>2</sub> significativement plus grand que celui des buttes lasagnes ( $1,51 \pm 0,27$ ). Les buttes forestières présentent un taux de CO<sub>2</sub> intermédiaire ( $2,19 \pm 0,42$ ) ne différant pas significativement de celui des buttes lasagnes et des buttes sandwichs.

Le taux de CO<sub>2</sub> émis est significativement plus élevé dans l'horizon 2 pour les buttes forestières, lasagnes et sandwichs comparé à l'horizon 1. En revanche, aucune différence significative entre les horizons n'est observée pour les buttes en terre et les témoins non buttés.

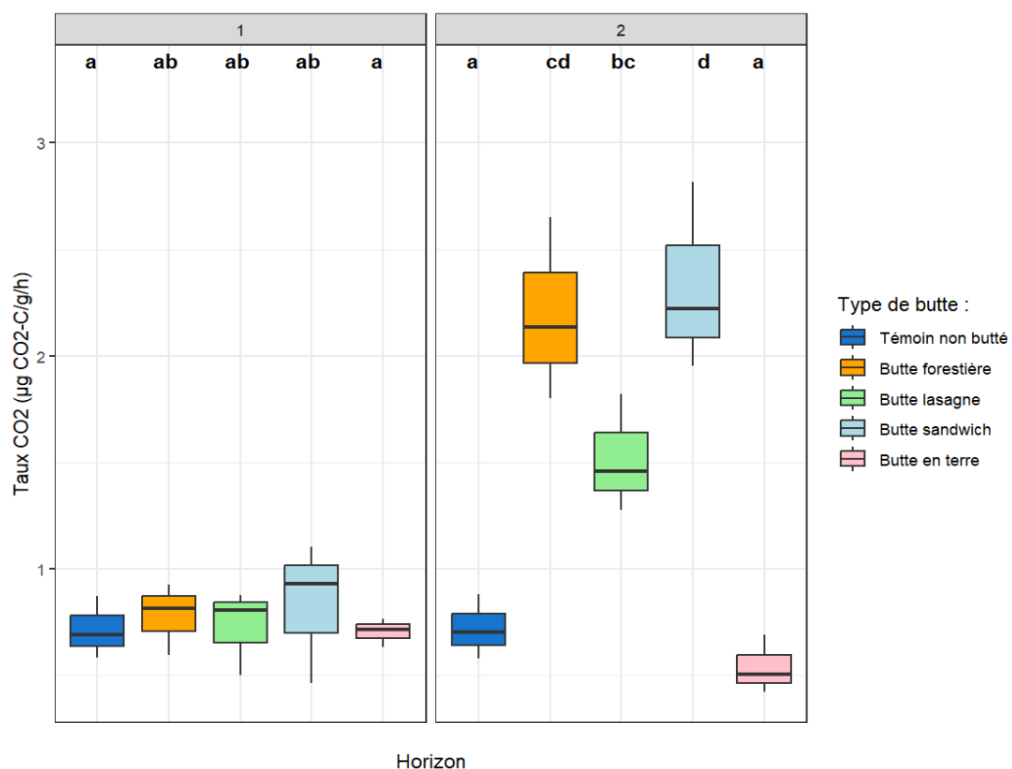


Figure 17 : Taux de CO<sub>2</sub> émis ( $\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$ ), selon le type de butte, séparé par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux de CO<sub>2</sub> (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

#### 4.1.3.2 Analyse de l'activité enzymatique par fluorescence avec la FDA

L'analyse statistique indique que l'effet du type de butte est significatif, tandis que l'horizon et l'interaction entre le type de butte et l'horizon ne le sont pas. Cependant, le test de Tukey ne révèle aucun effet significatif.

Dans l'horizon 1, l'activité enzymatique moyenne est plus élevée dans les buttes forestières, lasagnes, et sandwichs que dans les buttes en terre et les témoins (Figure 18).

Dans l'horizon 2, la butte lasagne présente la moyenne d'activité enzymatique la plus élevée, avec un boxplot très allongé indiquant une forte variabilité des données ainsi qu'un écart-type considérablement élevé ( $660,42 \pm 534,66$  nmols/g de sol sec/h).

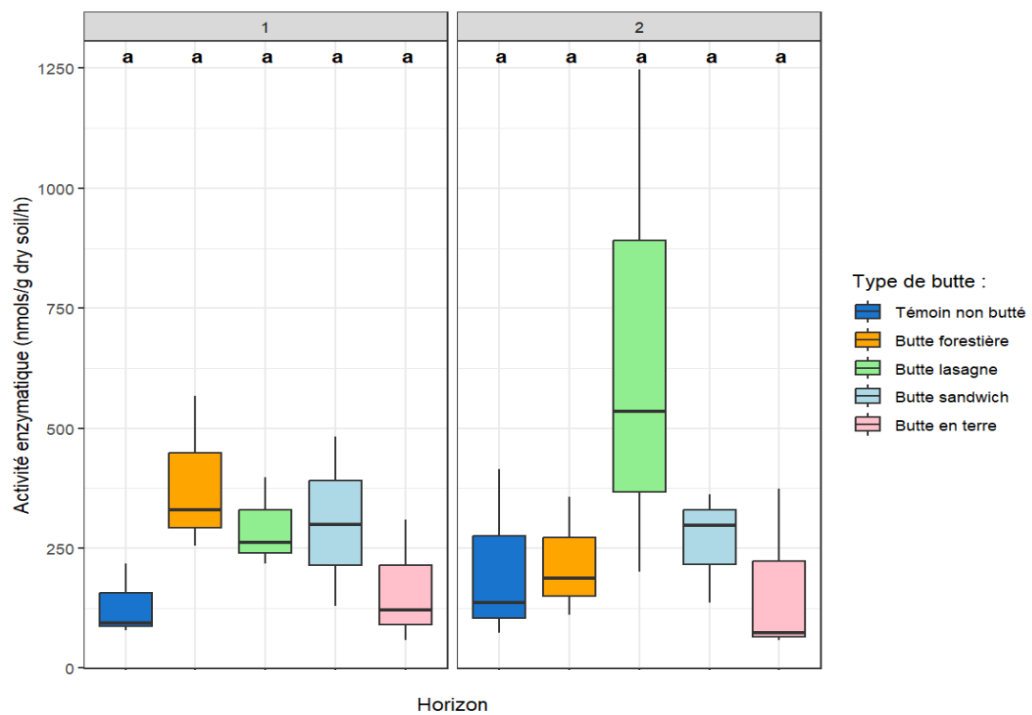


Figure 18 : Activité enzymatique de la FDA selon le type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur l'activité enzymatique mesurée (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

#### 4.1.3.3 Quantification des bactéries et champignons du sol par qPCR

L'analyse statistique de la quantité de gènes bactériens (16S) indique que l'effet du type de butte est significatif, tandis que l'horizon et l'interaction entre le type de butte et l'horizon ne le sont pas.

Dans l'horizon 1, il n'existe pas de différences significatives de quantité de gènes bactériens entre les différents types de buttes. Cependant, les buttes en terre et témoins sont regroupés dans un groupe et les buttes riches en MO dans un autre (Figure 19).

Dans l'horizon 2, les témoins non buttés présentent des quantités de gènes bactériens significativement plus basses que celles observées dans les buttes lasagnes. Les buttes forestières, sandwiches et en terre sont rassemblées dans un même groupe, qui ne diffère pas significativement ni des témoins, ni des buttes lasagnes.

En ce qui concerne l'analyse statistique de la quantité de gènes fongiques (18S), aucune différence significative n'a été observée entre les types de buttes, mais des différences significatives ont été détectées entre les horizons. Une augmentation significative du nombre de gènes fongiques est observée entre l'horizon 1 et l'horizon 2 pour les buttes forestières et en terre, l'horizon 2 contenant une quantité plus élevée de gènes fongiques. Dans l'horizon 1, les buttes sandwiches présentent un nombre moyen de gènes fongiques supérieur à celui des autres buttes, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Dans l'horizon 2, la variabilité du nombre de gènes fongiques est très importante pour les buttes riches en MO, ce qui complique l'identification de différences significatives.

L'analyse statistique du rapport entre le nombre de gènes fongiques (18S) et le nombre de gènes bactériens (16S) indique que l'effet de l'horizon est significatif, tandis que ni le type de butte ni l'interaction entre le type de butte et l'horizon ne le sont (Annexe 11).

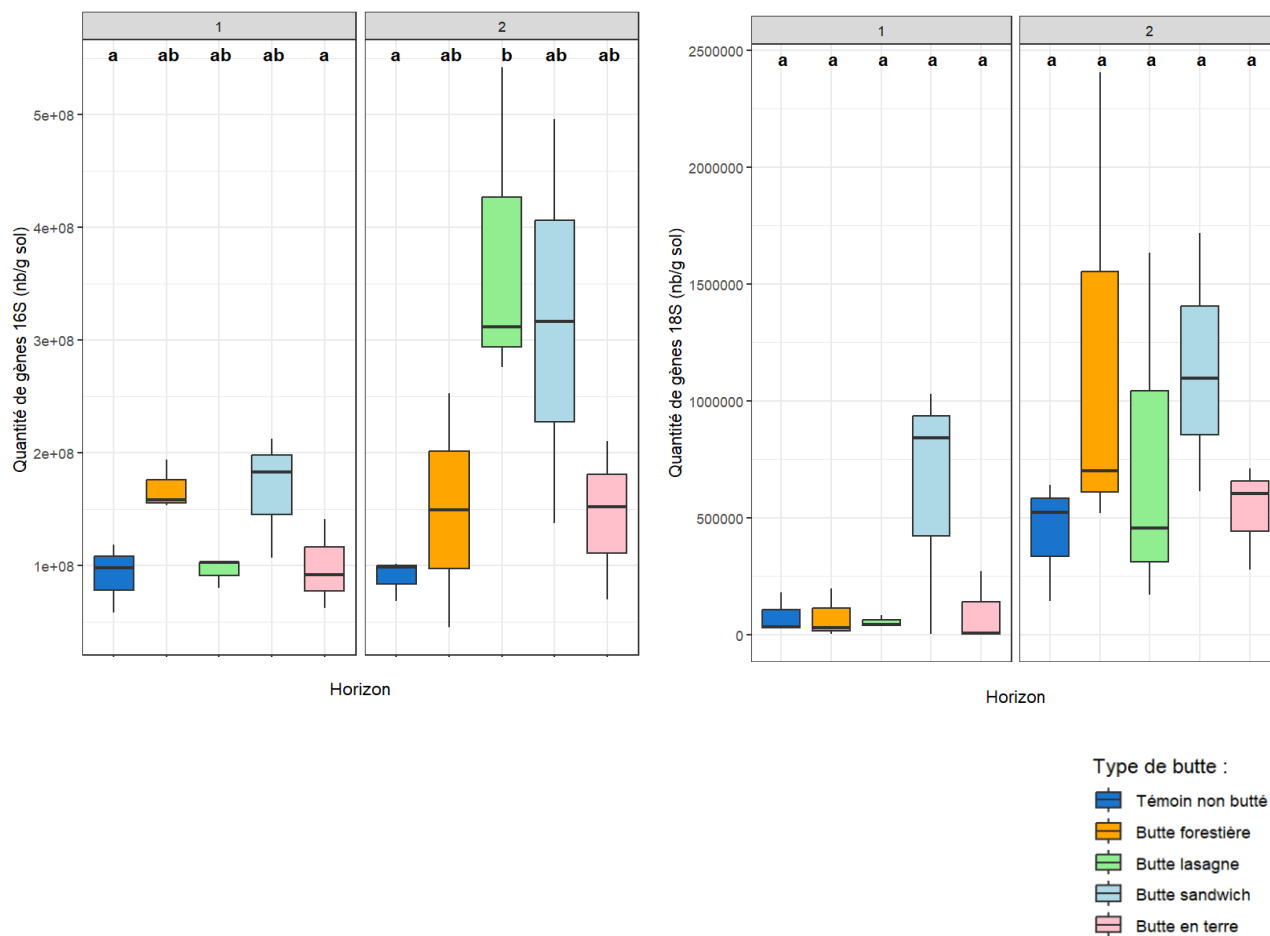


Figure 19 : Quantité de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) selon le type de butte, séparée par horizon. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le nombre de gènes (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



## 4.2 Compilation des années 2021 à 2024

### 4.2.1 Quantification de la biomasse aérienne fraîche et sèche

L'analyse statistique séparée par année permet de voir l'évolution des rendements par type de butte, pour chaque légume. La biomasse fraîche des épinards en année 2 n'a pas été prise en compte dans l'analyse, car les épinards étaient montés en fleurs lors de la récolte.

Les biomasses des buttes sandwichs, qui étaient les plus basses les deux premières années pour tous les légumes, sont légèrement remontées en année 3. En année 4, les buttes sandwichs arrivent à des rendements similaires aux buttes forestières et lasagnes et leurs biomasses sont significativement plus élevées par rapport aux buttes en terre et témoins pour la culture d'oignons (Figure 20).

Les buttes forestières présentaient initialement une biomasse plus élevée que les buttes lasagnes lors de la première année pour tous les légumes. Cependant, cette tendance s'est inversée à partir de la troisième année, avec les buttes lasagnes devenant celles ayant les médianes de biomasse les plus élevées. En quatrième année, les buttes lasagnes ont surpassé les buttes forestières en ce qui concerne les médianes de biomasse pour la culture des épinards et des laitues, tandis que les buttes forestières ont affiché de meilleures performances pour les oignons et le fenouil.

Au cours de la quatrième année, les buttes riches en matière organique (buttes forestières, lasagnes et sandwichs) se sont distinguées des buttes en terre et des témoins en présentant des médianes de biomasse plus élevées pour l'ensemble des légumes cultivés.

Les buttes sandwichs, ayant initialement les biomasses sèches les plus faibles, ont atteint des niveaux comparables à ceux des buttes forestières et lasagnes en année 4, tandis que les biomasses sèches des épinards et des laitues sont restés stables (Annexe 12).

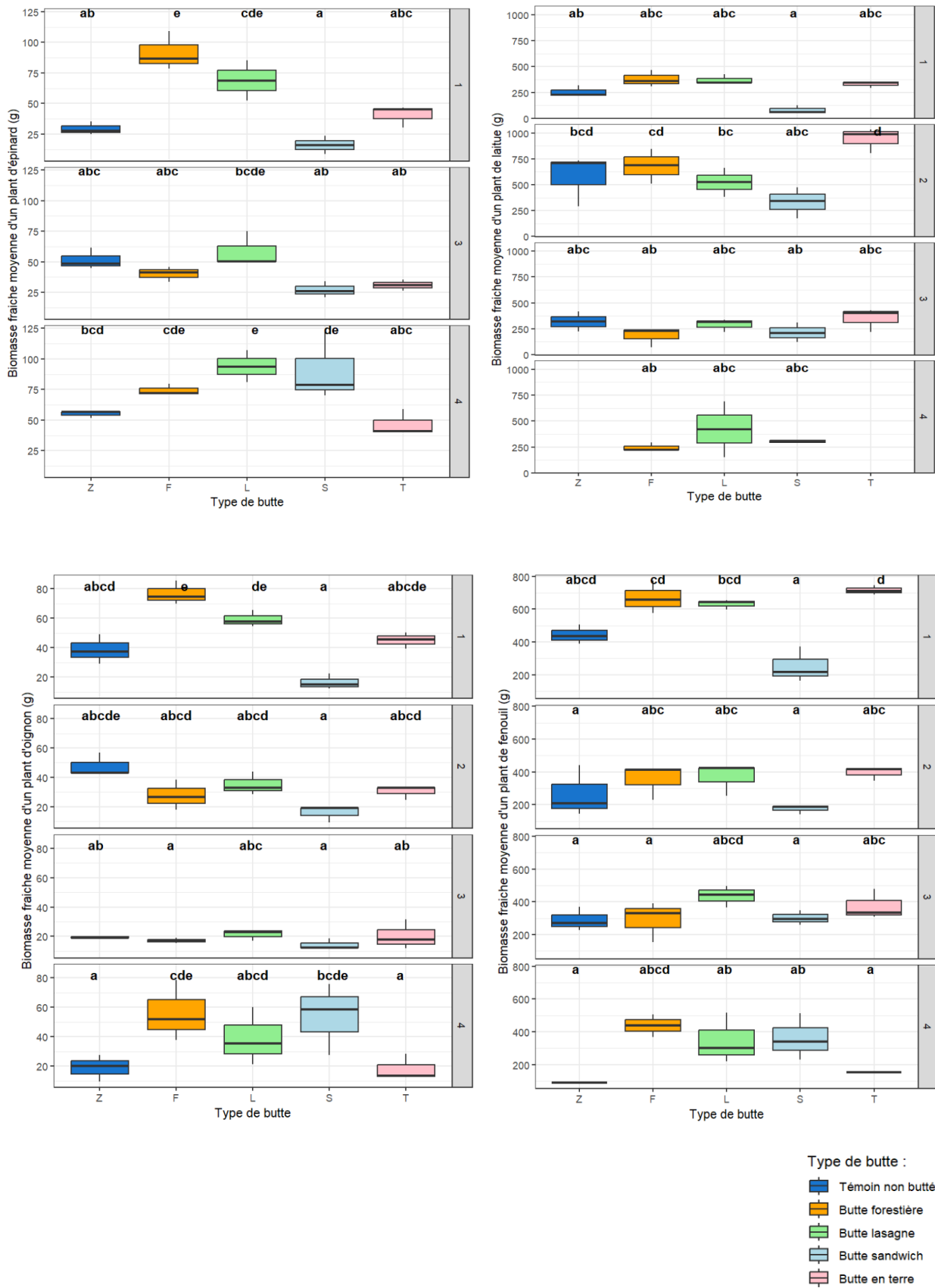


Figure 20 : Biomasse fraîche d'un plant moyen (g) par type de butte, séparée par année (1=2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

## 4.2.2 Caractéristiques chimiques du sol

L'analyse statistique des différents éléments disponibles révèle des tendances similaires en fonction des années (Figure 21).

En année 2, les buttes forestières présentent la médiane la plus élevée pour tous les éléments étudiés, à l'exception du potassium. Bien qu'elles ne soient pas toujours significativement différentes des buttes en terre et des témoins, les buttes forestières contiennent des quantités d'éléments disponibles plus élevés que ces dernières.

En année 3, les buttes lasagnes deviennent celles ayant la médiane la plus élevée pour l'ensemble des éléments. Elles ne sont pas significativement différentes des buttes forestières et sandwiches pour le potassium et le calcium et pas significativement différentes des buttes forestières pour le phosphore et le magnésium. Cependant, les buttes lasagnes sont significativement plus riches en éléments disponibles que les buttes en terre et les témoins pour tous les éléments analysés.

En année 4, les buttes riches en MO (buttes forestières, lasagnes, et sandwiches) présentent des moyennes d'éléments disponibles plus proches de celles des buttes en terre et des témoins par rapport aux années précédentes. Néanmoins, elles demeurent supérieures quant à la quantité d'éléments disponibles. La variabilité des buttes en MO est également réduite par rapport aux années antérieures, indiquant une stabilisation des concentrations d'éléments disponibles.

Pour toutes les années étudiées, les buttes en terre et les témoins ne montrent pas de différences significatives entre elles, pour aucun des éléments analysés.

Les boxplots des éléments pour l'horizon 1 (Annexe 13) présentent des tendances opposées à celles de l'horizon 2, les buttes en MO présentent des quantités plus faibles en éléments disponibles que les buttes en terre et les témoins, pour tous les éléments à l'exception du potassium.

Les résultats chimiques de l'année 2021 avec les valeurs des zones de référence de la Commission des Sols de Wallonie sont en annexe (Annexe 15).

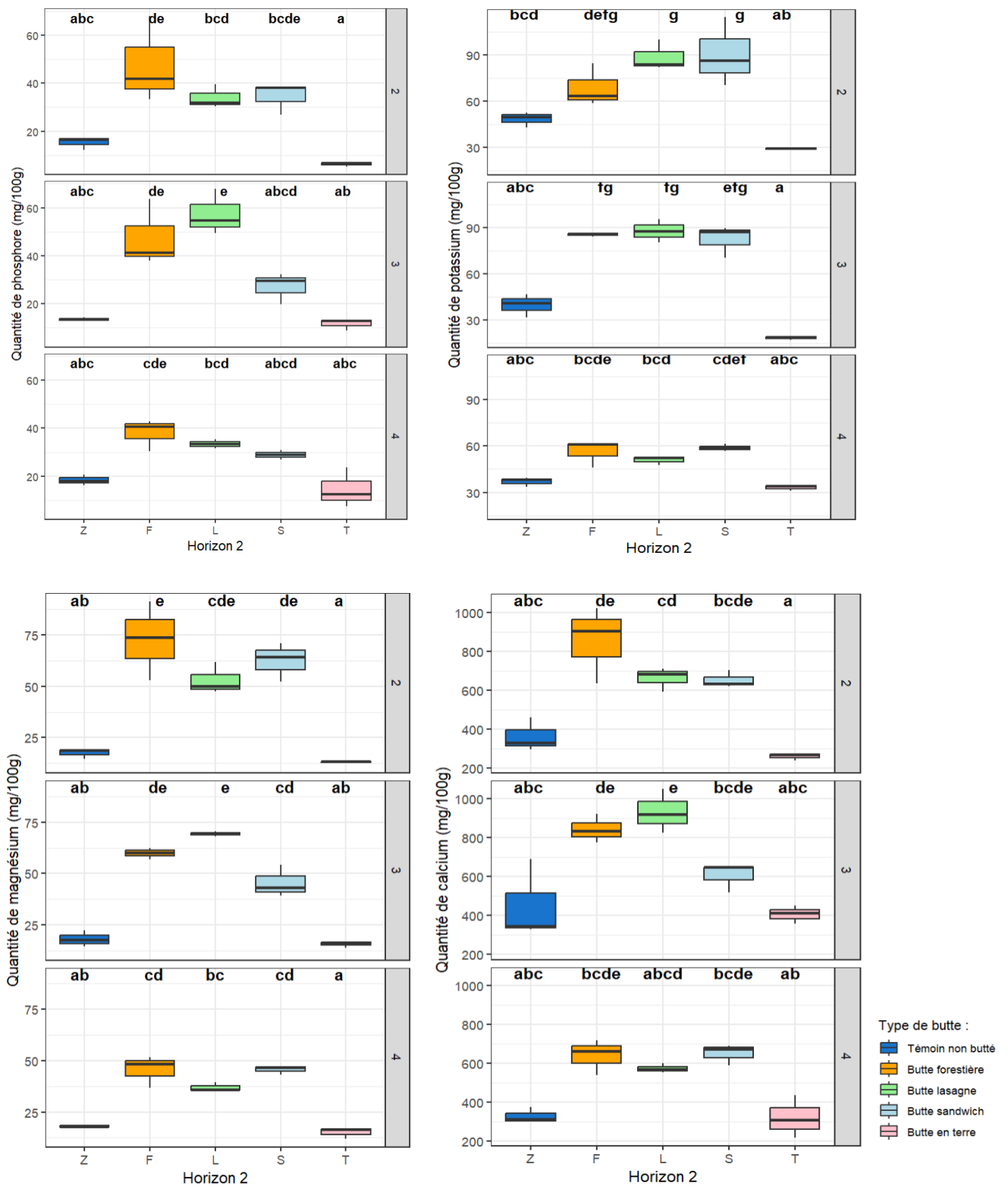


Figure 21 : Quantité de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g) en fonction du type de butte, pour l'horizon 2 pour chaque année (1= 2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

L'analyse statistique du pH KCl de l'horizon 2 n'indique pas de différence significative entre les types de buttes (Figure 22). Cependant, une diminution de la variabilité a été observée en année 4 pour toutes les buttes, à l'exception des buttes en terre, qui présentent une variabilité accrue par rapport aux années précédentes.

Le pH dans l'horizon 1 montre des tendances très différentes de l'horizon 2, les buttes lasagnes se distinguent par un pH significativement plus acide que celui des buttes en terre et des témoins en année 4 (Annexe 14). De plus, les buttes forestières montrent la plus grande variabilité du pH dans cet horizon. Le pH des buttes en terre et des témoins reste stable au fil des années, avec une médiane proche de 7, indiquant des conditions neutres.

L'analyse de la quantité de carbone organique et de la quantité d'azote total dans l'horizon 1 révèle des tendances similaires à celles observées pour le pH KCl dans cet horizon. Les buttes lasagnes présentent les valeurs les plus faibles de carbone organique et d'azote total en année 4.

L'analyse de la quantité de carbone organique dans l'horizon 2 révèle un pic en année 3 pour les buttes riches en MO. Ces buttes sont alors significativement différentes des buttes en terre et des témoins. Cependant, ce pic de carbone organique disparaît en année 4, où les buttes riches en MO ne sont plus significativement différentes des buttes en terre et des témoins, bien qu'elles conservent des médianes plus élevées. Cette tendance est également observée pour le rapport C/N.

En revanche, dans l'horizon 1, aucun pic n'est observé pour la quantité de carbone organique ni pour le rapport C/N.

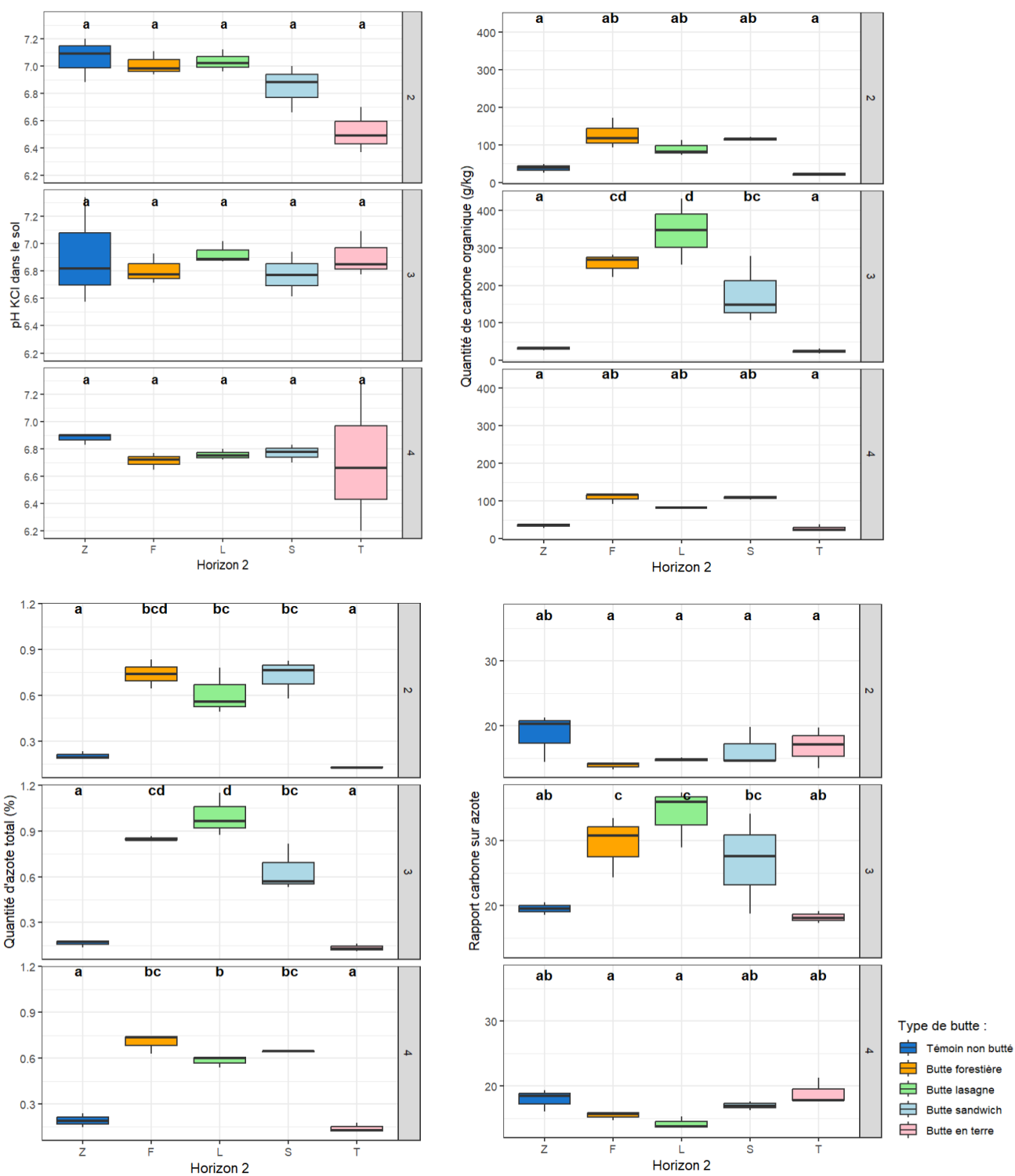


Figure 22 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, pour l'horizon 2, pour chaque année (1= 2021, 2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

## 4.2.3 Caractéristiques biologiques du sol

### 4.2.3.1 Taux d'émission de CO<sub>2</sub>

L'analyse statistique du taux d'émission de CO<sub>2</sub> de l'année 2 et 3 dans l'horizon 1, ne révèle pas de différences significatives (Figure 23). Les valeurs de respiration observées sont similaires entre les deux années, variant de 0,45 à 1 µg CO<sub>2</sub>-C/g/h.

Dans l'horizon 2, les buttes riches en MO présentent un taux de CO<sub>2</sub> plus élevé comparativement aux buttes en terre et aux témoins.

En année 3 dans l'horizon 2, les buttes riches en MO sont rassemblées dans le même groupe, mais ne sont pas significativement différentes des buttes en terre et des témoins.

En année 4 dans l'horizon 2, les buttes forestières et sandwiches ont un taux de CO<sub>2</sub> significativement plus élevé que les buttes en terre et les témoins. Les buttes lasagnes ne présentent pas de différences significatives par rapport aux autres types de buttes.

Entre les années 3 et 4, une augmentation de la respiration est observée dans les buttes forestières et sandwiches, avec un taux passant de 1,2-1,5 µg CO<sub>2</sub>-C/g/h en 2023 à 2,0-2,7 µg CO<sub>2</sub>-C/g/h en 2024.

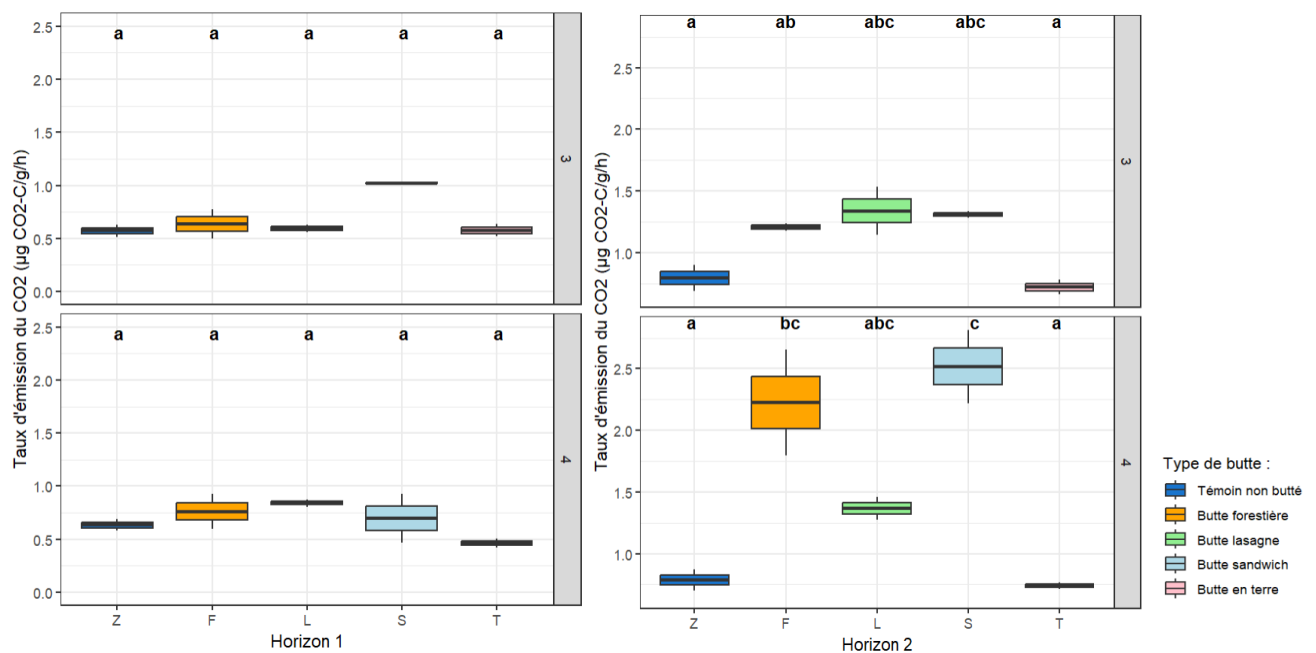


Figure 23 : Taux de CO<sub>2</sub> émis (µg CO<sub>2</sub>-C/g/h), selon le type de butte, séparé par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux de CO<sub>2</sub> (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2 Analyse de l'activité enzymatique par fluorescence avec la FDA

L'analyse statistique de l'activité enzymatique de la FDA pour les années 3 et 4 dans chaque horizon ne met pas en évidence de différences significatives (Figure 24). Dans l'horizon 2, les buttes riches en MO présentent une activité enzymatique plus élevée que les buttes en terre et les témoins. Dans l'horizon 1, l'activité enzymatique n'est pas significativement différente entre les buttes riches en MO et les buttes en terre ainsi que les témoins non buttés. Les buttes en terre et les témoins montrent des activités enzymatiques similaires pour les horizons 1 et 2, au cours des deux années étudiées.

Les buttes riches en MO affichent une activité enzymatique plus élevée en année 3 (environ 500 nmols/g de sol sec/h) par rapport à l'année 4 (environ 250 nmols/g de sol sec/h), à l'exception de la butte lasagne, qui présente un pic en année 4 avec une grande variabilité (750-1 000 nmols/g de sol sec/h).

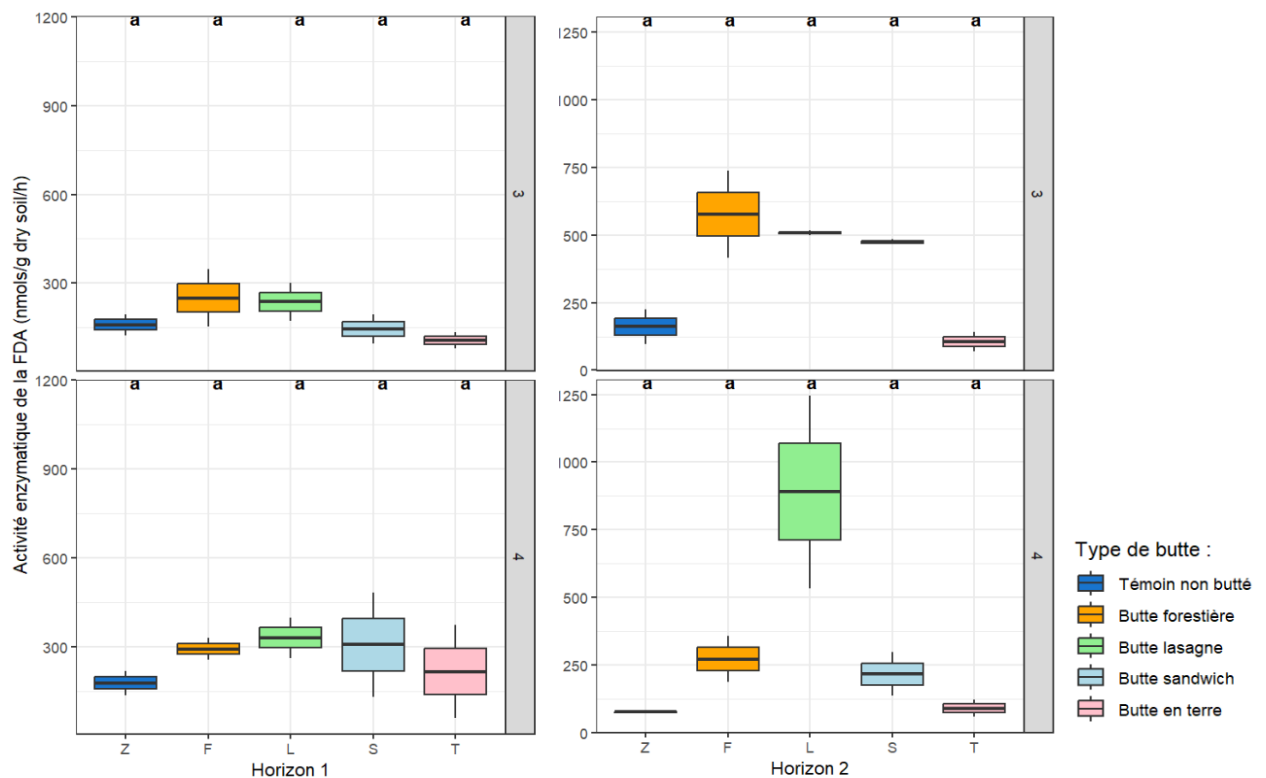


Figure 24 : Activité enzymatique de la FDA selon le type de butte, séparée par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur l'activité enzymatique mesurée (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



#### 4.2.3.3 Quantification des bactéries et champignons du sol par qPCR

La compilation des résultats du nombre de gènes bactériens (16S) révèle des tendances différentes en fonction des années et des buttes, bien qu'il n'y ait pas de différences significatives.

Dans l'horizon 1, les buttes possèdent des nombres de copies très similaires en année 3. La 4<sup>e</sup> année, des différences se marquent entre les buttes forestières et sandwiches face aux autres buttes (Figure 25).

Dans l'horizon 2, les buttes riches en MO se distinguent des buttes en terre et des témoins pour l'année 3. En année 4, les boxplots sont écrasés pour les buttes forestières, sandwiches et témoins.

La compilation du nombre de gènes fongiques se trouve en annexe (Annexe 16), ainsi que le rapport 18S/16S (Annexe 17). Une grande différence de valeurs existe entre l'année 3 et 4, ce qui écrase les boxplots de l'année 4 et empêche la lisibilité de ces graphiques. Les valeurs de gènes fongiques sont de l'ordre de  $10^4$ - $10^5$  en année 4, alors qu'on a un nombre de gènes de l'ordre de  $10^8$  pour l'année 3.

Le graphique en horizon 2 de l'année 2024 est différent de celui exposé plus haut (Figure 19). En effet, afin de comparer les deux années, la quantité de données de 2024 a dû être réduite pour ne considérer que les échantillons de sols communs avec 2023, ce qui diminue la robustesse et la variabilité dans ce graphique.

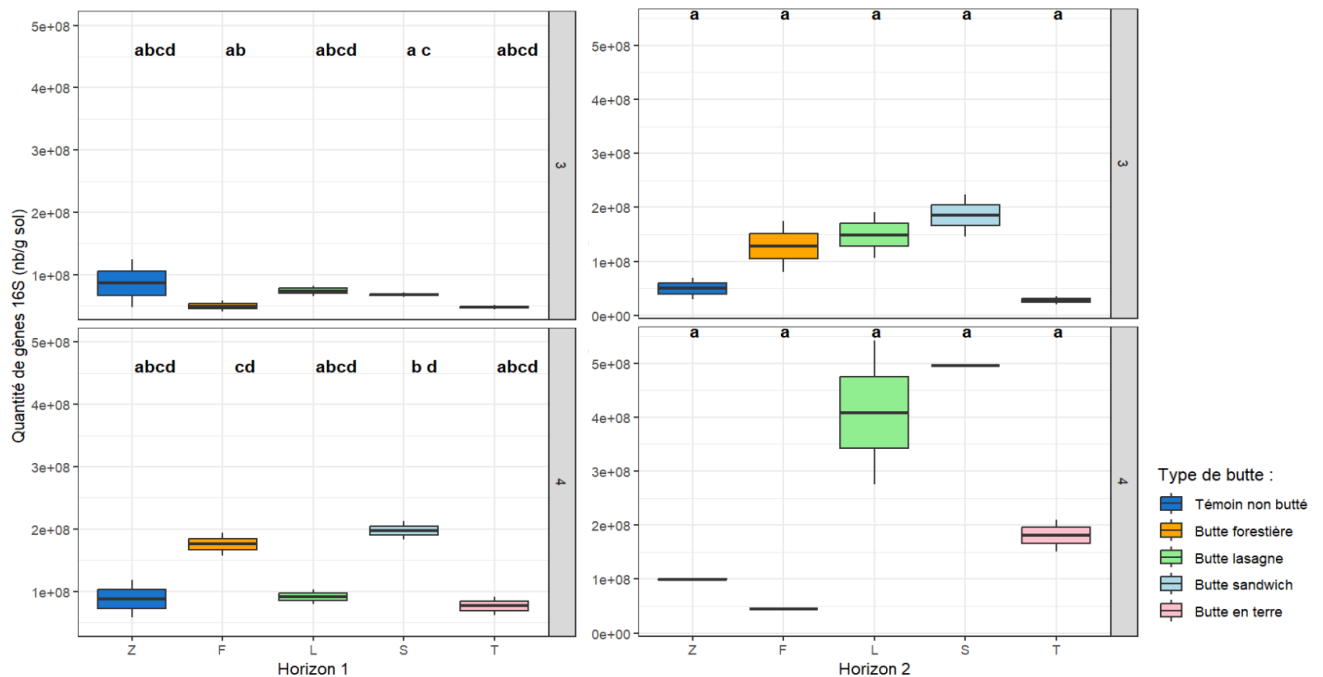


Figure 25 : Quantité de gènes bactériens (16S) selon le type de butte, séparée par horizon et par année (3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le nombre de gènes (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

## 4.2.4 Caractéristiques physiques du sol

### 4.2.4.1 Taux d'humidité du sol

L'analyse statistique du taux d'humidité du sol des buttes, illustrée sur ce graphique, a été réalisée sur la base des années 2 et 3. Les mesures ont été prises à trois positions distinctes sur les buttes : au sommet, sur le côté nord-ouest, et sur le côté sud-est, avec trois répétitions pour chaque position. L'analyse statistique révèle des différences significatives en fonction de la position de la prise de mesure (Figure 26). À l'exception des témoins non buttés, toutes les buttes présentent un taux d'humidité significativement plus élevé sur le versant nord-ouest qu'au sommet.

Les mesures d'humidité effectuées sur le côté sud-est ne présentent pas de différence significative par rapport à celles du versant nord-ouest pour aucune des buttes. Cependant, l'humidité est significativement plus élevée sur le côté sud-est par rapport au sommet pour les buttes forestières et les buttes en terre.

Les boxplots des témoins non buttés présentent les taux d'humidité les plus hauts (0,20-0,25 m<sup>3</sup> d'eau/m<sup>3</sup> de sol), et le moins de variabilité entre les positions. Les buttes en terre présentent les taux d'humidité les plus bas (0,12-0,20 m<sup>3</sup> d'eau/m<sup>3</sup> de sol).

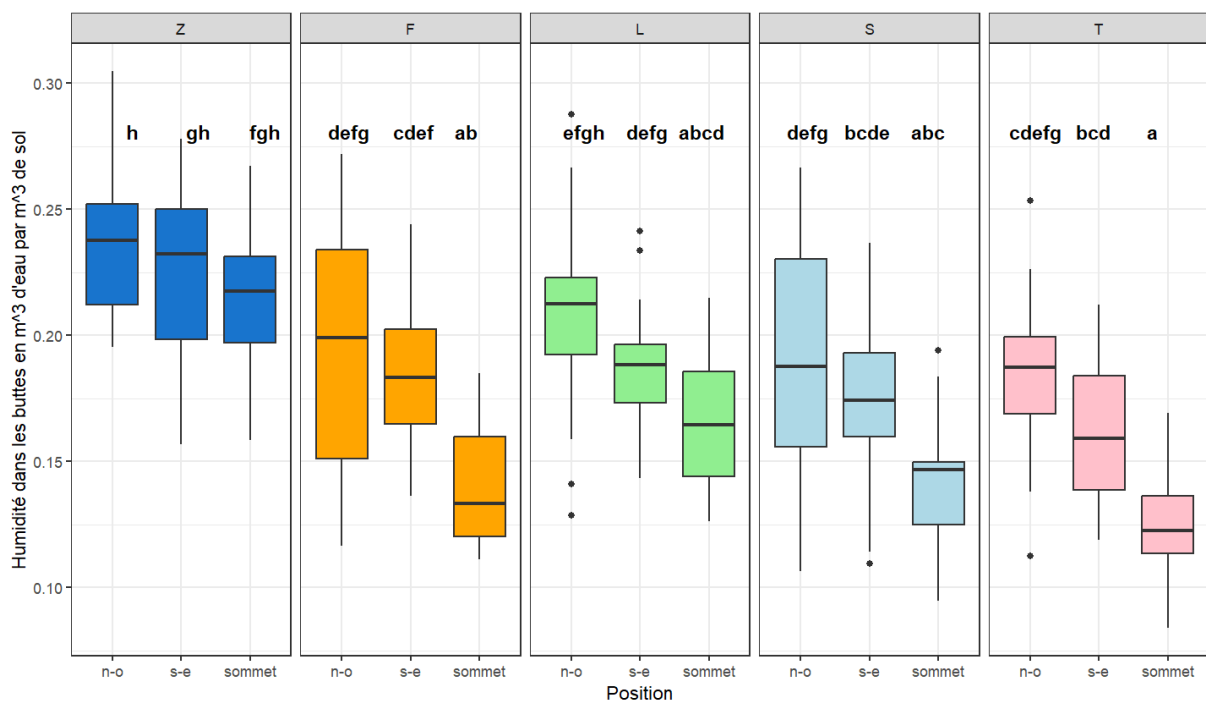


Figure 26 : Humidité dans le sol (m<sup>3</sup> d'eau/m<sup>3</sup> de sol), selon le type de butte, séparée par position. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur le taux d'humidité (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).

## 5 Discussion

---

En 2021, les buttes forestières et les buttes lasagnes ont présenté les biomasses les plus élevées pour toutes les cultures, à l'exception du fenouil, où les buttes en terre ont montré des performances supérieures. Les teneurs en éléments disponibles observées cette première année sont relativement faibles par rapport à celles des années suivantes, ce qui suggère que les communautés microbiennes ont pu progressivement se mettre en place la première année sans pouvoir suffisamment minéraliser la MO. Les premières années, les technosols construits mettent du temps à être recolonisés, comme l'indique Burrow et al. (2018), l'accès direct avec des corridors écologiques et des haies favoriserait la colonisation rapide. Les buttes de cet essai sont entourées de haies, de parcelles en friches et sont connectées au sol, ce qui a pu accélérer la colonisation des buttes par les organismes du sol.

Il semble que la faim d'azote observée dans les buttes sandwichs au cours des deux premières années se soit atténuée la troisième année et ait complètement disparu la quatrième année, leur permettant d'atteindre des rendements équivalents à ceux des buttes forestières et lasagnes la quatrième année.

Les buttes sandwichs sont principalement composées de matières carbonées et de branchages avec un rapport C/N élevé, variant de 50 pour de la paille jusqu'à 300 pour de l'écorce de bois (Idowu et al., 2023). Lors de l'apport initial de cette MO carbonée, l'activité métabolique des micro-organismes du sol est stimulée (Buysse et al., 2010). Pour dégrader la MO, les micro-organismes ont besoin d'une quantité proportionnelle d'azote inorganique qu'ils immobilisent à partir de la solution du sol si la matière organique n'en contient pas suffisamment. L'azote immobilisé par les micro-organismes limite alors la croissance des plantes, qui ont également besoin d'azote, créant ainsi une situation de « faim d'azote ». Cependant, ce ralentissement est temporaire. Les micro-organismes continuent de dégrader la matière organique, perdent du CO<sub>2</sub> par respiration, tout en stockant l'azote qu'ils libèrent à leur mort (Passicouset et al., 2021). L'analyse de l'émission de CO<sub>2</sub> indique d'ailleurs que les buttes sandwichs ont des taux nettement plus élevés en 2024 qu'en 2023 dans le 2<sup>e</sup> horizon, laissant suggérer que l'activité microbienne est plus importante en 2024, probablement en raison de la fin de l'immobilisation de l'azote. Il n'y a cependant pas de différences significatives entre les buttes riches en MO en 2023, dans l'horizon 2. Les faibles taux d'émission de CO<sub>2</sub> dans ces buttes comparés à l'année 2024 ne peuvent donc pas être entièrement attribués au phénomène de faim d'azote.

L'hypothèse selon laquelle les buttes sandwichs permettraient de doubler, voire tripler les rendements par rapport à une culture traditionnelle (Morez, 2018), semble rejetée durant les trois premières années de leur mise en place, mais cette possibilité se rapproche de la réalité la quatrième année. De plus, nos résultats contredisent complètement l'hypothèse de Hoffmann (2018) selon laquelle la première année donnerait des rendements élevés. Cependant, la butte sandwich dans l'exemple de Hoffmann (2018) contient une couche azotée (tonte, feuilles vertes, herbes) que les buttes sandwichs de cette étude ne possèdent pas, ce qui pourrait expliquer les différences observées et permettrait d'éviter le phénomène de faim d'azote.

Les taux d'émissions de CO<sub>2</sub> mesurés en 2023 et 2024 varient de 0,45 à 2,7 µg CO<sub>2</sub>-C/g/h, ce qui est cohérent avec ce qui est observé dans la littérature. En effet, les taux de respiration des buttes se rapprochent plus des sols de prairies ou de forêts que ceux de grandes cultures, d'après l'étude de Creamer et al. (2016), sur les sols d'Europe. Les taux de respiration au sein de l'horizon 2 indiquent des différences entre les buttes riches en MO et les buttes en terre et les témoins. Ces différences sont plus marquées en 2024 qu'en 2023.

Nous observons les mêmes tendances entre les buttes selon la teneur en carbone organique total (COT), qui est plus élevée dans les buttes lasagnes en 2023 et dans les buttes forestières et sandwichs en 2024. Cette corrélation entre le COT et les taux de respiration est cohérente avec les conclusions de Creamer et al. (2016), suggérant que l'activité microbienne carbonée dépend de la quantité de COT, laquelle est influencée par les pratiques culturales. C'est également ce que conclut Francioli et al. (2016), révélant que le COT est l'un des principaux facteurs influençant l'activité microbienne du sol, l'apport d'amendements organiques faisant augmenter les taux de COT. Le sol des buttes aurait donc un potentiel métabolique plus élevé. En effet, en Wallonie, le taux d'émission de CO<sub>2</sub> des sols en agriculture de conservation oscille autour des 0,5 µg CO<sub>2</sub>-C/g/h (Vincent et al., 2019) et la moyenne du COT dans les sols cultivés, entre 2015-2020, était de 13,3 gC/kg (SPW, 2020), soit bien en dessous de nos valeurs de 100gC/kg dans les buttes riches en MO.

Lors de la 3<sup>e</sup> année, un pic du taux du COT est observé dans les buttes riches en MO, qui disparaît complètement la 4<sup>e</sup> année. En 2023, les échantillons de sol analysés avaient été tamisés, mais non broyés, ce qui suggérerait que certains fragments carbonés avaient pu être omis lors des analyses. Les résultats de 2024 sont inattendus, car le taux de COT est revenu à des niveaux comparables à ceux de 2022. Cependant, les prélèvements de 2023 ont été effectués plus tôt dans l'année (2 mai) par rapport aux autres années (18 mai en 2022 et 10 mai en 2024). De plus, les températures moyennes du mois précédant le prélèvement étaient plus basses en 2023 (9°C) comparativement aux deux autres années (IRM, 2024). Ces conditions climatiques plus fraîches pourraient avoir contribué à une diminution de l'activité microbienne et par conséquent, à une réduction de la décomposition du COT (Lehmann et al., 2015) celui-ci s'étant accumulé progressivement, laissant apparaître des taux de COT plus élevés. Les quantités d'azote total sont également plus élevées lors de la troisième année, bien que cette augmentation soit moins marquée que le pic observé pour le COT.

On observe des tendances similaires avec les taux d'émissions de CO<sub>2</sub>, qui sont inférieurs en 2023 à ceux de 2024 dans l'horizon 2, pour les buttes forestières et sandwichs. Ces observations peuvent donc partiellement soutenir l'hypothèse que la baisse de respiration microbienne en 2023 pourrait être attribuée aux températures plus fraîches précédant l'échantillonnage, réduisant l'activité des micro-organismes. Vincent et al. (2019) rapportent d'ailleurs des différences significatives dans la respiration potentielle selon la saison culturale, avec des valeurs mesurées plus faibles en avril par rapport à juin. Ali et al. (2018) constatent que l'augmentation de la température a stimulé les taux de respiration cumulés. Une autre hypothèse serait que les prélèvements, effectués chaque année par des personnes différentes, dans des buttes de composition hétérogène et à des emplacements distincts, entraîneraient des résultats fluctuant d'une année à l'autre.

Entre 2023 et 2024, une diminution de l'activité microbienne de la FDA est constatée dans les buttes forestières et sandwichs. Cette réduction pourrait être attribuée à une diminution de la MO disponible, limitant ainsi la présence des enzymes nécessaires à cette décomposition. En revanche, le pic observé dans les buttes lasagnes, en 2024, pourrait être expliqué par l'ajout d'une nouvelle couche de MO dans ces buttes, augmentant ainsi le taux de MO fraîche et stimulant l'activité microbienne globale. Sánchez-Monedero et al. (2008) rapportent avoir observé une augmentation de la fluorescence de l'hydrolyse de la FDA lors de l'ajout d'amendement organique. Les différences observées entre les tendances de la FDA et celles de la minéralisation du carbone suggèrent qu'elles mesurent des aspects distincts de l'activité microbienne, comme l'ont également rapporté Sánchez-Monedero et al. (2008).

En 2024, les buttes lasagnes présentent une plus grande quantité de gènes microbiens dans l'horizon 2, en accord avec les tendances observées dans l'hydrolyse de la FDA. Cette abondance de gènes semble corrélée à l'activité enzymatique mesurée par la FDA, similairement aux résultats rapportés par Yuan et al. (2017), qui, lors de l'analyse de 5 sols agricoles, ont testé différents paramètres et ont trouvé une corrélation positive entre l'hydrolyse de la FDA et la quantité de gènes bactériens. De plus, Su et al. (2021) ont observé que la fertilisation organique augmente non seulement l'abondance des bactéries transcriptionnellement actives dans le sol, mais également celle des gènes associés au métabolisme énergétique et à la dégradation de la MO. Les buttes sandwiches se classent en deuxième position après les buttes lasagnes, et la grande quantité de gènes 16S appuie l'hypothèse selon laquelle la faim d'azote serait passée.

Concernant les gènes fongiques, une réduction drastique du nombre de copies de gènes 18S est observée entre 2023 et 2024, ce qui est surprenant. L'application 11 jours avant l'échantillonnage des sols, de granules anti-limaces à base de phosphate de fer (1%), pourrait avoir influencé les communautés fongiques. Li et al. (2022) ont observé une diminution des communautés fongiques de la rhizosphère dans des sols proches de mines de phosphates, suggérant un effet potentiel des phosphates sur les champignons. Bien que le fer soit essentiel à la croissance des champignons, il peut devenir toxique en générant des radicaux oxygénés, ce qui conduit souvent à son stockage dans des vacuoles pour éviter cette toxicité (Li & Ward, 2018). Certaines études indiquent que le fer peut être toxique pour certains champignons, plus spécifiquement pour *S. cerevisiae* et des champignons pathogènes (Robinson et al., 2021). Cependant, il existe peu de recherches sur les effets du phosphate de fer sur la biomasse fongique du sol.

En 2024, à l'exception de la culture des épinards, aucune différence significative n'a été observée entre les moyennes des biomasses des différents types de buttes. Cependant, des tendances similaires ont été observées pour toutes les biomasses des différentes cultures, qu'elles soient fraîches ou sèches. Les buttes riches en MO, soit les buttes forestières, lasagnes et sandwiches, présentent des rendements moyens et des variabilités plus élevées que les buttes en terre et les témoins. Le contenu riche en MO de ces buttes pourrait donc expliquer les rendements plus élevés.

En comparant les valeurs moyennes des rendements de 2024 des buttes avec celles des cultures conventionnelles du CIM, on observe que les rendements des buttes en terre et des témoins sont inférieurs à la moyenne pour toutes les cultures. En ce qui concerne les épinards, les rendements des buttes riches en MO se situent dans la moyenne des rendements des cultures conventionnelles, tandis que pour les cultures d'oignons tiges et de fenouil, les buttes riches en MO dépassent les rendements moyens des cultures conventionnelles. Pour effectuer une comparaison véritablement exhaustive des rendements entre ces différents systèmes, il serait pertinent de prendre en compte le temps de travail par mètre carré de culture, ainsi que les coûts associés à chaque système.

Les résultats des analyses chimiques du sol de 2023 et 2024 révèlent une différence marquée entre les horizons des sols des buttes forestières, lasagnes et sandwiches, indiquant que la séparation des horizons basée sur des critères visuels a été pertinente. Dans les buttes riches en MO, les teneurs en éléments disponibles sont inversées par rapport à celles des buttes en terre et des témoins. En effet, l'horizon 2 des buttes riches en MO présente des valeurs plus élevées en éléments disponibles que l'horizon 1, contrairement aux témoins et buttes en terre où le premier horizon est le plus riche, ce qu'on observe généralement dans des sols non-construits (Reece et al., 2011). Cela pourrait s'expliquer par la teneur élevée en MO à l'intérieur des buttes, qui se dégrade progressivement, libérant des éléments nutritifs.

C'est également ce qu'observent Grard et al. (2020) dans leurs technosols similaires à des buttes lasagnes, attribuant la richesse en éléments disponibles, ainsi qu'en carbone et azote dans les horizons inférieurs, au transfert des particules et solutés par gravité, par lessivage ou par l'activité des vers de terre.

À l'inverse, dans les buttes en terre et les témoins, la différence visuelle entre les horizons n'était pas évidente. Et d'après les analyses chimiques, le taux de respiration microbienne et la quantité de gènes bactériens et fongiques montrent peu de variations entre les horizons, ce qui est attendu compte tenu de l'homogénéité de ces buttes. Dans ces buttes, les teneurs plus élevées se trouvent généralement dans l'horizon 1 en raison du fait que le seul apport en MO provient de la surface, avec des paillis et des résidus d'engrais vert laissés au sol.

Dans l'horizon 1 en 2024, les buttes lasagnes se distinguent des autres buttes par les teneurs les plus basses pour le P, Mg, Ca ainsi que pour le taux de COT et d'azote total. La nouvelle couche (tonte, paille, terre) des buttes lasagnes appliquée en automne 2023 pourrait expliquer ce déficit. En effet, la terre ajoutée par-dessus les buttes provenait d'un talus vieux de plusieurs années, avec probablement peu de micro-organismes. Contrairement aux autres buttes ayant accueilli des cultures depuis plusieurs années, reçu du paillage et des engrais verts, la nouvelle couche des buttes lasagnes aura besoin de plus de temps pour que les processus pédogénétiques se mettent en place. De plus, on observe en année 4 une teneur moins élevée dans les buttes lasagnes comparé aux buttes forestières et sandwichs dans les taux de COT, azote total et des éléments disponibles dans l'horizon 2. En 2023, ces paramètres étaient plus élevés dans les buttes lasagnes. Cela peut également s'expliquer par l'apport de la nouvelle couche, l'horizon 1 des buttes lasagnes en 2023 serait devenu l'horizon 2 en 2024 après l'apport d'une nouvelle couche. L'horizon 1 en 2023 des buttes lasagnes avait des valeurs moins élevées que dans l'horizon 2.

Dans l'horizon 2, les valeurs observées dans toutes les buttes, toutes années confondues, sont plus élevées que les valeurs de référence fournies par le laboratoire de La Hulpe. Cette différence peut être expliquée en partie par la composition des buttes, qui reposent sur un sol d'ancienne prairie et de verger, probablement déjà riche en éléments nutritifs dès le départ. De plus, les pratiques culturales jouent un rôle crucial : le sol des buttes n'est pas travaillé, un paillage est appliqué à la fin de chaque saison pour protéger le sol, et des engrais verts sont semés chaque automne, contribuant ainsi à la conservation et à l'amélioration de la fertilité du sol (Khangura et al., 2023). Ces pratiques favorisent également une meilleure activité enzymatique (Sharma et al., 2010), ce qu'on observe avec les résultats de la respiration microbienne, comparés plus haut avec des sols en agriculture de conservation. Une étude similaire menée à La Ferme du Bec Hellouin (de Tombeur et al., 2018) révèle des résultats comparables pour les éléments disponibles dans leurs buttes surélevées, composées de de fumier de cheval composté pendant 5 à 10 ans (Tableau 4). Les auteurs attribuent ces valeurs élevées à la minéralisation des apports de MO.

Tableau 4 : Tableau reprenant les éléments disponibles et échangeables dans le sol (de Tombeur et al., 2018).

Plot name	Bioavailable elements (mg 100 g <sup>-1</sup> )				Exchange complex (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )					BS (%)
	P	K	Mg	Ca	CEC	Ca	Mg	K	Na	
Pasture	1.4(0.3) <sup>b</sup>	6.0(1.1) <sup>b</sup>	11.6(1.2) <sup>c</sup>	356.2(77.0) <sup>bc</sup>	32.6(2.5) <sup>a</sup>	26.4(8.9) <sup>a</sup>	1.7(1.4) <sup>ab</sup>	0.7(1.0) <sup>a</sup>	0.2(0.2) <sup>a</sup>	89.6(36.9) <sup>a</sup>
Permaculture forest garden	45.4(18.6) <sup>a</sup>	60.3(9.0) <sup>a</sup>	39.8(7.9) <sup>ab</sup>	877.4(257.9) <sup>ab</sup>	30.1(2.4) <sup>a</sup>	30.1(2.6) <sup>a</sup>	2.8(1.0) <sup>a</sup>	1.1(0.3) <sup>a</sup>	0.2(0.0) <sup>a</sup>	100.0(11.2) <sup>a</sup>
Permaculture mounds	23.1(2.9) <sup>ab</sup>	49.5(3.1) <sup>ab</sup>	32.8(0.3) <sup>b</sup>	796.4(25.0) <sup>b</sup>	32.4(2.8) <sup>a</sup>	35.2(2.0) <sup>a</sup>	2.7(0.1) <sup>ab</sup>	0.8(0.1) <sup>a</sup>	0.2(0.1) <sup>a</sup>	100.0(14.0) <sup>a</sup>
Permaculture beds	42.7(9.0) <sup>a</sup>	54.1(36.0) <sup>a</sup>	47.0(2.3) <sup>a</sup>	1346.6(347.6) <sup>a</sup>	33.4(2.5) <sup>a</sup>	35.3(2.6) <sup>a</sup>	3.4(0.2) <sup>a</sup>	1.1(0.6) <sup>a</sup>	0.2(0.1) <sup>a</sup>	100.0(13.7) <sup>a</sup>
Conventional agriculture	3.6(0.6) <sup>b</sup>	8.9(0.7) <sup>b</sup>	7.9(0.9) <sup>c</sup>	201.8(57.9) <sup>c</sup>	11.2(0.6) <sup>b</sup>	9.5(1.7) <sup>b</sup>	0.7(0.1) <sup>b</sup>	0.3(0.1) <sup>a</sup>	0.2(0.0) <sup>a</sup>	94.6(7.6) <sup>a</sup>

Means with various letters are significantly different at the 95% confidence level (LSD Tukey); errors associated with the mean (n = 3) given in parentheses (standard deviation).

Sans tenir compte des pics de COT et d'azote total observés en 2023, ces éléments sont plus élevés pour toutes les années dans les buttes riches en MO. L'enfouissement de la MO, par rapport à l'utilisation d'engrais synthétiques, semble offrir l'avantage d'un relargage lent des nutriments et un risque réduit de lixiviation. Cependant, la baisse des teneurs en éléments disponibles observée cette année, nécessite une attention continue et le suivi les années prochaines.

Concernant la compilation des taux d'humidité du sol pour les années 2022-2023, une différence marquée est observée entre les buttes en terre et les témoins. Les témoins affichent un taux d'humidité plus élevé que celui des autres buttes à chaque position. Ils présentent également le moins de variations d'humidité entre les différentes positions, ce qui suggère une meilleure rétention d'humidité, mais une moindre capacité de drainage.

Dans toutes les buttes, le côté nord-ouest présente le taux d'humidité le plus élevé, car il est mieux protégé des vents dominants venant du sud-ouest (IRM, 2024) ainsi que des rayons du soleil, ce qu'observe également Hazan et al. (2020) dans leurs buttes constituées de MO, bois et sol. Wallner (2019) a suggéré que la forme en butte favorise le réchauffement du sol en surface, grâce à une meilleure captation des rayons du soleil. Cette observation se confirme dans cette étude, le sommet des buttes apparaît systématiquement plus sec que les deux autres versants.

Enfin, les buttes forestières, lasagnes et sandwichs présentent des taux d'humidité intermédiaires entre ceux des buttes en terre et des témoins. Leur richesse en MO semble corroborer l'hypothèse selon laquelle un taux plus élevé de MO favorise une meilleure rétention d'eau et une meilleure infiltration (Deeb et al., 2020; Lal, 2020). Cela justifie que les buttes permacoles riches en MO aient une capacité de rétention d'eau améliorée, comme l'a également observé Laffoon (2016) dans les buttes hügel, similaires aux buttes forestières.

## 6 Conclusion et perspectives

---

Ce mémoire s'inscrit dans un projet de recherche de longue durée, lancé en 2021, pour évaluer la qualité des sols dans quatre types de buttes par rapport à des témoins non buttés. L'étude a porté sur l'analyse des indicateurs de qualité des sols, physiques, chimiques et biologiques ainsi que sur la biomasse aérienne de cinq légumes différents.

Les résultats de l'année 2024 indiquent que les buttes riches en MO sont plus productives que les buttes en terre et les témoins non buttés. Les rendements plus élevés peuvent s'expliquer par des teneurs plus importantes en éléments nutritifs disponibles, en carbone organique et en azote total dans l'horizon 2, où se concentre la majorité de la MO. L'activité microbienne de minéralisation carbonée est aussi plus intense dans ces buttes au même horizon. De plus, les rendements en oignons et fenouils des buttes riches en MO, surpassent les rendements moyens de l'agriculture conventionnelle en Wallonie. Quant aux buttes sandwichs, elles ont été marquées par une faim d'azote les premières années, mais celle-ci semble s'être atténuée, ce qui permet désormais d'obtenir des rendements équivalents à ceux des autres buttes.

En ce qui concerne l'humidité, les témoins non buttés affichent une teneur plus élevée que les buttes riches en MO, elles-mêmes plus humides que les buttes en terre. Cela présente un intérêt potentiel pour la conservation de l'humidité, notamment dans des zones arides. L'utilisation permanente de sondes mesurant l'humidité ainsi que la température en temps réel sur une plus longue période améliorerait la précision des résultats, car la méthode actuelle est limitée par la nécessité d'avoir plusieurs jours secs consécutifs pour les prélèvements.

Cette année, l'analyse par qPCR a révélé une baisse significative de la quantité de gènes fongiques, potentiellement due à l'utilisation de produits anti-limaces (phosphate ferrique). Cette hypothèse nécessite la répétition des expériences pour valider ces observations et un séquençage serait utile pour identifier les champignons encore présents.

Les tests enzymatiques, de respiration et de quantification bactérienne indiquent des résultats parfois différents, ce qui est logique, car ils mesurent différents aspects de l'activité microbienne. Il serait intéressant de cibler des gènes fonctionnels spécifiques, liés à la minéralisation de l'azote, par exemple, afin d'apporter plus d'informations sur les populations microbiennes. Des gènes d'enzymes spécifiques tels que les uréases, protéases et glucosaminidases peuvent être ciblés afin de compléter l'information quantitative de la présence des gènes bactériens apportée par la qPCR (Ouyang & Norton, 2020).

De plus, il serait utile de s'intéresser plus en détail sur les propriétés physiques de ces nouveaux sols. Les études sur les technosols construits ciblent souvent la porosité (Yilmaz et al., 2018), la densité apparente (Rokia et al., 2014) et la répartition de la MO dans les agrégats du sol (de Tombeur et al., 2018), qui sont des paramètres cruciaux pour l'étude de la qualité des sols.

Pour les prochaines années, il serait pertinent de poursuivre l'étude avec les mêmes paramètres et, surtout, les mêmes buttes échantillonnées afin de garantir la cohérence des données. L'analyse du temps passé sur les buttes permettrait de comparer plus efficacement les rendements et les efforts avec ceux de l'agriculture conventionnelle. De plus, une évaluation des coûts de création et d'entretien des cultures sur buttes par rapport à l'agriculture conventionnelle est nécessaire pour envisager une application à grande échelle ou une commercialisation.



La mise en place des buttes demande un investissement en temps considérable et, certaines structures, comme les buttes en sandwich, nécessitent trois ans pour atteindre un rendement optimal. De plus, les buttes ne conviennent qu'à certaines cultures et ne permettent pas de cultiver des céréales ni des arbres fruitiers ou des légumes de grandes cultures (maïs, pommes de terre, etc), limitant ainsi leur capacité à nourrir une population à grande échelle. Cependant, elles présentent un intérêt pour la végétalisation urbaine et la production locale de nourriture, surtout si leur composition est issue de résidus trouvés localement, par exemple de parcs et jardins.

En conclusion, cette étude fournit une première quantification des avantages offerts par les buttes, renforçant leur visibilité et crédibilité tout en contribuant à la recherche sur l'agriculture alternative. Les buttes montrent un potentiel prometteur pour répondre aux défis de l'agriculture durable, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour optimiser leur efficacité et leur applicabilité à grande échelle. En effet, les thèmes de la permaculture ainsi que des technosols construits sont encore rares dans la littérature scientifique.

## 7 Contribution personnelle

---

Au cours de ce travail de fin d'études, j'ai planté et récolté toutes les cultures et désherbé les buttes à plusieurs reprises. J'ai également collecté les échantillons de sol pour effectuer les analyses de respiration microbienne, de quantification des gènes bactériens et fongiques et de l'activité enzymatique via l'hydrolyse de la FDA.

J'ai aussi nettoyé les données des années précédentes, corrigé les éventuelles erreurs dans les fichiers de calcul, intégré mes propres données et réalisé les analyses statistiques de 2021 à 2024. Enfin, j'ai interprété les résultats et rédigé ce mémoire.

## 8 Bibliographie

---

- Abéguilé, L. (2020, novembre 5). *Vidéo permaculture : Emilia Hazelip, un jardin/potager synergétique - PLaisible*. <https://www.plaisible.com/video/video-jardin-emilia-hazelip-permaculture-appliquee-au-potager/>
- Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7), 943-951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
- AFES. (2008). *Référentiel Pédologique*. éditions Quae. [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers15-05/010063397.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers15-05/010063397.pdf)
- Ahirwal, J., & Pandey, V. C. (2021). Restoration of mine degraded land for sustainable environmental development. *Restoration Ecology*, 29(4), e13268. <https://doi.org/10.1111/rec.13268>
- Ali, R. S., Poll, C., & Kandeler, E. (2018). Dynamics of soil respiration and microbial communities : Interactive controls of temperature and substrate quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.010>
- Amin, B. A. Z. (2012). *Rôle des enzymes lignocellulolytiques dans le processus de biodégradation de résidus végétaux dans les sols : Influence de la qualité des résidus sur l'efficacité des enzymes et leur dynamique* [These de doctorat, Reims]. <https://theses.fr/2012REIMS029>
- Arvalis. (2022, juillet 21). *Analyse de terre—La matière organique du sol, un indicateur à suivre, pas forcément à corriger*. ARVALIS. <https://www.arvalis.fr/infos-techniques/la-matiere-organique-du-sol-un-indicateur-suivre-pas-forcement-corriger>
- Bas, D. (2024). *L'urbanisation et les familles | Nations Unies*. Nations Unies; United Nations. <https://www.un.org/fr/chronique-onu/l%E2%80%99urbanisation-et-les-familles>
- Bogdanowicz, R. (2017, janvier 13). *Hügelkultur*. The Permaculture Research Institute. <https://www.permaculturenews.org/2017/01/13/hugelkultur/>
- Burrow, C., Pernin, C., & Lepretre, A. (2018). Influence of connectivity & topsoil management practices of a constructed technosol on pedofauna colonization : A field study. *Applied Soil Ecology*, 123, 416-419. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.001>
- Buyse, P., & Aubinet, M. (2010). La respiration hétérotrophe dans les sols agricoles : Description des facteurs importants et comparaison de modèles semi-mécanistes existants. *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6552>
- Campbell, C., Chapman, S., & Davidson, M. (2017, octobre). *MicroResp™ Technical Manual*. James Hutton Ltd.

- Centemeri, L. (2023). L'émergence d'une " société civile écologique " : Le mouvement de la permaculture (1978–2017). *The Tocqueville Review/La revue Tocqueville*, 44(1), 113-136. <https://doi.org/10.3138/ttr.44.1.113>
- Chartin, C., Inken Kruger, Antoine Stevens, Bas Van Wesemael, & Monique Carnol. (2015, janvier). *Carbone organique, biomasse et activité microbienne des sols : Vers un indicateur de la qualité des sols en Wallonie—Subvention CARBIOSOL*.
- Cheval, P. (2023). *Construction de Technosols fonctionnels et fertiles à partir de matériaux, déchets et sous-produits urbains pour un usage en micro-maraîchage bio-intensif* [Phdthesis, Université de Lille]. <https://theses.hal.science/tel-04245016>
- Collie, S. (2024, janvier 22). *Hugelkultur : What It Is and Why You Should Transition to Mounded Beds*. Seeds 'N Such. <https://seedsnsuch.com/blogs/gardeners-greenroom/hugelkultur-what-it-is-and-why-you-should-transition-to-mounded-beds>
- Commission Européenne. (2002, avril 16). *Communication de la commission au conseil, au parlement européen, au comité économique et social et au comité des régions. Vers une stratégie thématique pour la protection des sols*. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2002:0179:FIN:FR:PDF>
- Cosentino, D. (2006). *Contribution des matières organiques À la stabilité de la structure des sols limoneux cultivés. Effet des apports organiques à court terme* [Institut national agronomique de Paris-Grignon]. [https://www.researchgate.net/publication/29974705\\_Contribution\\_des\\_matières\\_organiques\\_À\\_la\\_stabilité\\_de\\_la\\_structure\\_des\\_sols\\_limoneux\\_cultivés\\_effet\\_des\\_apports\\_organiques\\_à\\_court\\_terme](https://www.researchgate.net/publication/29974705_Contribution_des_matières_organiques_À_la_stabilité_de_la_structure_des_sols_limoneux_cultivés_effet_des_apports_organiques_à_court_terme)
- Cotrufo, M. F., & Lavelle, J. M. (2022). Chapter One - Soil organic matter formation, persistence, and functioning : A synthesis of current understanding to inform its conservation and regeneration. In D. L. Sparks (Éd.), *Advances in Agronomy* (Vol. 172, p. 1-66). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2021.11.002>
- Creamer, R. E., Stone, D., Berry, P., & Kuiper, I. (2016). Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied Soil Ecology*, 97, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.004>
- Deeb, M., Groffman, P. M., Blouin, M., Egendorf, S. P., Vergnes, A., Vasenev, V., Cao, D. L., Walsh, D., Morin, T., & Séré, G. (2020). Using constructed soils for green infrastructure – challenges and limitations. *SOIL*, 6(2), 413-434. <https://doi.org/10.5194/soil-6-413-2020>
- de Tombeur, F., Sohy, V., Chenu, C., Colinet, G., & Cornelis, J.-T. (2018). Effects of Permaculture Practices on Soil Physicochemical Properties and Organic Matter Distribution in Aggregates :

- A Case Study of the Bec-Hellouin Farm (France). *Frontiers in Environmental Science*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00116>
- Domenech, G. (2015, octobre 1). Le mythe de la butte de permaculture par Christophe Gatineau. *Jardinons Sol Vivant !* <https://jardinonssolvivant.fr/le-mythe-de-la-butte-de-permaculture-par-christophe-gatineau/>
- Du, J., Liu, W., & Zhou, Q. (2024). Combating the Food Crisis and Farmland Contamination with Safe Farming Practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(27), 15053-15054.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c04606>
- Dudal, R. (2004, août 3). *The sixth factor of soil formation*. International Conference on Soil Classification 2004, Petrozavodsk, Russia,.
- Estrada-Herrera, I. R., Hidalgo-Moreno, C., Guzmán-Plazola, R., Almaraz Suárez, J. J., Navarro-Garza, H., Etchevers-Barra, J. D., Estrada-Herrera, I. R., Hidalgo-Moreno, C., Guzmán-Plazola, R., Almaraz Suárez, J. J., Navarro-Garza, H., & Etchevers-Barra, J. D. (2017). Soil quality indicators to evaluate soil fertility. *Agrociencia*, 51(8), 813-831.  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952017000800813&lng=es&nrm=iso&tlng=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000800813&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
- Fabbri, D., Pizzol, R., Calza, P., Malandrino, M., Gaggero, E., Padoan, E., & Ajmone-Marsan, F. (2021). Constructed Technosols : A Strategy toward a Circular Economy. *Applied Sciences*, 11(8), 3432. <https://doi.org/10.3390/app11083432>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2024). *He State of Food Security and Nutrition in the World 2024 – Financing to end hunger, food insecurity and malnutrition in all its forms*. FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO; <https://doi.org/10.4060/cd1254en>
- FAO & ITPS. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Technical Summary*.  
[https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/newsroom/docs/FAO-world-soils-report-SUMMARY.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/FAO-world-soils-report-SUMMARY.pdf)
- Fenton, M., Albers, C., & Ketterings, Q. (2008). *Soil Organic Matter, Fact sheet41*. Cornell University.
- Ferguson, R. S., & Lovell, S. T. (2014). Permaculture for agroecology : Design, movement, practice, and worldview. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 251-274.  
<https://doi.org/10.1007/s13593-013-0181-6>
- Fiebrig, I., Zikeli, S., Bach, S., & Gruber, S. (2020). Perspectives on permaculture for commercial farming : Aspirations and realities. *Organic Agriculture*, 10(3), 379-394.  
<https://doi.org/10.1007/s13165-020-00281-8>
- Finzi, A. C., Austin, A. T., Cleland, E. E., Frey, S. D., Houlton, B. Z., & Wallenstein, M. D. (2011). Responses and feedbacks of coupled biogeochemical cycles to climate change : Examples

- from terrestrial ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9(1), 61-67.  
<https://doi.org/10.1890/100001>
- Foudral, M. (2011, octobre 25). Droit aux buttes. *Prise de Terre*.  
<https://prise2terre.wordpress.com/2011/10/25/droit-aux-buttes/>
- Fourvel, G. J., Vidal-Beaudet, L., Le Bocq, A., They, F., Brochier, V., & Cannavo, P. (2019). Fertility of Technosols constructed with dam sediments for urban greening and land reclamation. *Journal of Soils and Sediments*, 19(8), 3178-3192.  
<https://doi.org/10.1007/s11368-018-2077-1>
- Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., & Reitz, T. (2016). Mineral vs. Organic Amendments : Microbial Community Structure, Activity and Abundance of Agriculturally Relevant Microbes Are Driven by Long-Term Fertilization Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>
- Garcia, C., Nannipieri, P., & Hernandez, T. (2018). Chapter 9—The Future of Soil Carbon. In C. Garcia, P. Nannipieri, & T. Hernandez (Éds.), *The Future of Soil Carbon* (p. 239-267). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811687-6.00009-2>
- Gatineau, C. (2022, septembre 25). La butte de permaculture ou le mythe de l'abondance—Le Jardin vivant. *Le jardin vivant*. <https://www.lejardinvivant.fr/2022/09/25/la-butte-permaculture-ou-le-mythe-de-labondance/>
- Gayan, A., Nath, D., Bhattacharyya, B., & Dutta, N. (2020). Assessment of soil quality indicators under rice ecosystem of Assam, India. *Journal of Environmental Biology*, 41, 1655-1664.  
<https://doi.org/10.22438/jeb/41/6/SI-246>
- Genot, V., Colinet, G., Brahy, V., & Bock, L. (2009). L'état de fertilité des terres agricoles et forestières en région wallonne (adapté du chapitre 4—Sol 1 de " L'Etat de l'Environnement wallon 2006-2007 "). *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=3746%26format=print>
- Genot, V., Renneson, M., Colinet, G., Goffaux, M.-J., Cugnon, T., Toussaint, B., Buffet, D., & Oger, R. (2012). *Base de données sols de REQUASUD [3ème synthèse]*.
- Gerke, J. (2022). The Central Role of Soil Organic Matter in Soil Fertility and Carbon Storage. *Soil Systems*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/soilsystems6020033>
- Giller, K. E., Hijbeek, R., Andersson, J. A., & Sumberg, J. (2021). Regenerative Agriculture : An agronomic perspective. *Outlook on Agriculture*, 50(1), 13-25.  
<https://doi.org/10.1177/0030727021998063>
- Gourmet, C. (2023). *Contribution à l'étude de la fertilité de différents types de buttes d'inspiration permacole : Gros plan sur les propriétés biologiques du sol*. Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech.

- Grard, B. J.-P., Chenu, C., Manouchehri, N., Houot, S., Frascaria-Lacoste, N., & Aubry, C. (2017). Rooftop farming on urban waste provides many ecosystem services. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0474-2>
- Grard, B. J.-P., Manouchehri, N., Aubry, C., Frascaria-Lacoste, N., & Chenu, C. (2020). Potential of Technosols Created with Urban By-Products for Rooftop Edible Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093210>
- Grosbellet, C. (2008). *Evolution et effets sur la structuration du sol de la matière organique apportée en grande quantité*. Université d'Angers.
- Grossemey, O. (2023). *Evaluation de la fertilité de différents types de buttes permacoles—Contribution à l'étude de l'impact de la composition de buttes permacoles sur la vie du sol et la fertilité associée*. École Supérieure des Agricultures.
- Hazan, S., & Cowan, J. (2020). Establishing hügelkultur for season extension research, specialty crop production, and permaculture education. *Urban Food Systems Symposium*. <https://newprairiepress.org/ufss/2020/proceedings/24>
- Hodges, S. (2010). *Soil Fertility Basics : NC Certified Crop Advisor Training*. North Carolina State University. [https://www.online-pdh.com/file.php/562/FER\\_SG.pdf](https://www.online-pdh.com/file.php/562/FER_SG.pdf)
- Hoffmann, J. (2018, novembre 14). *Culture sur butte : Pourquoi et comment ? | DEFI-Écologique : le blog*. <https://blog.defi-ecologique.com/culture-sur-butte/>
- Holzer, S. (2011). *Sepp Holzer's Permaculture : A Practical Guide to Small-Scale, Integrative Farming and Gardening*. Chelsea Green Publishing. [https://books.google.be/books?hl=en&lr=&id=jNXK9kE-IOoC&oi=fnd&pg=PR9&dq=sepp+holzer&ots=XUzFXP5\\_hL&sig=LVOxxbewkn23sELsC5Lo0pkdLrw&redir\\_esc=y#v=onepage&q=sepp%20holzer&f=false](https://books.google.be/books?hl=en&lr=&id=jNXK9kE-IOoC&oi=fnd&pg=PR9&dq=sepp+holzer&ots=XUzFXP5_hL&sig=LVOxxbewkn23sELsC5Lo0pkdLrw&redir_esc=y#v=onepage&q=sepp%20holzer&f=false)
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050 : Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience*, 67(4), 386-391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Huot, H., Simonnot, M.-O., & Morel, J. L. (2015). Pedogenetic Trends in Soils Formed in Technogenic Parent Materials. *Soil Science*, 180(4/5), 182. <https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000135>
- Idowu, O., Pietrasiak, N., & Hoellrich, M. (2023). *Soil Biological Processes—Guide A-153 New Mexico State University ACES Cooperative Extension Service*.
- IRM. (2024). *Bilans climatologiques de 2024*. KMI. <https://www.meteo.be/fr/climat/climat-de-la-belgique/bilans-climatologiques/2024/juin>
- IUSS Working Group WRB. (2022). *World Reference Base for Soil Resources. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. 4th edition*.

- (International Union of Soil Sciences (IUSS)).  
[https://www.isric.org/sites/default/files/WRB\\_fourth\\_edition\\_2022-12-18.pdf](https://www.isric.org/sites/default/files/WRB_fourth_edition_2022-12-18.pdf)
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Jacques, F. (2021). *Evaluation de la fertilité de différents types de buttes de style permacole*. Gembloux Agro-Bio Tech Uliège.
- Kadijevic. (2024, mai 27). *Comment réaliser une culture en lasagne au jardin potager ?* <https://www.rustica.fr/permaculture/jardin-et-permaculture-comment-faire-lasagne,15180.html>
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., & Schuman, G. E. (1997). Soil Quality : A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61(1), 4-10.  
<https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Kaviya, N., Upadhayay, V. K., Singh, J., Khan, A., Panwar, M., & Singh, A. V. (2019). Role of Microorganisms in Soil Genesis and Functions. In A. Varma & D. K. Choudhary (Éds.), *Mycorrhizosphere and Pedogenesis* (p. 25-52). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6480-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6480-8_2)
- Keesstra, S. D., Bouma, J., Wallinga, J., Tiftonell, P., Smith, P., Cerdà, A., Montanarella, L., Quinton, J. N., Pachepsky, Y., van der Putten, W. H., Bardgett, R. D., Moolenaar, S., Mol, G., Jansen, B., & Fresco, L. O. (2016). The significance of soils and soil science towards realization of the United Nations Sustainable Development Goals. *SOIL*, 2(2), 111-128.  
<https://doi.org/10.5194/soil-2-111-2016>
- Khangura, R., Ferris, D., Wagg, C., & Bowyer, J. (2023). Regenerative Agriculture—A Literature Review on the Practices and Mechanisms Used to Improve Soil Health. *Sustainability*, 15(3), Article 3.  
<https://doi.org/10.3390/su15032338>
- Laffoon, M. (2016). A Quantitative Analysis Of Hugelkultur And Its Potential Application On Karst Rocky Desertified Areas In China. *Mahurin Honors College Capstone Experience/Thesis Projects*. [https://digitalcommons.wku.edu/stu\\_hon\\_theses/602](https://digitalcommons.wku.edu/stu_hon_theses/602)
- Lal, R. (2020). Soil organic matter and water retention. *Agronomy Journal*, 112(5), 3265-3277.  
<https://doi.org/10.1002/agj2.20282>
- Le Brabant wallon. (2023, janvier 23). *Méthodes d'analyses chimiques du CPAR*. Le Brabant wallon.  
<https://www.brabantwallon.be/vivre-en-bw/agriculture-et-jardins/laboratoires-et-analyses/nos-methodes-danalyses>



- Lehmann, J., & Kleber, M. (2015). The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528(7580), 60-68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Lemanceau, P. (2020, décembre 4). *La biodiversité des sols comme capital*. INRAE. <https://www.inrae.fr/actualites/biodiversite-sols-capital>
- Lerogeron, L. (2022). *Impact de la composition de différents types de buttes d'inspiration permacole sur la vie du sol et la fertilité associée*. Gembloux Agro-Bio Tech - Université de Liège.
- Li, L., & Ward, D. M. (2018). Iron toxicity in yeast : Transcriptional regulation of the vacuolar iron importer Ccc1. *Current Genetics*, 64(2), 413-416. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0767-7>
- Li, Q., Wu, Q., Zhang, T., Xiang, P., Bao, Z., Tu, W., Li, L., & Wang, Q. (2022). Phosphate mining activities affect crop rhizosphere fungal communities. *Science of The Total Environment*, 838, 156196. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156196>
- Lisetskii, F. N., Zemlyakova, A. V., & Kirichenko, A. D. (2018). Variability of Microbiota under Diverse Conditions of Soil Moistening. *Biology Bulletin*, 45(4), 337-344. <https://doi.org/10.1134/S106235901804009X>
- Meyer, A. (2020, janvier 1). *Hugelkultur : Self-Sustaining Garden Practice of the Ancients*. Lynchburg Living. <https://lynchburgliving.com/hugelkultur-self-sustaining-garden-practice-of-the-ancients/>
- Millennium Ecosystem Assessment (Program) (Éd.). (2005). *Ecosystems and human well-being : Synthesis*. Island Press.
- Morel, K., San Cristobal, M., & Léger, F. G. (2017). Small can be beautiful for organic market gardens : An exploration of the economic viability of French microfarms using MERLIN. *Agricultural Systems*, 158, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.08.008>
- Morez, R. (2018, mars). *L'agroécologie, gestion de la Terre nourricière*. [Chanson]. La fabrique citoyenne. <https://eco-dialogues.fr/invites/robert-morez/>
- Mustin, M. (1987). *Le Compost : Gestion de la matière organique*. F. Dubusc.
- Napoletano, P., Colombo, C., Di Iorio, E., Memoli, V., Panico, S. C., Ruggiero, A. G., Santorufo, L., Maisto, G., & De Marco, A. (2021). Integrated Approach for Quality Assessment of Technosols in Experimental Mesocosms. *Sustainability*, 13(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/su13169101>
- Nations Unies. (2015). *Transformer notre monde : Le Programme de développement durable à l'horizon 2030*. A/RES/70/1. <https://documents.un.org/doc/undoc/gen/n15/291/90/pdf/n1529190.pdf?token=BtmCE12Oqty32EZRuY&fe=true>

- Nieuwenhuijsen, M. J. (2021). Green Infrastructure and Health. *Annual Review of Public Health*, 42(Volume 42, 2021), 317-328. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-090419-102511>
- Nolan, T. (2016). *Raised Bed Revolution* (Cool Springs Press). Quarto Publishing Group USA.
- Olle Gardens. (2022, septembre 15). *History of Hügelkultur : How This Ancient Technique Inspired Raised Bed*. Olle. <https://www.ollegardens.com/blogs/olle-garden-tips/history-of-hugelkultur-how-this-ancient-technique-inspired-raised-bed-gardening>
- Ouyang, Y., & Norton, J. M. (2020). Short-Term Nitrogen Fertilization Affects Microbial Community Composition and Nitrogen Mineralization Functions in an Agricultural Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(5), e02278-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02278-19>
- Passicousset, J., Jeannotte, R., & Caron-Garant, E. (2021). *Santé des sols et changements climatiques : Pour une meilleure résilience*. 54(2), 10-13. <https://www.proquest.com/docview/2704307773/abstract/A5D3D0FE7F324DA1PQ/1>
- Patzel, N., Sticher, H., & Karlen, D. L. (2000). Soil Fertility—Phenomenon and Concept. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(2), 129-142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2624\(200004\)163:2<129::AID-JPLN129>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2624(200004)163:2<129::AID-JPLN129>3.0.CO;2-D)
- Pignatello, J. J. (1998). Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76-77, 445-467. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00055-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00055-4)
- Prosser, J. A., Speir, T. W., & Stott, D. E. (2011). Soil Oxidoreductases and FDA Hydrolysis. In *Methods of Soil Enzymology* (p. 103-124). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c6>
- QIAGEN. (2019, mai). *DNeasy®PowerSoil® Kit Quick-Start Protocol*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=3d576814-4f1e-4e26-9c94-57d5dc2bb60a&lang=en>
- Reece, Urry, Cain, Wasserman, Minorsky, & Jackson. (2011). *Campbell Biologie* (Pearson Education, Inc.).
- Richardson, A. E., Coonan, E., Kirkby, C., & Orgill, S. (2019). Soil organic matter and carbon sequestration. In J. Pratley & J. Kirkegaard (Éds.), *Australian agriculture in 2020* (p. 255-271). Australian Society of Agronomy. <https://www.csu.edu.au/research/grahamcentre/publications/e-books>
- Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., & Anike, F. N. (2021). Fungal–Metal Interactions : A Review of Toxicity and Homeostasis. *Journal of Fungi*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/jof7030225>

- Rokia, S., Séré, G., Schwartz, C., Deeb, M., Fournier, F., Nehls, T., Damas, O., & Vidal-Beaudet, L. (2014). Modelling agronomic properties of Technosols constructed with urban wastes. *Waste Management*, 34(11), 2155-2162. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.12.016>
- Romanowicz, K., Freedman, Z., Upchurch, R., Argiroff, W., & Zak, D. (2016). Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors : The influence of pH and soil moisture. *FEMS microbiology ecology*, 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw149>
- Ruiz, F., Cherubin, M. R., & Ferreira, T. O. (2020). Soil quality assessment of constructed Technosols : Towards the validation of a promising strategy for land reclamation, waste management and the recovery of soil functions. *Journal of Environmental Management*, 276, 111344. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111344>
- Sadegh-Zadeh, F., Abd Wahid, S., & Jalili, B. (2017). Sorption, degradation and leaching of pesticides in soils amended with organic matter : A review. *Advances in Environmental Technology*, 3(2), 119-132. <https://doi.org/10.22104/aet.2017.1740.1100>
- Sánchez-Monedero, M. A., Mondini, C., Cayuela, M. L., Roig, A., Contin, M., & De Nobili, M. (2008). Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils*, 44(6), 885-890. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0263-1>
- Schoenholtz, S. H., Miegroet, H. V., & Burger, J. A. (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality : Challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, 138(1), 335-356. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00423-0)
- Séré, G. (2018). *Mieux connaître la pédogenèse et le fonctionnement des Technosols pour optimiser les services écosystémiques rendus*. Université de Lorraine.
- Sharma, S., Ramesh, A., Sharma, M., Joshi, O., Govaerts, B., Steenwerth, K., & Karlen, D. (2010). Microbial Community Structure and Diversity as Indicators for Evaluating Soil Quality. In *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture* (Vol. 5, p. 317-358). [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9513-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9513-8_11)
- Sierra, J., & Desfontaines, L. (2018). *La dynamique de l'azote biodisponible dans les sols acides de Guadeloupe*. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122439/records/647471c22d3f560f80aa7516>
- SPW. (2020). *Matière organique dans les sols agricoles—État de l'environnement wallon*. Etat de l'environnement wallon. [http://etat.environnement.wallonie.be/cms/render/live/fr\\_BE/sites/eew/contents/indicator\\_sheets/SOLS\\_2.html](http://etat.environnement.wallonie.be/cms/render/live/fr_BE/sites/eew/contents/indicator_sheets/SOLS_2.html)

- Steinweg, M., & McMahon, S. (2012, janvier 9). *Microplate Enzyme Assay Using Fluorescence*.  
[http://enzymes.nrel.colostate.edu/assets/nrel\\_files/projects/enzymes/docs/microplatefluorescenceassay20120109.pdf](http://enzymes.nrel.colostate.edu/assets/nrel_files/projects/enzymes/docs/microplatefluorescenceassay20120109.pdf)
- Su, X., Li, G., Cotner, J. B., Wei, L., Wang, Y., Pan, T., & Ding, K. (2021). Long-term organic fertilization changes soil active bacterial composition and multifunctionality : RNA-based bacterial community and qPCR-based SmartChip analysis. *Journal of Soils and Sediments*, 21(2), 799-809. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02854-2>
- Swift, R. S. (1996). Organic Matter Characterization. In *Methods of Soil Analysis* (p. 1011-1069). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c35>
- Thibault, C., & Lecompte, F. (2018, avril). *Gestion de la fertilité des sols en cultures légumières et maraîchères*. Rapport d'étude du GIS Picléq.
- Trigalet, S., Chartin, C., Krüger, I., Carnol, M., Oost, K., & Wesemael, B. (2017). Soil organic carbon fractionation for improving agricultural soil quality assessment – a case study in Southern Belgium (Wallonia). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 21.  
<https://doi.org/10.25518/1780-4507.13422>
- Van Breemen, N., & Burman, P. (2002). Soil formation—Second Edition. In *Soil formation—Second Edition* (Kluwer academic publishers).
- Vincent, Q., Chartin, C., Krüger, I., van Wesemael, B., & Carnol, M. (2019). *Guide sur les indicateurs biologiques et le carbone organique des sols agricoles en Wallonie—La qualité biologique et le carbone organique des sols agricoles en Wallonie*.  
<https://orbi.uliege.be/handle/2268/241036>
- Wallner, R. (2019). Manuel de culture sur butte. Paris : Rustica éditions.
- Yilmaz, D., Cannavo, P., Séré, G., Vidal-Beaudet, L., Legret, M., Damas, O., & Peyneau, P.-E. (2018). Physical properties of structural soils containing waste materials to achieve urban greening. *Journal of Soils and Sediments*, 18(2), 442-455. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1524-0>
- Youmatter. (2018, janvier 11). La permaculture, c'est quoi ? Définition, principes et applications. *Youmatter*. <https://youmatter.world/fr/definitions/permaculture-definition-technique-principe/>
- Yuan, Z., Liu, H., Han, J., Sun, J., Wu, X., & Yao, J. (2017). Monitoring Soil Microbial Activities in Different Cropping Systems Using Combined Methods. *Pedosphere*, 27(1), 138-146.  
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60100-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60100-X)
- Zhang, X., Ma, L., Gilliam, F., Wang, Q., & Li, C. (2012). Effects of raised-bed planting for enhanced summer maize yield on rhizosphere soil microbial functional groups and enzyme activity in Henan Province, China. *Field Crops Research*, 130, 28-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.02.008>



## 9 Annexes

---

Annexe 1 : Profondeur des horizons des différentes buttes, estimée lors de l'échantillonnage le 10/05/24.

<b>Buttes</b>	<b>Horizon 1</b>	<b>Horizon 2</b>
Témoins (Z)	10-20 cm	10-20 cm
en Terre (T)	10-20 cm	10-20 cm
Lasagnes (L)	15-25 cm	5-15 cm
Sandwichs (S)	5-10 cm	20-25 cm
Forestières (F)	0-15 cm	15-30 cm

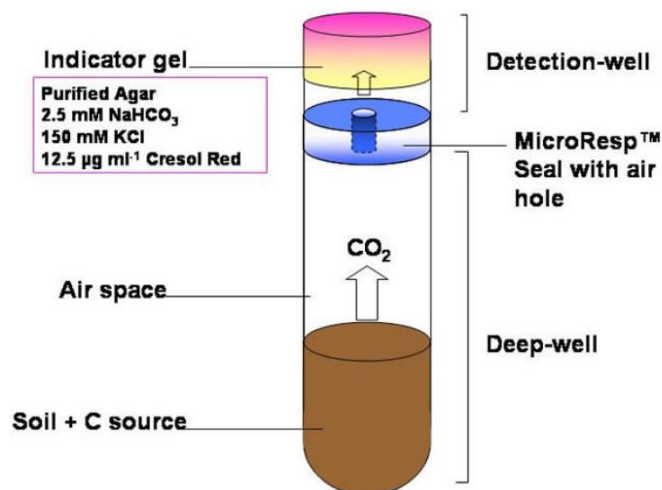
### Protocole MicroResp (Gourmet, 2023)

#### Principe

« MicroResp a été développée par Campbell (Campbell et al., 2003) pour mesurer l'évolution du CO<sub>2</sub> sur une courte période de temps (4-6 h).

Il s'agit d'une technologie basée sur l'utilisation d'un indicateur coloré (Rouge de crésol) qui change de couleur avec le changement de pH : il passe du rose au jaune, quand le pH devient plus acide.

Le rouge de crésol est préparé dans un milieu d'indication contenant du bicarbonate de sodium. Lorsque du CO<sub>2</sub> réagit avec le bicarbonate de sodium contenu dans le milieu d'indication selon l'équation suivante et le schéma ci-dessous, le pH du milieu d'indication décroît et le rouge de crésol change la couleur de ce dernier, ce qui permet de doser la quantité de CO<sub>2</sub> qui a réagi avec le milieu d'indication (Rowell, 1995) :



*Méthode colorimétrique Microresp de mesure du CO<sub>2</sub> libéré d'un échantillon de sol.*

(“Science behind MicroResp™”, 2019), (TFE SAMAD IDI-ISSA, 2022).

# 1 Échantillons de sol

## 1.1 Prélèvements

Quatre prélèvements sont réalisés sur le sommet de chaque butte à l'aide d'une tarière de 30 cm de long. Chacun de ces prélèvements sont séparés arbitrairement en deux horizons, sur base de critères visuels et sont regroupés en échantillons composites. Chaque échantillon composite est représentatif d'une couche de sol constituant la butte. Chaque échantillon composite est composé de plusieurs répétitions de buttes, pour les buttes A, l'échantillon A reprend les buttes A1, A2, A3. La couche 1 étant considérée comme la couche de surface faisant entre 15 et 30 cm selon les modalités, la couche 2 constituée de la matière organique en décomposition (10-30 cm). Pour cette expérience, nous avons donc 2 couches x 5 modalités x 3 répétitions = 30 échantillons à analyser.

## 1.2 Préparation

1. Tamiser, à l'aide d'un tamis de maille 2mm, chaque échantillon afin de retirer les racines et les pierres.  
⇒ Stocker à 4°C les échantillons de sol prélevés quand ils ne sont pas utilisés
2. Échantillonner une partie des prélèvements de sol tamisés afin d'avoir des échantillons de taille adéquate.
3. Déterminer la teneur en humidité de chaque échantillon de sol. Pour ce faire :
  - a) Prélever une partie de l'échantillon (minimum 10 g) qui servira d'échantillon martyr, celui-ci pourra être séché afin d'en connaître la masse sèche
  - b) Peser l'échantillon de terre fraîche : **masse fraîche martyr**
  - c) Sécher l'échantillon au four à 60°C pendant minimum 48h
  - d) Peser l'échantillon après séchage : **masse sèche martyr**
  - e) Calculer la proportion d'eau dans le sol frais :
    - a. **% Poids sec** par unité de sol frais =  $(\text{masse sèche} / \text{masse fraîche}) * 100$
    - b. **Teneur en eau du sol frais (%)** =  $100 - \% \text{ Poids sec} = \% \text{ eau par unité de sol frais}$
4. Déterminer la capacité maximale de rétention d'eau de chaque échantillon de sol exprimée en pourcentage de sol sec (*capacité des particules d'un sol à retenir physiquement le maximum d'eau contre la force de la gravité, par unité de poids sec*)
  - a) Placer la terre sèche dans un gobelet en plastique perforé dans le fond à l'aide d'une aiguille et le peser





- b) Placer le gobelet dans un bac rempli d'eau. Attendre que la surface de l'échantillon soit mouillée et que l'ensemble de la terre soit gorgée d'eau.
- c) Une fois l'échantillon de sol entièrement humidifié, le peser : **masse humide martyr**
- d) Calculer la **capacité maximale de rétention d'eau** de l'échantillon par unité de sol sec (%) =  $((\text{masse humide} - \text{masse sèche}) / \text{masse sèche}) * 100$

5. Ajuster la teneur en humidité des échantillons de sol à 30% de leur capacité maximale de rétention d'eau.

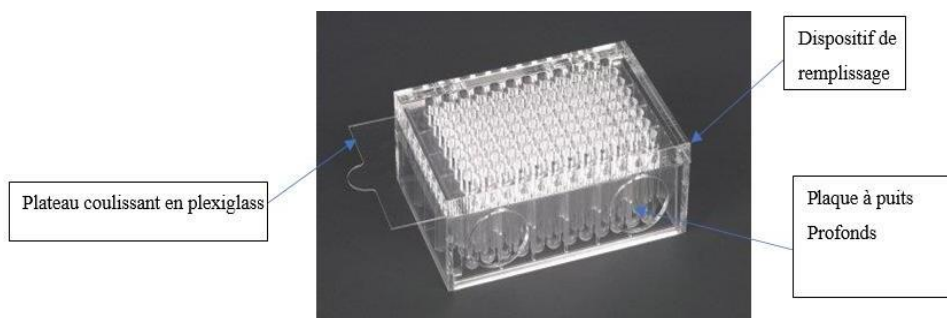
- a) Peser l'échantillon de sol frais : **masse fraîche à étudier**
- b) Calculer sa masse sèche théorique à l'aide du % de poids sec :  
 $\% \text{ Poids sec} * \text{masse fraîche à étudier} = \text{masse sèche théorique (g)}$
- c) Calcul de la masse d'eau du sol frais :  
 $\text{Teneur en eau du sol frais (\%)} * \text{masse fraîche à étudier} = \text{masse d'eau du sol frais (g)}$
- d) Calcul de la masse d'eau du sol lorsque celui-ci a atteint 30% de sa capacité maximale de rétention d'eau :  
 $30\% * \text{Capacité maximale de rétention d'eau (\%)} * \text{masse sèche théorique} = \text{masse d'eau du sol à 30\% de la capacité maximale de rétention d'eau}$

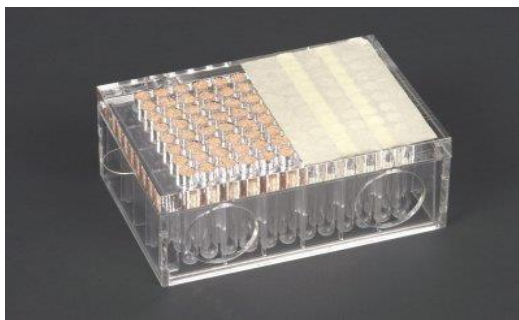
Calcul de la masse d'eau à ajouter au sol frais pour atteindre 30% de sa capacité maximale de rétention d'eau :

$\text{Masse d'eau du sol à 30\% de la capacité maximale de rétention d'eau} - \text{masse d'eau du sol frais} = \text{masse d'eau à ajouter au sol frais (1g d'eau = 1 ml d'eau)}$

- e) Afin de connaître le pourcentage de la capacité maximale de rétention d'eau déjà présent dans le sol frais, il suffit de faire le rapport entre la teneur en eau du sol frais et la capacité maximale de rétention d'eau :  
 $\text{teneur en eau du sol frais (\%)} / \text{capacité maximale de rétention d'eau (\% de sol sec)}$

6. Une fois la teneur en eau de l'ensemble des échantillons ajustée à 30% de leur capacité maximale de rétention d'eau, il suffira de remplir la plaque à puits profonds avec les échantillons à étudier. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser le dispositif de remplissage MicroResp ainsi que le plateau coulissant en plexiglass. Afin d'éviter d'éventuels mélanges d'échantillons lors du remplissage des puits profonds, il est fortement recommandé de couvrir les puits vides et ceux déjà remplis à l'aide de ruban adhésif et de ne laisser ouvert que ceux à remplir.





7. Peser la plaque à puits profonds après chaque remplissage d'échantillon. Cette étape permettra d'obtenir la masse moyenne de sols dans un puits profond, et ce pour chaque type d'échantillon. Cette donnée sera utilisée dans le calcul du taux de CO<sub>2</sub> émis.
8. Une fois la plaque à puits profonds remplie, la recouvrir de parafilm.

### 1.3 Incubation

Avant de pouvoir mesurer l'activité microbienne des sols, ces derniers doivent être incubés dans une étuve pendant 60h à 25°C. Il est important que cette incubation se fasse dans une étuve qui permet de garder une température constante pendant toute la durée de l'incubation.

L'incubation permet de stabiliser les sols à une humidité constante une fois celle-ci ajustée à 30% de la capacité maximale de rétention d'eau.

## 2 Protocole de détection colorimétrique de respiration des micro-organismes du sol

### 2.1 Présentation du dispositif

Dans cette expérimentation, le dispositif expérimental MicroResp sera utilisé afin de quantifier l'émission de CO<sub>2</sub> de différents types de sols. Ce dernier est constitué d'une plaque à 96 puits profonds, d'un dispositif de remplissage, d'un plateau coulissant en plexiglass, d'un tapis de fermeture en caoutchouc, d'une microplaque de détection et d'un dispositif de fermeture en métal.



### 2.2 Préparation de la microplaque de détection

#### 2.2.1 Préparation de la solution mère indicatrice

1. Mesurer 900ml d'eau déminéralisée et les mettre dans un bécher de 1000ml
2. Mettre le bécher sur l'agitateur magnétique chauffant et porter la température de l'eau déminéralisée à environ 60°C.  
*!/ ne pas dépasser 65°C auquel cas le rouge de crésol sera rendu inutilisable et il faudra recommencer la préparation.*
3. Ajouter à l'eau déminéralisée un barreau aimanté et lancer l'agitation à intensité moyenne

4. Ajouter à l'eau déminéralisée chaude : 18.75mg de Crésol Rouge, puis 16.77g de Chlorure de potassium et enfin 0.315g de Bicarbonate de sodium
5. Une fois les trois solutés dissous, ajuster le volume à 1000ml avec de l'eau déminéralisée et laisser mélanger encore un peu
6. Transférer les 1000ml de solution obtenue dans une bouteille en verre. On y prélèvera la quantité nécessaire pour la suite du protocole  
☒ *Stocker la solution à 4°C à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, sa durée d'utilisation peut atteindre les 6 mois.*

### 2.2.2 Préparation de la solution d'agar purifié 3%

1. Ajouter 100ml d'eau déminéralisée dans un bécher de 100ml, puis 3g de poudre d'agar dans le même récipient
2. Dissoudre la poudre d'agar dans l'eau déminéralisée jusqu'à obtenir une solution translucide, à l'aide de l'agitateur magnétique chauffant réglé sur 100°C pendant 5 à 10 min.
3. Après l'avoir transvasée dans une bouteille en verre, faire refroidir la solution d'agar 3% obtenue en la laissant à l'air libre 1 à 2 minutes tout en la remuant.
4. Ensuite, placer la bouteille dans un bain-marie à 60°C

### 2.2.3 Préparation de la solution de détection

1. Combiner la solution mère indicatrice et la solution d'agar 3% selon un ratio 1:2 (agar : indicatrice).  
☒ *Préalablement au mélange des deux solutions, il faut qu'elles soient à la même température. Il faut donc mettre dans une bouteille en verre la quantité de solution mère indicatrice requise pour le mélange, puis placer cette bouteille en verre dans le bain-marie à 60°C.*

### 2.2.4 Préparation d'une microplaque de détection

L'idéal est de préparer plusieurs microplaques en même temps, car le taux de réussite n'est pas de 100% et cela permettra d'avoir plusieurs plaques à disposition afin d'enchaîner les expérimentations si besoin.

1. À l'aide d'une pipette, disposer dans chaque puits un aliquote de 150µl de la solution de détection  
*Éviter la formation de bulle dans le gel lors de l'insertion de la solution indicatrice dans les puits.*
2. Stocker la microplaque dans un dessiccateur fermé et à l'abri de la lumière. Placer un petit erlenmeyer rempli d'eau et un pot de cristaux de chaux sodée au fond du dessiccateur.  
*Le but est de garder une atmosphère humide dans le dessiccateur tant qu'une microplaque y est conservée.*
3. Laisser s'équilibrer la microplaque pendant 2 jours avant la première utilisation.

## 2.3 Préparation et remplissage de la plaque à puits profonds

1. Commencer par lire l'absorbance de la microplaque à 570nm et à 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre du type *Thermo Scientific Multi scan Go* et sauvegarder les résultats «At0». Ensuite, vérifier le % de coefficient de variance (%CoV) afin de savoir si la microplaque est conforme (%CoV < 5%).

i. Formule : % CoV = (écart-type/moyenne)\*100

Après lecture de l'absorbance, replacer la microplaque de détection dans le dessiccateur en verre jusqu'à l'étape 8.

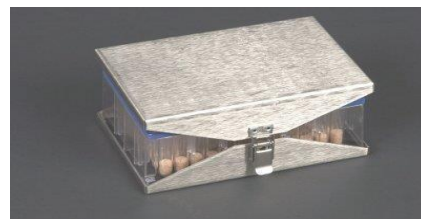
2. Introduire un témoin positif, une solution de NaHCO<sub>3</sub> 0.25% dans la 11<sup>ème</sup> colonne de la plaque à puits profonds, à raison de 150µl par puits. Introduire de l'eau distillée, à raison de 300µl par puits, comme témoin négatif (blanco) dans la 12<sup>ème</sup> colonne de la plaque à puits profonds.
3. Insérer 150µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% dans les puits de la 11<sup>ème</sup> colonne de la plaque puits profonds.
4. Une fois la plaque à puits profonds complètement remplie, la recouvrir avec le tapis de fermeture en caoutchouc.



5. Sortir la microplaque de détection du dessiccateur et l'emboîter au dispositif composé de la plaque à puits profonds et du tapis de fermeture en caoutchouc. Cela doit être réalisé de sorte que le micropuit A1 corresponde au puits profond A12.



6. Celer le tout à l'aide du dispositif en métal permettant d'assurer l'étanchéité du dispositif expérimental.



7. Incuber le dispositif pendant 6h à 20°C.
8. Après incubation, détacher le tout et immédiatement lire l'absorbance de la microplaque à 570nm et à 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre du type *Thermo Scientific Multi scan Go* et sauvegarder les résultats « At6».

→ La microplaque de détection peut être réutilisée tant que la solution de détection n'a pas séché et qu'elle est retournée à sa couleur et absorbance d'origine.

### 3 Calculs (Campbell et al., 2017)

**H6. Data Handling**

**i. Data Transfer and Sorting**  
Export the files from the spectrophotometer programme into an Excel spreadsheet and sort the absorbance ( $A_{570}$ ) data into a list format with the 0hr ( $A_{t0}$ ) and 6hr ( $A_{t6}$ ) data in single columns alongside each other.

*At0 plate*

A1	A2	A3	...
B1	B2	B3	...
C1	C2	C3	...
...	...	...	...

*At6 plate*

A1	A2	A3	...
B1	B2	B3	...
C1	C2	C3	...
...	...	...	...

*At0 and At6 in columns*

At0	At6
A1	A1
B1	B1
C1	C1
...	...
A2	A2
B2	B2
C2	C2
...	...
A3	A3
B3	B3
C3	C3
...	...

**ii. Normalisation of Absorbance data**  
Normalise the data ( $A_i$ ) for time 6 by dividing the  $A_{570}$  data by the  $A_{570}$  data at time 0 ( $A_{t0}$ ) and multiply by the mean of the  $A_{570}$  reading at time 0 ( $A_{t0}$ ).

To Normalise:  
6hr data:  $A_i = (A_{t6} / A_{t0}) \times \text{Mean}(A_{t0})$



### iii. % CO<sub>2</sub> Calculations

The following formula converts the normalised 6hr data (Ai6) to %CO<sub>2</sub>:

$$\%CO_2 = A + B / (1 + D \times Ai)$$

Where A = -0.2265, B = -1.606, D = -6.771

The formula is for a linear-to-linear (rectangular hyperbola) standard curve fit. The parameters are from a calibration using Emax Microplate reader (Molecular Devices, USA) using a wavelength of 570nm. The calibration was measured over 6h, using soils <pH7 and for pathlength (depth of agar) and concentration of reagents, in the detection plate as described.

*N.B.* Calibration of the spectrophotometer is recommended as measurements differ from model to model (see Pg17).

### iv. CO<sub>2</sub> production rate

The CO<sub>2</sub> rate is calculated by converting the 6hr % CO<sub>2</sub> data to µg/g/h CO<sub>2</sub>-C using gas constants, and constants for incubation temperature in °C (T), headspace volume (vol) in the well (µl), fresh weight (fwt) of soil per well (g), incubation time (hr) and soil sample % dry weight (dwt).

The CO<sub>2</sub> rate (µg CO<sub>2</sub>-C/g/h) is calculated as follows:

$$\frac{\left( \frac{(\%CO_2/100) \times vol \times (44/22.4) \times (12/44) \times (273/(273+T))}{soil\ fwt \times (soil\ \% \ dwt/100)} \right)}{\text{incubation time}}$$

*N.B.* Headspace volume is normally 945µl for our standard set-up. Adjust according to manufacturers specifications for the microplate and deepwell plate.

## Bibliographie

Campbell C.D., Chapman S.J., Cameron C.M., Davidson M.S. & Potts J.M., 2003. A Rapid Microtiter Plate Method To Measure Carbon Dioxide Evolved from Carbon Substrate Amendments so as To Determine the Physiological Profiles of Soil Microbial Communities by Using Whole Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(6), 3593–3599, DOI:10.1128/AEM.69.6.3593-3599.2003.

Campbell, C., Chapman, S., & Davidson, M. (2017). *MicroResp™ Technical Manual*. James Hutton Ltd.

Rowell M.J., 1995. Colorimetric method for CO<sub>2</sub> measurement in soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**(3), 373– 375, DOI:10.1016/0038-0717(94)00218-P.

Science behind MicroResp™, 2019. <https://www.microresp.com/science>, (09/02/2023).

## DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> Pro Kit

Solution CD2 should be stored at 2–8°C upon arrival. All other reagents and kit components should be stored at room temperature (15–25°C).

### Further information

- *DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> Pro Kit Handbook*: [www.qiagen.com/HB-2495](http://www.qiagen.com/HB-2495)
- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com)

### Notes before starting

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
  - If Solution CD3 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.
  2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.  
**Note:** If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.  
**Note:** For more information about other bead beating methods, see the “Protocol: Detailed” section of *DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> Pro Kit Handbook*.
  3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 × *g* for 1 min.
  4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).  
**Note:** Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.
  5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.
  6. Centrifuge at 15,000 × *g* for 1 min at room temperature. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).  
**Note:** Expect 500–600 µl.
  7. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.

Sample to Insight





8. Load 650  $\mu$ l of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000  $\times$   $g$  for 1 min.
9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
11. Add 500  $\mu$ l of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000  $\times$   $g$  for 1 min.
12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
13. Add 500  $\mu$ l of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000  $\times$   $g$  for 1 min.
14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).
15. Centrifuge at up to 16,000  $\times$   $g$  for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).
16. Add 50–100  $\mu$ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane.
17. Centrifuge at 15,000  $\times$   $g$  for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

**Note:** We recommend storing the DNA frozen (–30 to –15°C or –90 to –65°C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA, please refer to the Troubleshooting



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerSoil® (QIAGEN Group). 1117569 05/2019 HB-2494-003 © 2019 QIAGEN, all rights reserved.

---

Ordering [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technical Support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)



### Protocole

On utilise le Spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop Technologies) afin de quantifier la concentration d'ADN présent dans notre extraction ainsi que les impuretés telles que les protéines et résidus de produits du kit d'extraction (EDTA, etc.).

### Matériel nécessaire :

- ADN extraits
- Pipette de 2 $\mu$ l et tips
- Eau distillée
- Dernière solution du kit d'extraction, dans lequel l'ADN extrait baigne (= *blanc*)
- Bic et cahier de labo

### Méthodologie :

1. Lancer le programme nanodrop sur l'ordinateur.
2. Soulever le pied, ajouter 2 $\mu$ l d'eau distillée dans le premier trou, refermer le pied
3. Cliquer sur « ok water sample »
4. Soulever le pied, essuyer avec un papier l'endroit où on a mis l'eau et mettre 2 $\mu$ l de *blanc*
5. Vérifier que le programme est bien sur analyse d'ADN
6. Cliquer sur « blanc »
7. Soulever le pied, essuyer avec un papier et mettre 2 $\mu$ l de solution avec ADN extrait et lancer le programme
8. Procéder de la même manière que l'étape 7 pour tous les échantillons

Les informations qui nous intéressent sont la quantité d'ADN extrait (ng/ $\mu$ l), la quantité 260/280 et 260/230.

## 5. Nucleic Acids

Nucleic acid samples can be readily checked for concentration and quality using the NanoDrop 1000 Spectrophotometer. To measure nucleic acid samples select the 'Nucleic Acid' application module.

### Sample Volume Requirements

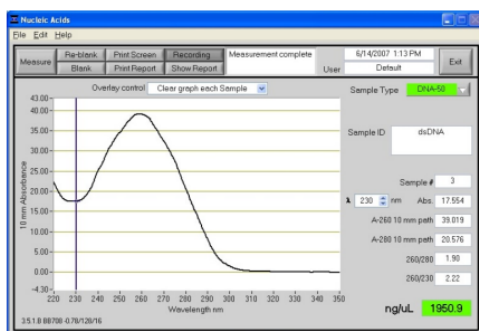
Field experience has indicated that 1ul samples are sufficient to ensure accurate and reproducible results when measuring aqueous nucleic acid samples. However, if you are unsure about your sample or your pipettor accuracy, a 1.5-2ul sample is recommended to ensure that the liquid sample column is formed and the light path is completely covered by sample.

### Measurement Concentration Range

The NanoDrop 1000 Spectrophotometer will accurately measure dsDNA samples up to 3700 ng/ul without dilution. To do this, the instrument automatically detects the high concentration and utilizes the 0.2mm pathlength to calculate the absorbance.

Detection Limit (ng/ul)	Approx. Upper Limit (ng/ul)	Typical Reproducibility (minimum 5 replicates) (SD= ng/ul; CV= %)
2	3700 ng/ul (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	sample range 2-100 ng/ul: $\pm 2$ ng/ul sample range >100 ng/ul: $\pm 2\%$

### Unique Screen Features



**Sample Type:** used to select the (color-keyed) type of nucleic acid being measured. The user can select 'DNA-50' for dsDNA, 'RNA-40' for RNA, 'ssDNA-33' for single-stranded DNA, or 'Other' for other nucleic acids. The default is DNA-50. If 'Other' is selected, the user can select an analysis constant between 15-150. When navigating amongst the three general sample types within the Nucleic Acids module, the last constant value entered within the 'Constant' sample type will be retained. See the "Concentration Calculation (Beer's Law)" Appendix for more details on this calculation.

**$\lambda$  and Abs:** the user selected wavelength and corresponding absorbance. The wavelength can be selected by moving the cursor or using the up/down arrows to the right of the wavelength box. Note: The user-selected wavelength and absorbance are not utilized in any calculations.

**A260 10 mm path:** absorbance of the sample at 260 nm represented as if measured with a conventional 10 mm path. Note: This is 10X the absorbance actually measured using the 1 mm path length and 50X the absorbance actually measured using the 0.2 mm path length.

**260/280:** ratio of sample absorbance at 260 and 280 nm. The ratio of absorbance at 260 and 280 nm is used to assess the purity of DNA and RNA. A ratio of  $\sim 1.8$  is generally accepted as "pure" for DNA; a ratio of  $\sim 2.0$  is generally accepted as "pure" for RNA. If the ratio is appreciably lower in either case, it may indicate the presence of protein, phenol or other contaminants that absorb strongly at or near 280 nm. See "260/280 Ratio" in the Troubleshooting section for more details on factors that can affect this ratio.

**260/230:** ratio of sample absorbance at 260 and 230 nm. This is a secondary measure of nucleic acid purity. The 260/230 values for "pure" nucleic acid are often higher than the respective 260/280 values. They are commonly in the range of 1.8-2.2. If the ratio is appreciably lower, this may indicate the presence of co-purified contaminants.

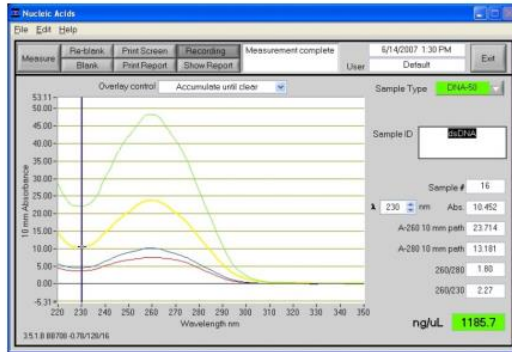
**ng/uL:** sample concentration in ng/uL based on absorbance at 260 nm and the selected analysis constant. See the "Concentration Calculation (Beer's Law)" in the appendix for more details on this calculation.

### Spectrum Normalization

The baseline is automatically set to the absorbance value of the sample at 340 nm, which should be very nearly zero absorbance. All spectra are referenced off of this zero.

### Spectrum Overlay Control

The user can display more than one spectrum in the same display using this feature. The current sample plot will be displayed in bold and previous plots will be distinguished by different colors as seen in the following example:



The default option is set to clear the display for the next reading. The user may set the overlay control to clear after each sample plot, (default setting), after each new report, or accumulate plots until prompted to clear. The 'Clear Now' setting will clear all current and previous plots. When the overlay function is active, the software will auto scale the y-axis based on the sample with the highest absorbance at 260 nm. Note: When the overlay function is active, the 'Blank' function does not clear the existing overlaid sample spectra.

### Procédure :

- Lors de la **dénaturation**, réalisée à une température de 95°C, l'ADN double-brin est séparé en ses deux brins d'ADN constitutifs.
- Lors de l'**hybridation**, se déroulant entre 50 et 70°C, les amorces se lient à leurs séquences complémentaires sur l'ADN simple brin.
- La troisième étape consiste en l'**élongation**, une enzyme polymérase, la Taq polymérase, extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de la réaction. Cette étape se déroule à 72°C. L'amplification obtenue est exponentielle et, à partir d'une molécule d'ADN, il est possible d'obtenir un milliard de copies (amplicons) de cette même molécule.

Un thermocycleur permet d'automatiser la réaction PCR en programmant des cycles consécutifs de montée et de baisse de température. Ces étapes sont répétées de 35 à 50 fois et, à la fin de ce processus, la quantité d'ADN génétiquement modifiée est déterminée par la mesure de la fluorescence.

Durant l'étape d'émission de fluorescence, l'enzyme dégrade la sonde et poursuit la synthèse du second brin d'ADN. La fluorescence émise par le rapporteur n'est alors plus piégée. Le signal fluorescent peut être quantifié, et permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent et donc amplifié.

Ce système est très sensible et permet de détecter moins de dix copies d'ADN.

#### 1. Dilution des amorces

Dilution à 1/10 : 11µL de stock + 99µL d'H<sub>2</sub>O

Séquences des amorces :

16S : 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'

16S : 5'-ATT ACC GCT GCT GGC A-3'

18S : 5'-A[I NO] CCA TTC AAT CGG TA[ INO] T-3'

18S : 5'CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3'

#### 2. Préparation du Master Mix (quantité/puits):

5 µL de KAPA SYBR® FAST

1 µL de primer Forward 16S ou 18S

1 µL de primer Reverse 16S ou 18S

2 µL de H<sub>2</sub>O sans nucléase

### 3. Préparation des gammes de dilution pour courbes d'étalonnage :

5 gammes :  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$

Soit :  $10^7 = 3 \mu\text{L}$  de stock ( $10^8$ ) +  $27 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

$10^6 = 3 \mu\text{L}$  de  $10^7$  +  $27 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

$10^5 = 3 \mu\text{L}$  de  $10^6$  +  $27 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

$10^4 = 3 \mu\text{L}$  de  $10^5$  +  $27 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

$10^3 = 3 \mu\text{L}$  de  $10^4$  +  $27 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

### 4. Préparation des plaques à 96 puits

Les plaques MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (ThermoFischer Ref N8010560) sont utilisées avec les films MicroAmp Optical Adhesive Film (ThermoFisher Ref 4311971). Le thermocycleur "QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, 96-well" est employé, couplé du logiciel QuantStudio™ Design and Analysis Software.

Les tests sont réalisés dans un volume de réaction de  $10\mu\text{L}$  par puits, contenant  $9\mu\text{L}$  de Master Mix et  $1\mu\text{L}$  d'échantillon d'ADN. 3 réplicas par échantillon sont réalisés, ainsi que par gammes de calibration.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	185_1_1	185_1_2	185_1_3	185_9_1	185_9_2	185_9_3	185_17_1	185_17_2	185_17_3	185_10_7	185_10_7	185_10_7	Master Mix + dilutions
B	185_2_1	185_2_2	185_2_3	185_10_1	185_10_2	185_10_3	185_18_1	185_18_2	185_18_3	185_10_6	185_10_6	185_10_6	
C	185_3_1	185_3_2	185_3_3	185_11_1	185_11_2	185_11_3	185_19_1	185_19_2	185_19_3	185_10_5	185_10_5	185_10_5	
D	185_4_1	185_4_2	185_4_3	185_12_1	185_12_2	185_12_3	185_20_1	185_20_2	185_20_3	185_10_4	185_10_4	185_10_4	Master Mix + eau
E	185_5_1	185_5_2	185_5_3	185_13_1	185_13_2	185_13_3	185_21_1	185_21_2	185_21_3	185_10_3	185_10_3	185_10_3	
F	185_6_1	185_6_2	185_6_3	185_14_1	185_14_2	185_14_3	185_22_1	185_22_2	185_22_3	Contrôle négatif			
G	185_7_1	185_7_2	185_7_3	185_15_1	185_15_2	185_15_3	185_23_1	185_23_2	185_23_3				Master mix + dilution
H	185_8_1	185_8_2	185_8_3	185_16_1	185_16_2	185_16_3	185_24_1	185_24_2	185_24_3	185_10-5	185_10-5	185_10-5	
ADN + Master Mix													

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	185_25_1	185_25_2	185_25_3	185_33_1	185_33_2	185_33_3	185_10_7	185_10_7	185_10_7	Master Mix + dilutions			
B	185_26_1	185_26_2	185_26_3	185_34_1	185_34_2	185_34_3	185_10_6	185_10_6	185_10_6				
C	185_27_1	185_27_2	185_27_3	185_35_1	185_35_2	185_35_3	185_10_5	185_10_5	185_10_5				
D	185_28_1	185_28_2	185_28_3	185_36_1	185_36_2	185_36_3	185_10_4	185_10_4	185_10_4	Master Mix + eau			
E	185_29_1	185_29_2	185_29_3	185_37_1	185_37_2	185_37_3	185_10_3	185_10_3	185_10_3				
F	185_30_1	185_30_2	185_30_3	185_38_1	185_38_2	185_38_3	Contrôle négatif						
G	185_31_1	185_31_2	185_31_3	185_39_1	185_39_2	185_39_3				Master mix + dilution			
H	185_32_1	185_32_2	185_32_3	185_40_1	185_40_2	185_40_3	185_10-5	185_10-5	185_10-5				
ADN + Master Mix													

### Diacétate de fluorescéine

#### 1. Préparation du tampon phosphate :

- Peser 8,7g de  $K_2HPO_4$  et 1,3g de  $KH_2PO_4$ .
- Mettre dans une bouteille d'un litre et y ajouter 800ml d'eau distillée.
- Placer la bouteille sur l'agitateur magnétique.
- Ajuster le pH à 7,6 à l'aide de solutions NaOH.
- Compléter avec 200ml d'eau.
- Mettre en autoclave pour 20 min à 120°C.

#### 2. Préparation des solutions stocks de standard et substrat (à conserver au frais et à l'abri de la lumière) :

##### Substrat : FDA :

- Solution de FDA (1) = 50mg de FDA + 10 ml d'acétone dans un tube de 50ml.

##### Standard : Fluorescéine :

- Solution de fluorescéine (1) = 6,7 mg de fluorescéine + 13,4ml d'acétone pur dans un tube de 50ml.

#### 3. Préparation des sols :

- 1,25 g de sol + 20ml de tampon phosphate dans tube 50ml.
- Agitation à température ambiante à l'aide d'un agitateur orbital à 335 RPM pendant 10 minutes.
- Sonification pendant 2 minutes
- Agitation de nouveau pendant 5 minutes.
- Dilution des sols à 1/10 : dans des tubes de 15 ml, ajouter 1ml de solution de sol à 9 ml de solution tampon.

#### 4. Dilution du substrat (à réaliser le jour J / pour chaque plaque et à conserver à l'abri de la lumière)

##### Substrat : FDA :

- FDA (2) = 400 $\mu$ L de FDA (1) + 4,8mL d'acétone + 4,8ml de TP

#### 5. Préparation des plaques 96 trous :

Des microplaques à 96 puits (Greiner bio-one, FLUOTRACT 200 noir, Réf. 655076) sont utilisées.

Huit répliques de mesure sont réalisés par échantillon, et un « blanc » est réalisé sans sol pour contrôler la fluorescence de la FDA. Une colonne étant un échantillon de sol, soit 10 échantillons par plaque. Pour cela, un volume de 25 $\mu$ L de solution de sol est placé dans chaque puits, auquel est ajouté 195 $\mu$ L de solution tampon puis 30 $\mu$ L de solution de substrat.

Les mesures de fluorescence sont réalisées avec un spectrophotomètre (TECAN Spark<sup>®</sup>), par cinétique toutes les 5 minutes pendant deux heures, à une température s'approchant des 28°C. La fluorescence est mesurée par le dessus de la plaque avec une lecture aux longueurs d'onde équivalentes à 465nm en excitation et 535 nm en émission.

Modèle de plaques pour la mesure de l'activité enzymatique des échantillons :

Plaque 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
B	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
C	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
D	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
E	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
F	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
G	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
H	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1		Blanc
Tampon	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL		220µL
Échantillon	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL		0
FDA	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL		30µL

Plaque 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
B	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
C	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
D	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
E	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
F	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
G	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
H	K1	L1	M1	N1	O1	A2	B2	C2	D2	E2		Blanc
Tampon	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL		220µL
Échantillon	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL		0
FDA	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL		30µL

Plaque 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
B	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
C	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
D	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
E	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
F	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
G	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
H	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2		Blanc
Tampon	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL	195µL		220µL
Échantillon	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL		0
FDA	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL	30µL		30µL

6. Préparation des courbes de calibration :

Dissolution de la solution stock de standard de fluorescéine :

- Fluorescéine (2) = 200µL de fluorescéine (1) + 7 800µL d'acétone
- Dilution de la solution x5 : 4 000µL de fluorescéine (2) + 16 000µL d'acétone

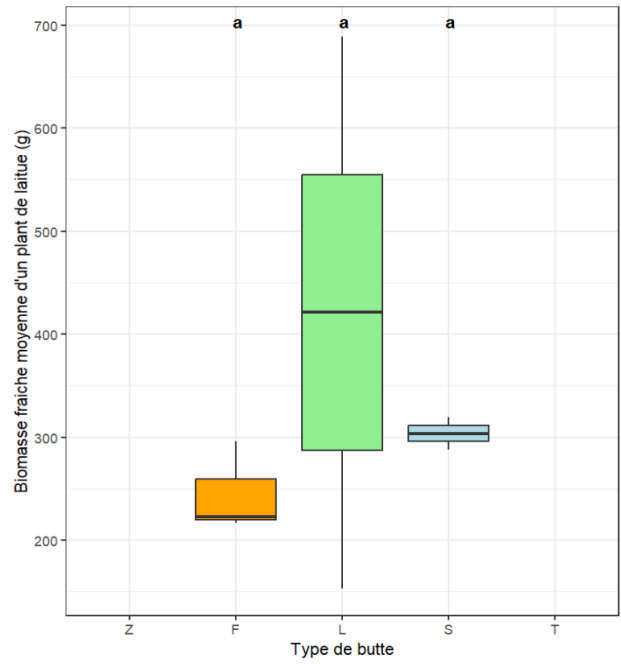
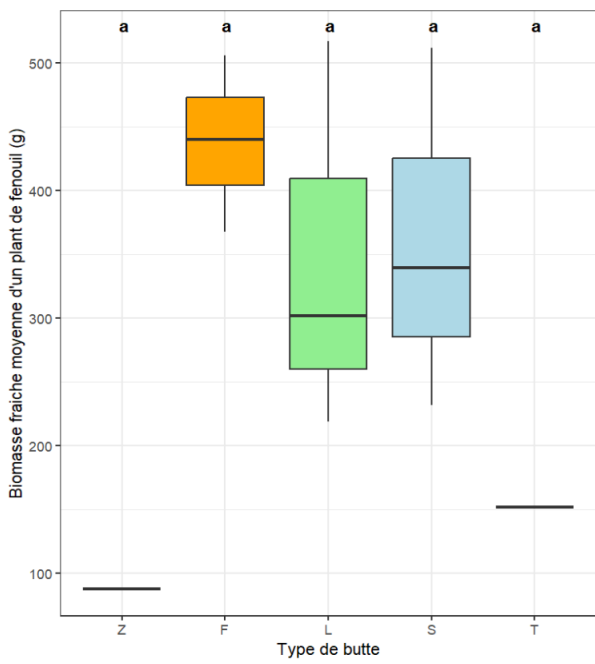
Un volume de 25µL de solution de sol est placé dans chaque puits, auquel sont ajoutées des quantités variables de solutions tampons et de solutions standard, afin de réaliser des solutions à concentration croissante. Pour les courbes de calibration, une seule mesure à temps « 0 » est nécessaire.

Modèle de plaque pour les courbes de calibrations :

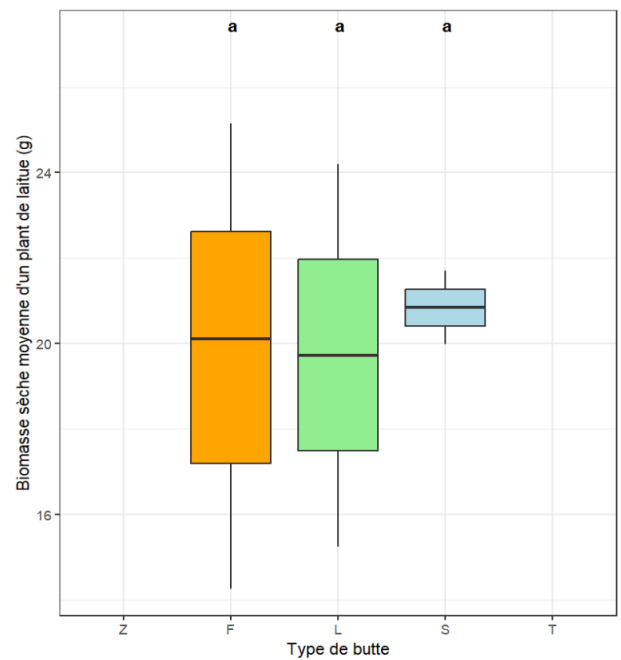
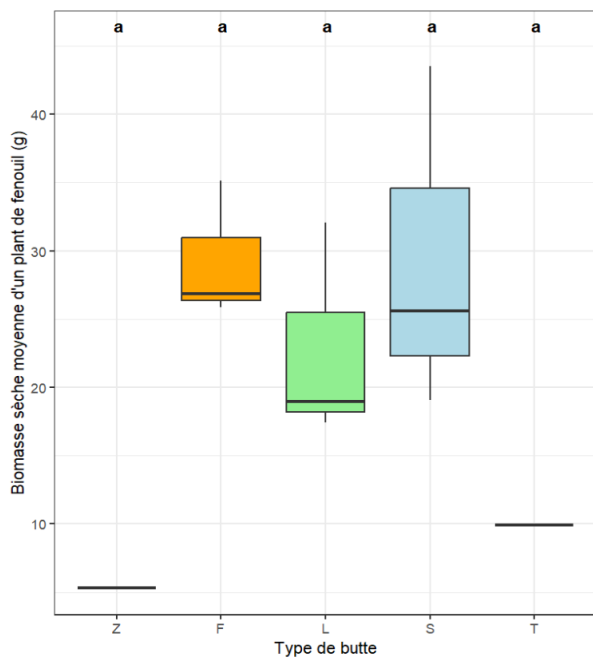
Tampon (µL) + Échantillon sol (µL) + Fluo3-dilué x200 (µL)	1	2	3	4	5	6
A	225µL 25µL 0 µL	225µL 25µL 0 µL	225µL 25µL 0 µL	225µL 25µL 0 µL	225µL 25µL 0 µL	225µL 25µL 0 µL
B	220µL 25µL 5 µL	220µL 25µL 5 µL	220µL 25µL 5 µL	220µL 25µL 5 µL	220µL 25µL 5 µL	220µL 25µL 5 µL
C	215µL 25µL 10 µL	215µL 25µL 10 µL	215µL 25µL 10 µL	215µL 25µL 10 µL	215µL 25µL 10 µL	215µL 25µL 10 µL
D	205µL 25µL 20 µL	205µL 25µL 20 µL	205µL 25µL 20 µL	205µL 25µL 20 µL	205µL 25µL 20 µL	205µL 25µL 20 µL
E	185µL 25µL 40 µL	185µL 25µL 40 µL	185µL 25µL 40 µL	185µL 25µL 40 µL	185µL 25µL 40 µL	185µL 25µL 40 µL
F	155µL 25µL 70 µL	155µL 25µL 70 µL	155µL 25µL 70 µL	155µL 25µL 70 µL	155µL 25µL 70 µL	155µL 25µL 70 µL
G	125µL 25µL 100 µL	125µL 25µL 100 µL	125µL 25µL 100 µL	125µL 25µL 100 µL	125µL 25µL 100 µL	125µL 25µL 100 µL
H	105µL 25µL 120 µL	105µL 25µL 120 µL	105µL 25µL 120 µL	105µL 25µL 120 µL	105µL 25µL 120 µL	105µL 25µL 120 µL



Annexe 8 : Biomasses fraîches d'un plant moyen de fenouil et de laitue de 2024 en grammes.



Annexe 9 : Biomasses sèches d'un plant moyen de fenouil et de laitue de 2024 en grammes.

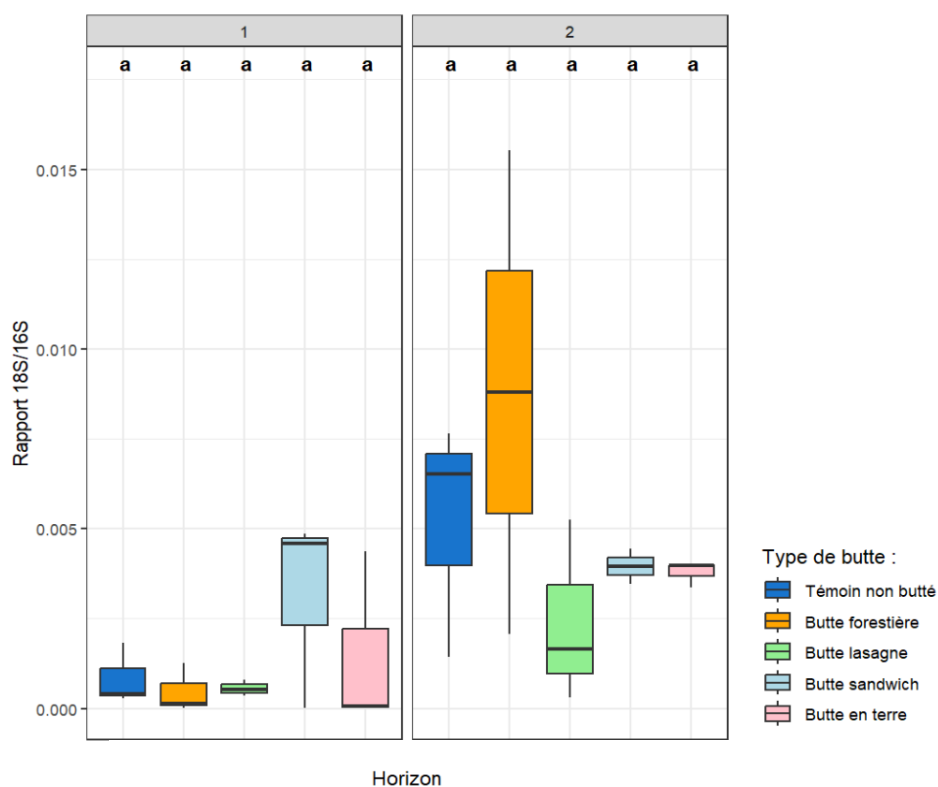


- Type de butte :
- Témoin non butte
  - Butte forestière
  - Butte lasagne
  - Butte sandwich
  - Butte en terre

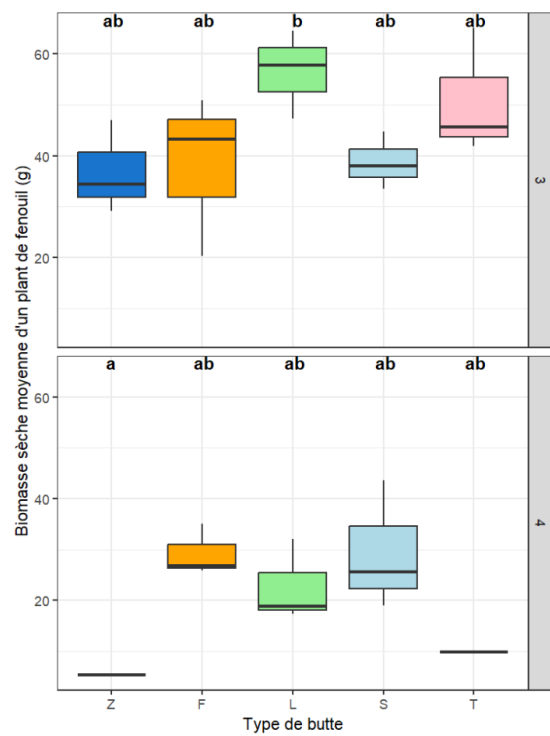
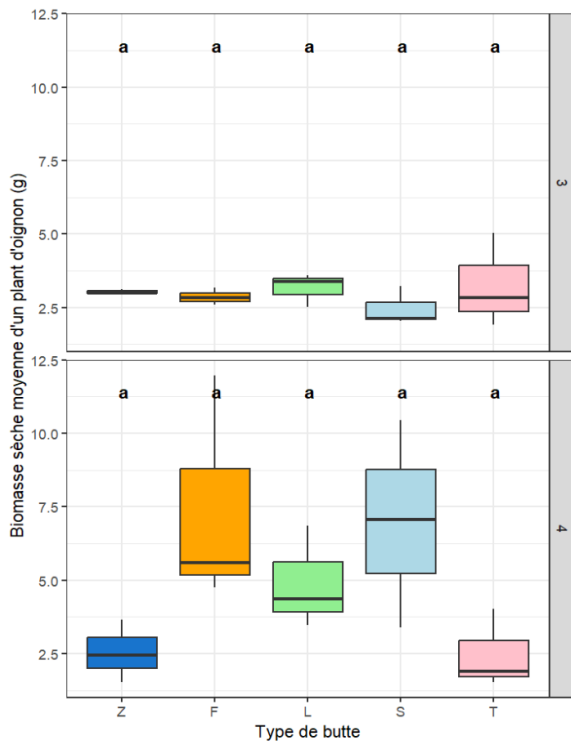
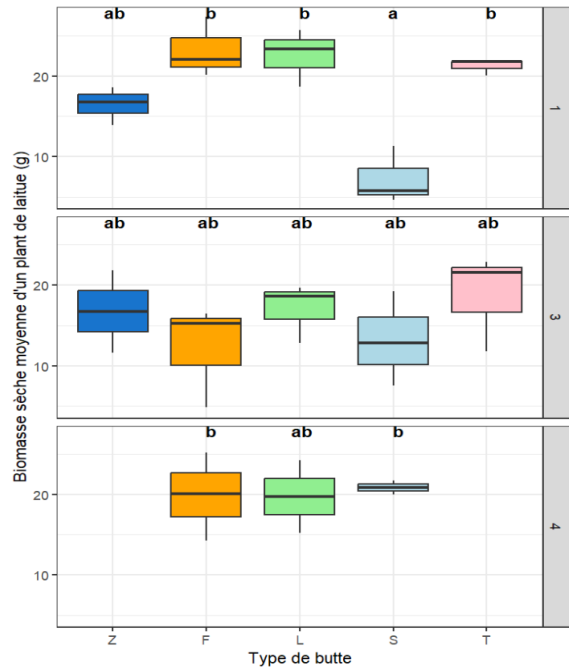
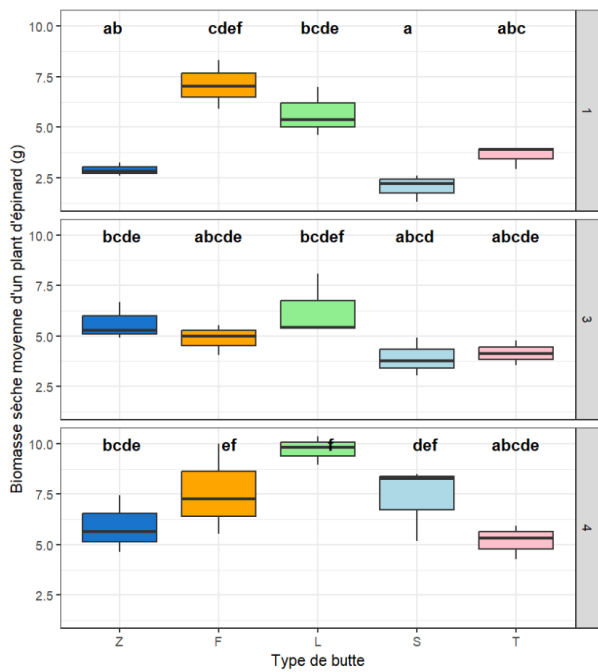
Annexe 10 : Rendements moyens des biomasses fraîches des légumes (en kg/m<sup>2</sup>) de 2024, comparées aux rendements moyens du CIM (Centre Interprofessionnel Maraîcher) en culture conventionnelle (F. Hawotte et M.Eck, communication personnelle, 30/07/24).

	Épinards (kg/m <sup>2</sup> )	Oignons tiges (kg/m <sup>2</sup> )	Fenouils (kg/m <sup>2</sup> )
<i>Témoins</i>	0,94	0,35	0,06
<i>Lasagnes</i>	1,57	0,77	3,19
<i>Forestières</i>	1,27	1,16	4,19
<i>Sandwichs</i>	1,60	1,12	3,53
<i>Buttes en terre</i>	0,79	0,38	0,38
<b>Référence CIM</b>	<b>1,2-2,5</b>	<b>0,7-0,9</b>	<b>2-2,2</b>

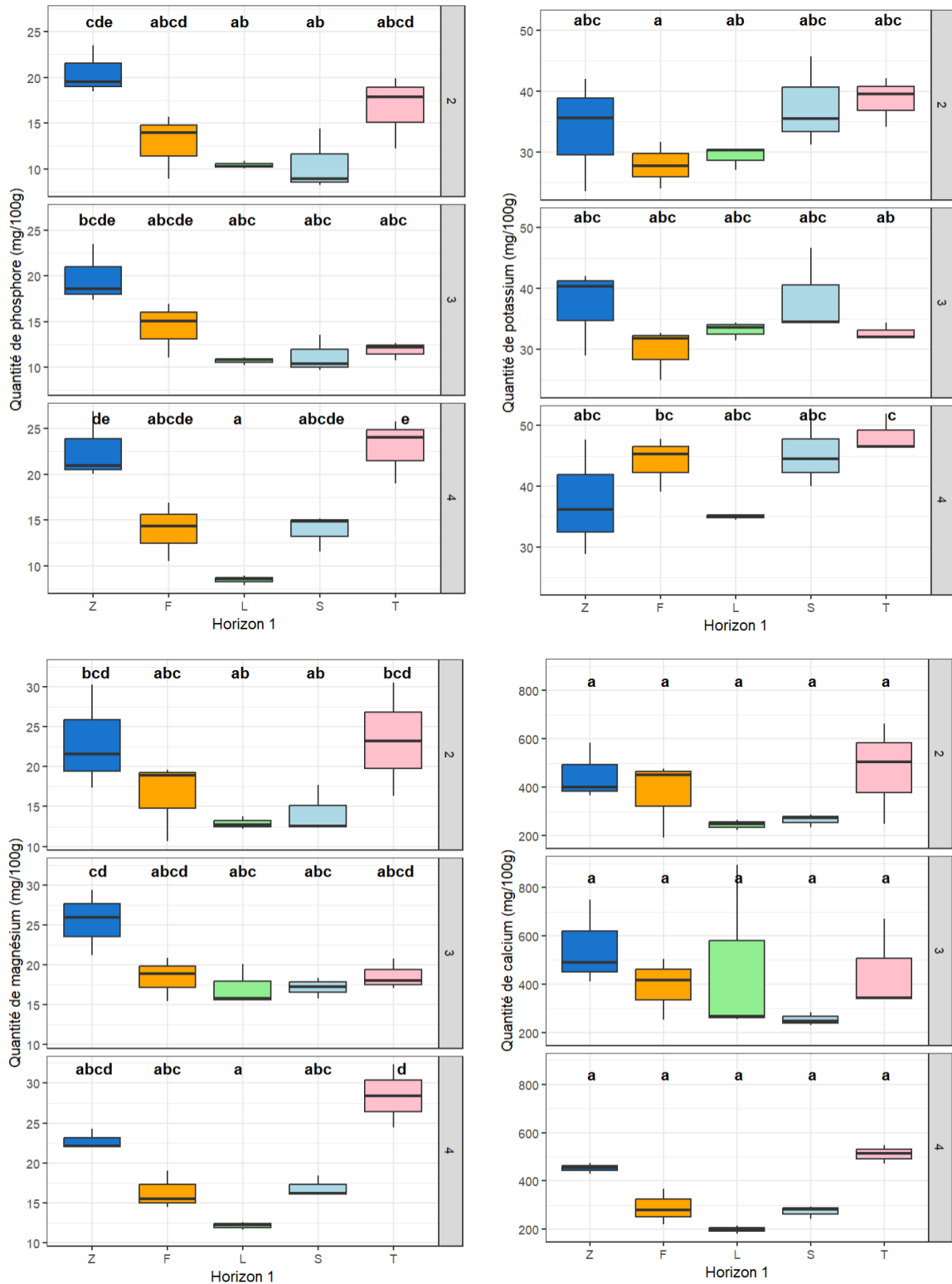
Annexe 11 : Rapport entre la quantité de gènes fongiques sur la quantité de gènes bactériens, pour chaque horizon en 2024.



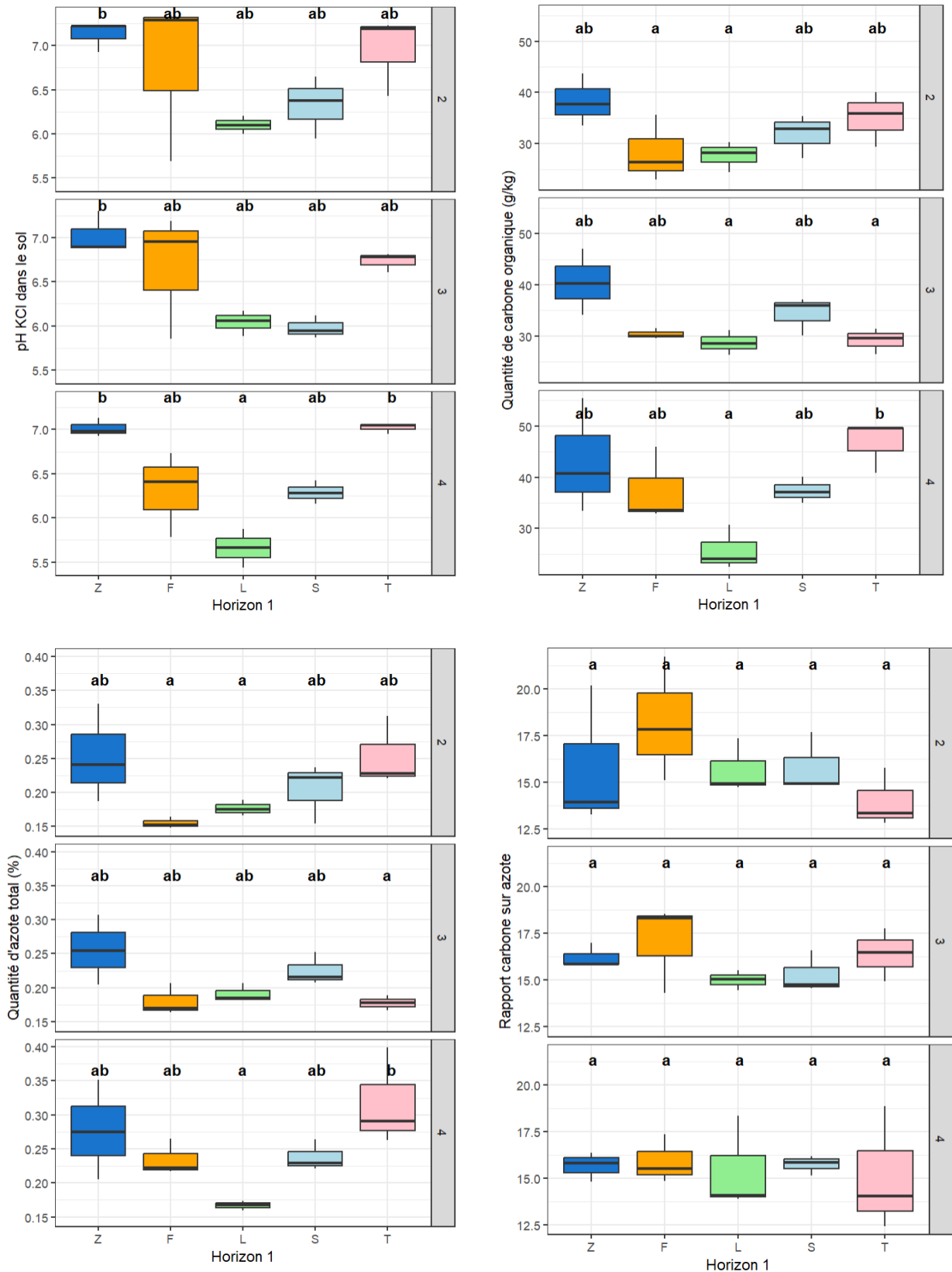
Annexe 12 : Biomasse sèche moyenne (g) par type de butte, pour un plant moyen, séparée par année. Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les rendements (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



Annexe 13 : Quantités de P, K, Mg, Ca disponible (en mg/100g TS) en fonction du type de butte, pour l'horizon 1 pour chaque année (2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



Annexe 14 : Quantité d'azote total (%), de carbone organique (g/kg), le pH KCl et le rapport carbone sur azote en fonction du type de butte, pour l'horizon 1 pour chaque année (2=2022, 3=2023, 4=2024). Les lettres représentent les résultats du test de Tukey, de l'effet « type de butte » sur les variables (niveau de significativité :  $\alpha < 0,05$ ).



Annexe 15 : Résultats des analyses chimiques par le laboratoire de la Hulpe de 2021 (Jacques, 2021).

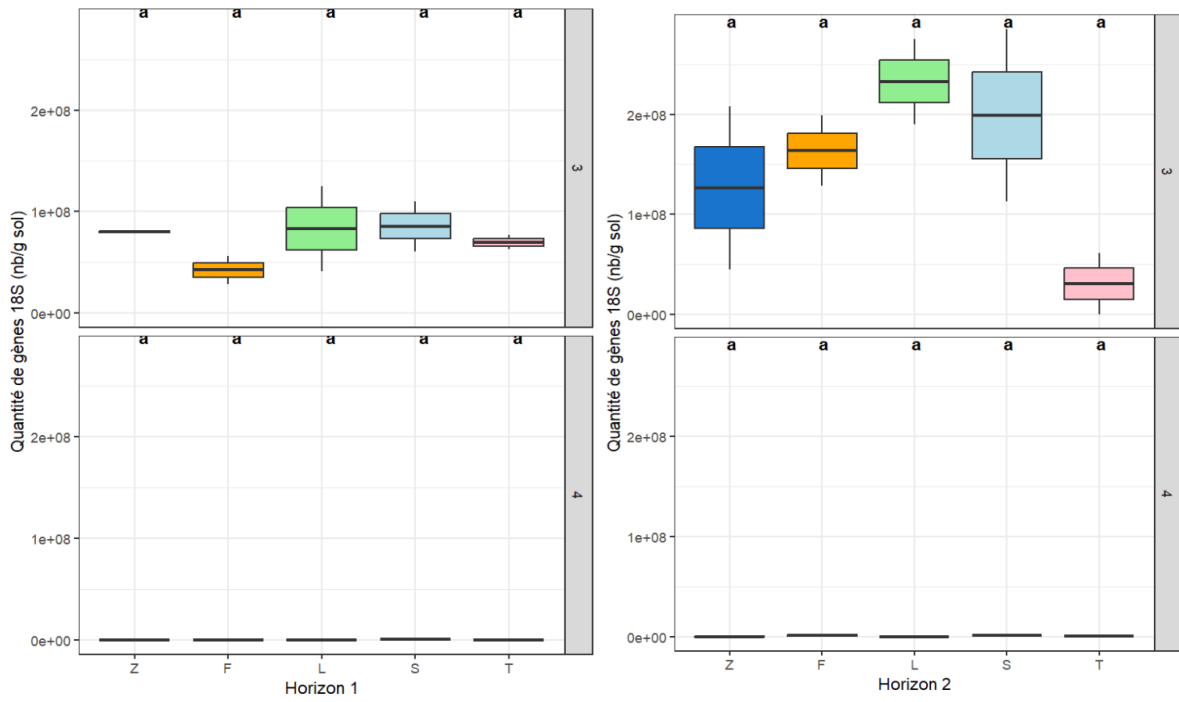
*Concentrations en COT, N total et rapport C/N des buttes n°1 et n°2. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps. (Essais non publiés)*

	<b>COT g/kg</b>	<b>Humus %</b>	<b>N total %</b>	<b>C/N</b>
<b>Zone de référence</b>				<b>8 - 12</b>
Buttes forestières n°1	48	9,6	0,38	13
Buttes en lasagne n°1	52	10,4	0,33	16
Buttes sandwich n°1	46	9,3	0,34	14
Témoins n°1	42	8,4	0,23	18
Buttes en terre n°1	39	7,7	0,23	17
Buttes forestières n°2	62	12,5	0,37	17
Buttes en lasagne n°2	46	9,2	0,31	15
Buttes sandwich n°2	44	8,8	0,30	15
Témoins n°2	30	6,1	0,18	17
Buttes en terre n°2	28	5,5	0,21	13

*pH<sub>KCl</sub> et teneurs en éléments biodisponibles des buttes n°1 et n°2. Les zones de référence sont basées sur des essais effectués dans le cadre de la Commission des Sols de Wallonie par Ir A. Descamps. (Essais non publiés)*

	<b>pH<sub>KCl</sub></b>	<b>P mg/100g</b>	<b>K mg/100g</b>	<b>Mg mg/100g</b>	<b>Ca mg/100g</b>
<b>Zone de référence</b>	<b>6,6</b>	<b>4,6 - 7,5</b>	<b>14 - 21</b>	<b>7 - 10</b>	<b>150 - 200</b>
Buttes forestières n°1	6,8	25,9	92	26	370
Buttes en lasagne n°1	6,7	28,1	76	26	474
Buttes sandwich n°1	7,0	26,1	67	27	429
Témoins n°1	7,1	22,7	50	23	500
Buttes en terre n°1	7,2	22,8	47	21	491
Buttes forestières n°2	7,0	25,2	62	29	463
Buttes en lasagne n°2	6,7	20	59	24	346
Buttes sandwich n°2	6,7	18,0	51	22	309
Témoins n°2	7,1	17	42	19	382
Buttes en terre n°2	6,7	12,9	43	18	321

Annexe 16 : Quantités de gènes fongiques (18S) selon le type de butte, séparé par horizon et par année.



Annexe 17 : Rapport entre le nombre de gènes fongiques (18S) sur bactériens (16S) selon le type de butte, séparé par horizon et par année.

