



Analyse, isolement et datation au ^{14}C de lipids dans les sols. L'exemple des tétraéthers de diglycérol

Blandine Courel, Philippe Schaeffer, Pierre Adam, Damien Ertlen, Dominique Schwartz, Stefano Bernasconi, I Hajdas

► To cite this version:

Blandine Courel, Philippe Schaeffer, Pierre Adam, Damien Ertlen, Dominique Schwartz, et al.. Analyse, isolement et datation au ^{14}C de lipids dans les sols. L'exemple des tétraéthers de diglycérol. Collection EDYTEM. Cahiers de géographie, 2015, 18, pp.57-68. 10.3406/edyte.2015.1350 . hal-02921171

HAL Id: hal-02921171

<https://hal.science/hal-02921171>

Submitted on 24 Aug 2020

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

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

Analyse, isolement et datation au ^{14}C de lipides dans les sols : l'exemple des tétraéthers de diglycérol

Blandine Courel, Philippe Schaeffer, Pierre Adam, Damien Ertlen, Dominique
Schwartz, Stefano Bernasconi, Irka Hajdas

Citer ce document / Cite this document :

Courel Blandine, Schaeffer Philippe, Adam Pierre, Ertlen Damien, Schwartz Dominique, Bernasconi Stefano, Hajdas Irka.
Analyse, isolement et datation au ^{14}C de lipides dans les sols : l'exemple des tétraéthers de diglycérol. In: Collection
EDYTEM. Cahiers de géographie, numéro 18, 2015. Sols et matières organiques. Mémoires et héritages. pp. 57-68;

doi : <https://doi.org/10.3406/edyte.2015.1350>

https://www.persee.fr/doc/edyte_1762-4304_2015_num_18_1_1350

Fichier pdf généré le 22/04/2020

Résumé

Nous rapportons dans cette étude le développement d'un protocole analytique pour l'isolement spécifique, à partir d'échantillons de sol, des tétraéthers de diglycérol isoprénoïdes (i-GDGT) et ramifiés (br-GDGT), composés d'origine microbienne, dans le but de procéder à leur datation au ^{14}C . Ce protocole comprend une étape d'extraction de la composante lipidique du sol avec des solvants organiques, suivie d'étapes de séparation et de purification par différentes techniques chromatographiques (chromatographie liquide sur colonne, chromatographie liquide à haute performance et chromatographie sur couche mince). Après isolement, la datation au ^{14}C de ces deux séries de composés dans deux échantillons d'un profil de sol, l'un de surface, l'autre en profondeur (40-50 cm) indique qu'en dépit d'une origine biologique distincte, les i-et br-GDGT présentent des temps moyens de résidence (TMR) similaires en profondeur, TMR qui sont inférieurs à ceux de la matière organique de ce même échantillon et des différents compartiments qui la constituent. Ceci suggère soit que ces lipides proviennent de microorganismes utilisant une même source de carbone constituée d'un mélange d'une matière organique récente et ancienne, à moins qu'ils ne proviennent d'un mélange provenant d'une population ancienne et d'une population plus récente. Quoi qu'il en soit, ces observations préliminaires suggèrent que l'utilisation de (paléo) proxies reposant sur la distribution des GDGT dans le cas des sols est parfois discutable, ou, tout au moins, incitent à la prudence quant à d'éventuelles interprétations dans le cadre de reconstitutions (paléo) environnementales.

Abstract

We report here the development of an analytical protocol for the specific isolation of isoprenoid and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (i-and br-GDGTs, respectively) of microbial origin from soil samples for radiocarbon dating. This protocol comprises an extraction step followed by several chromatographic steps combining different techniques (silica gel column chromatography, high performance liquid chromatography and thin layer chromatography). Radiocarbon dating of these two series of compounds, isolated from a surface sample and a deep horizon sample (40-50 cm) from a soil profile, shows that i-and br-GDGTs in the deep sample have a comparable mean residence time (MRT), despite their different biological origin. These MRT are, however, lower than those measured for the soil organic matter (SOM) and for the different compartments of SOM. This result suggests that i-and br-GDGTs originate from microorganisms using the same carbon source, made of a combination of ancient and recent organic matter. It can also be envisaged that these compounds originate from both recent and ancient microbial populations. These preliminary results suggest that the use of (palaeo) proxies based on the distributions of GDGTs might be questionable in the case of soils or, at least, that caution is needed when interpreting soil GDGT signals in terms of (palaeo) environmental reconstructions.

ANALYSE, ISOLEMENT ET DATATION AU ^{14}C DE LIPIDES DANS LES SOLS

L'EXEMPLE DES TÉTRAÉTHERS DE DIGLYCÉROL

ISOLATION AND ^{14}C -DATING OF LIPIDS FROM SOILS: THE EXAMPLE OF THE GLYCEROL DIALKYL GLYCEROL TETRAETHERS

BLANDINE COUREL¹, PHILIPPE SCHAEFFER¹, PIERRE ADAM¹, DAMIEN ERTLEN²,
DOMINIQUE SCHWARTZ², STEFANO M. BERNASCONI³, IRKA HAJDAS⁴

¹ Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire, Institut de Chimie de Strasbourg, UMR 7177,
Université de Strasbourg, CNRS, ECPM, 25, rue Becquerel, 67200 Strasbourg, France.

² Laboratoire Image, Ville, Environnement (LIVE), UMR 7362,
Faculté de Géographie et d'Aménagement, 3, rue de l'Argonne, 67083 Strasbourg Cedex, France.

³ Geologisches Institut, ETH Zürich, Sonneggstrasse 5, 8092 Zürich, Suisse.

⁴ Laboratory of Ion Beam Physics, ETH Zürich, Schafmattstrasse 20, 8093 Zürich, Suisse.

Contact : blandine.courel@etu.unistra.fr

RÉSUMÉ

Nous rapportons dans cette étude le développement d'un protocole analytique pour l'isolement spécifique, à partir d'échantillons de sol, des tétraéthers de diglycérol isoprénoides (i-GDGT) et ramifiés (br-GDGT), composés d'origine microbienne, dans le but de procéder à leur datation au ^{14}C . Ce protocole comprend une étape d'extraction de la composante lipidique du sol avec des solvants organiques, suivie d'étapes de séparation et de purification par différentes techniques chromatographiques (chromatographie liquide sur colonne, chromatographie liquide à haute performance et chromatographie sur couche mince). Après isolement, la datation au ^{14}C de ces deux séries de composés dans deux échantillons d'un profil de sol, l'un de surface, l'autre en profondeur (40-50 cm) indique qu'en dépit d'une origine biologique distincte, les i- et br-GDGT présentent des temps moyens de résidence (TMR) similaires en profondeur, TMR qui sont inférieurs à ceux de la matière organique de ce même échantillon et des différents compartiments qui la constituent. Ceci suggère soit que ces lipides proviennent de microorganismes utilisant une même source de carbone constituée d'un mélange d'une matière organique récente et ancienne, à moins qu'ils ne proviennent d'un mélange provenant d'une population ancienne et d'une population plus récente. Quoiqu'il en soit, ces observations préliminaires suggèrent que l'utilisation de (paléo)proxies reposant sur la distribution des GDGT dans le cas des sols est parfois discutable, ou, tout au moins, incitent à la prudence quant à d'éventuelles interprétations dans le cadre de reconstitutions (paléo)environnementales.

MOTS-CLÉS : SOLS, LIPIDES, GDGT, ISOLEMENT DE COMPOSÉS, CHROMATOGRAPHIE, DATATION AU ^{14}C DE COMPOSÉS INDIVIDUELS, TEMPS MOYEN DE RÉSIDENCE.

ABSTRACT

We report here the development of an analytical protocol for the specific isolation of isoprenoid and branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (i- and br-GDGTs, respectively) of microbial origin from soil samples for radiocarbon dating. This protocol comprises an extraction step followed by several chromatographic steps combining different techniques (silica gel column chromatography, high performance liquid chromatography and thin layer chromatography). Radiocarbon dating of these two series of compounds, isolated from a surface sample and a deep horizon sample (40-50 cm) from a soil profile, shows that i- and br-GDGTs in the deep sample have a comparable mean residence time (MRT), despite their different biological origin. These MRT are, however, lower than those measured for the soil organic matter (SOM) and for the different compartments of SOM. This result suggests that i- and br-GDGTs originate from microorganisms using the same carbon source, made of a combination of ancient and recent organic matter. It can also be envisaged that these compounds originate from both recent and ancient microbial populations. These preliminary results suggest that the use of (palaeo)proxies based on the distributions of GDGTs might be questionable in the case of soils or, at least, that caution is needed when interpreting soil GDGT signals in terms of (palaeo)environmental reconstructions.

KEYWORDS: SOILS, LIPIDS, GDGTs, COMPOUND ISOLATION, CHROMATOGRAPHY, COMPOUND SPECIFIC RADIOCARBON DATING, MEAN RESIDENCE TIME.

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, un accent important a été mis sur l'étude de la matière organique des sols en vue de reconstitutions paléoenvironnementales. En effet, les sols comprennent des matières organiques très variées, provenant des végétaux et microorganismes qui vivent ou ont vécu dans et sur le sol et dont les constituants, tels que les lipides, peuvent potentiellement être utilisés pour reconstituer l'histoire d'un sol et son évolution au cours du temps, ou l'évolution des conditions environnementales en relation avec des facteurs anthropiques ou naturels.

Ainsi, les distributions des biomarqueurs lipidiques d'origine végétale dans les horizons superficiels de sols ont pu être corrélées à la nature du couvert végétal (e.g. Otto et Simpson, 2005 ; Trendel et al., 2010), suggérant ainsi que les lipides de végétaux présents dans les horizons profonds peuvent potentiellement servir d'« outils moléculaires » afin de remonter à la couverture végétale originelle (reconstitutions (paléo) environnementales). Une telle approche basée sur les biomarqueurs de végétaux a ainsi été utilisée pour l'étude de l'évolution de la végétation ou du mode d'utilisation des sols au cours du temps (Bull et al., 1999 ; Feng et Simpson, 2007 ; Lavrieux et al., 2012 ; Norris et al., 2013).

Les difficultés, dans ce type d'études s'intéressant à la matière organique d'horizons de sols profonds, sont plurielles, et sont notamment liées à la possibilité d'une contribution de matière organique récente provenant de la surface par lessivage ou bioturbation, à une contribution de matière organique racinaire dans ces horizons, ainsi qu'à un niveau de préservation des substances étudiées qui dépend de multiples facteurs (climat, activité biologique, acidité, profondeur, granulométrie, nature biochimique du sol...). La détermination des temps moyens de résidence (TMR) par datation au ^{14}C de composés individuels ou des fractions lipidiques apparaît comme l'outil de choix indispensable pour déterminer quels sont les marqueurs ou fractions lipidiques dans les horizons profonds de sols que l'on peut utiliser de manière fiable pour des reconstitutions paléoenvironnementales (e.g. Huang et al., 1996 ; Schwartz et al., 2015). La détermination de TMR de composés individuels a également été utilisée très récemment, en parallèle avec la détermination de la composition des isotopes stables du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), pour l'étude du « turnover » de la matière organique des sols dans le cas d'une série d'horizons de surface de sols du Congo ayant connu le remplacement sur une période de 30 ans d'une végétation initiale en C3 par une savane constituée principalement de plantes en C4 (Mendez-Millan et al., 2014).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une classe de lipides microbiens particuliers, les tétraéthers de diglycérol (ou GDGT, pour

« *Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers* », Schouten et al., 2013), qui sont des marqueurs moléculaires récemment mis en évidence dans pratiquement tous les types d'environnements, y compris dans les sols. Il existe deux classes de GDGT identifiées à ce jour, à savoir les GDGT isoprénoides (*i*-GDGT) issus d'archées (Schouten et al., 2013), et les GDGT ramifiés (*br*-GDGT), provenant sans doute d'eubactéries acidophiles (Sinninghe Damsté et al., 2011). L'étude de leurs distributions en milieu continental, notamment dans les sols – ou en milieu sédimentaire lacustre ou de marges continentales ayant connu un apport provenant de sols –, permet d'en extraire des paramètres moléculaires afin de remonter à des informations (paléo)environnementales tels que le paléopH, la paléotempérature de l'eau ou de l'air, ou encore la proportion de matière organique terrestre vs matière organique aquatique (Schouten et al., 2013). Une interprétation fiable de ces paramètres moléculaires, plus particulièrement en termes d'environnements anciens, nécessite cependant de connaître de manière précise la période durant laquelle ont été produits les lipides sur lesquels reposent ces paramètres. Plusieurs questions peuvent, en effet, se poser : les paramètres moléculaires basés sur les GDGT dans des horizons de sols de surface correspondent-ils nécessairement à un signal récent ? Ces paramètres, mesurés dans le cas d'horizons de sols profonds, peuvent-ils effectivement être utilisés pour des reconstitutions de conditions environnementales du passé (marqueurs fossiles) ou, au contraire, reflètent-ils plutôt des signatures moléculaires récentes provenant d'apports de la surface ou issus de microorganismes vivants actuellement en profondeur ? Enfin, dans le cas des sédiments, les signatures moléculaires des *br*-GDGT issues en partie au moins d'une contribution de matière organique des sols, sont-elles uniquement le reflet de populations microbiennes contemporaines au dépôt des sédiments étudiés ou, au contraire, correspondent-elles à des signatures plus anciennes en fonction de l'intensité des processus d'érosion ayant amené de la matière organique d'horizons de sols plus ou moins profonds et anciens ? Un élément de réponse à ces différentes interrogations peut être apporté par la mesure des TMR de GDGT isolés ou de fractions de GDGT par datation au radiocarbone. Cependant, ce type de mesures n'a été effectué qu'à de très rares occasions (e.g. Ingalls et al., 2006 ; Shah, et al., 2008 ; Birkholz et al., 2013), car demandant le déploiement d'un protocole analytique complexe et chronophage. En effet, ce protocole d'isolement et de purification représente un défi analytique dans la mesure où, d'une part, les extraits organiques de sols sont généralement constitués de mélanges lipidiques très complexes, dans lesquels coexistent des milliers de composés,

et, d'autre part, l'abondance des GDGT dans les sols est habituellement très faible. Il s'agit alors de trouver les conditions de purification appropriées permettant d'isoler spécifiquement les molécules ciblées à partir d'une matrice très complexe. Ceci implique notamment un travail très méticuleux, et de nombreuses précautions doivent être prises afin de minimiser les risques de contamination via l'introduction de composés « exogènes » au cours de la manipulation des échantillons (plastifiants, par exemple, potentiellement introduits lors du transport ou de la purification), qui fausseraient les mesures de datation.

Afin de mieux cerner les facteurs environnementaux susceptibles de contrôler les distributions des *i*- et *br*-GDGT dans les sols et d'en comprendre les origines et la dynamique (Loomis et al., 2011 ; Smith et al., 2012 ; Weijers et al., 2007), notamment en termes de temps moyen de résidence (TMR) dans les sols, nous nous sommes intéressés aux GDGT dans le cas d'échantillons d'un profil de sol provenant du massif vosgien (prairie du Falimont, massif du Hohneck) et prélevés à différentes profondeurs. Nous avons étudié, d'une part, les distributions des GDGT en fonction de la profondeur dans ce profil de sol par couplage chromatographie liquide haute performance-spectrométrie de masse (HPLC-MS), celles-ci étant à ce jour

encore peu ou mal documentées, notamment dans le cas d'horizons profonds de sols (Weijers et al., 2006 a, 2007; Yang et al., 2012). Nous avons effectué, d'autre part, des mesures d'âge ^{14}C sur ces GDGT, ce qui constitue, à notre connaissance, une première en ce qui concerne les GDGT d'horizons de sols profonds.

Du fait de la complexité des extraits lipidiques issus de sols, il s'est avéré nécessaire, pour réaliser ces datations au ^{14}C , de mettre au point une méthode de séparation et de purification des *i*- et *br*-GDGT à partir des extraits lipidiques des sols. Cette approche méthodologique repose sur la combinaison de fractionnements des extraits organiques obtenus à partir des sols par plusieurs étapes de chromatographie liquide (CL) sur colonne de silice, chromatographie haute performance (HPLC) en phase directe et inverse, puis chromatographie sur couche mince (CCM). Il a ainsi été possible d'obtenir des fractions purifiées, certes en quantités faibles (quelques microgrammes), mais suffisantes pour accéder à des mesures de datation au ^{14}C qui ont été réalisées par spectrométrie AMS (*Accelerated Mass Spectrometry*) à partir de l'équipement ultra sensible MICADAS (acronyme pour *Mini Carbon Dating System*) doté d'un réacteur mini-volume (Ruff et al., 2007) installé à l'ETH de Zürich (Suisse).

I - PRÉSENTATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1 - Données générales

Les quatre prélèvements ont été effectués au sein du profil de sol du Falimont (Massif Vosgien ; Schwartz et al., 2015) à des profondeurs s'échelonnant de la surface (0-10 cm) à 50-60 cm. Les données générales concernant la teneur en carbone organique et en extrait lipidique des échantillons sont présentées dans le Tableau 1. Il apparaît que le contenu en carbone organique total (COT) diminue fortement avec la profondeur passant de 23,5 %

à 0,4 %. De même, les rendements en extraits lipidiques par rapport au COT diminuent très rapidement pour atteindre des quantités de l'ordre de 5 mg/g de COT.

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) montre que pour ces quatre échantillons, la fraction lipidique est principalement constituée de molécules issues de matériel végétal comme les composés linéaires (*n*-alcane, *n*-alcools, *n*-acides), les phytostérols et les triterpènes de végétaux (Bastien et al., 2013).

Echantillon	COT ¹		EOT ²			<i>i</i> -GDGT		<i>br</i> -GDGT		<i>n</i> -alcane
	% sol	Datation	mg/g sol	mg/g COT	Datation	% EOT	Datation	% EOT	Datation	Datation
FAL 1 (0-10 cm)	23,5	1.127 (0.4) ³ -961 (26) ⁴	8,72	37,1	1.115 (0.5) ³ -874 (34) ⁴	—	—	0,017	0.98 (2.5) ³ 165 (205) ⁴	1.066 (0.8) ³ -516 (63) ⁴
FAL 2 (20-30 cm)	5,8	0.883 (0.3) ³ 996 (31) ⁴	0,88	15,2	0.847 (0.3) ³ 1338 (32) ⁴	—	—	—	—	0.756 (0.3) ³ 2242 (36) ⁴
FAL 3 (40-50 cm)	2,2	0.739 (0.3) ³ 2426 (33) ⁴	0,15	6,8	0.675 (0.3) ³ 3159 (35) ⁴	0,022	0.827 (1.2) ³ 1527 (115) ⁴	0,014	0.825 (1.5) ³ 1543 (147) ⁴	0.659 (0.4) ³ 3352 (44) ⁴
FAL 4 (50-60 cm)	0,4	0.589 (0.3) ³ 4272 (36) ⁴	0,02	5,0	0.514 (0.3) ³ 5353 (52) ⁴	—	—	—	—	0.500 (0.3) ³ 5564 (52) ⁴

¹ Carbone organique total; ² Extrait organique total; ³ $F^{14}\text{C}$ ($\pm 1\sigma$, ‰); Fraction Moderne (Stuiver et Polach, 1977; Reimer et al., 2004); $F^{14}\text{C} = \exp(-^{14}\text{C} \text{ age}/6033)$; si $F^{14}\text{C} > 1$, l'échantillon indique la présence de ^{14}C issu d'essais nucléaires atmosphériques (post 1950 AD); ⁴ ^{14}C age BP ($\pm$ yrs): une valeur négative traduit la présence de carbone organique récent (i.e., post 1950 AD).

Tableau 1 - Teneur en carbone organique, extrait lipidique et résultats de datations de fractions organiques du profil de sol du Falimont (FAL). BP : utilisé pour « Before Present »

2 - Matériel

Afin de s'affranchir de toute contamination organique dans nos échantillons (squalène, cholestérol, phtalates...), un certain nombre de précautions particulières doivent être prises. Ainsi, les solvants sont redistillés avant utilisation et tout le matériel (silice, coton, verrerie...) est méticuleusement lavé au dichlorométhane redistillé. En ce qui concerne les plaques de silice utilisées pour les étapes de purification par CCM, elles sont préalablement éluées à l'acétate d'éthyle distillé, séchées à température ambiante puis réactivées à 120 °C à l'étuve pendant quatre heures.

3 - Extraction et préparation des extraits lipidiques

Les échantillons de sol (500 g pour le sol de surface, 1 kg pour les sols plus profonds) sont tamisés (maille 0,45 mm), puis l'extrait organique est obtenu par extraction avec un mélange méthanol (MeOH)/chlorure de méthylène (CH_2Cl_2) en proportions 1 : 1 (v/v, 700 mL, x 2). La première extraction est effectuée à l'aide d'ultrasons (15 min) et la deuxième par agitation mécanique. Après décantation, la phase organique est récupérée après filtration sur célite (Figure 1).

Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif, conduisant à l'obtention de l'extrait lipidique. Une difficulté majeure pour cette étude résulte du fait que, sauf pour le sol de surface, les sols analysés sont pauvres en matière organique extractible (Tableau 1), elle-même contenant des teneurs très faibles en GDGT.

Pour l'analyse qualitative des GDGT par couplage HPLC-MS, une aliquote de l'extrait organique est extraite avec un mélange n-hexane-isopropanol 99 : 1 (v/v) en présence d'ultra-sons. Le surnageant est alors prélevé, filtré sur une membrane PTFE (0.45 μm , diamètre 30 mm) puis analysé par HPLC-MS (Figure 1) selon les conditions reportées par Hopmans et *al.* (2000).

4 - Hydrolyse des extraits lipidiques

L'extrait organique de chaque horizon de sol, placé dans un tube à essai en Pyrex, est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (1,33N) dans du méthanol. Le mélange réactionnel est alors chauffé à 120 °C pendant une heure. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé sous pression réduite, conduisant à l'obtention de l'extrait lipidique hydrolysé. Les GDGT contenus dans celui-ci sont ensuite analysés par HPLC-MS selon la méthode décrite précédemment (Hopmans et *al.*, 2000).

5 - Isolement des *n*-alcanes

Les *n*-alcanes sont isolés par fractionnement sur colonne de silice. L'extrait organique brut, préalablement adsorbé sur silice, est déposé en tête de colonne et les *n*-alcanes contenus dans l'échantillon sont élués avec du cyclohexane. Les *n*-alcanes sont collectés dans le premier volume de solvant (volume mort de la colonne déduit) et leur pureté est contrôlée par GC-MS avant datation au ^{14}C pour s'assurer de l'absence de composés autres que les *n*-alcanes (alcènes, par exemple).

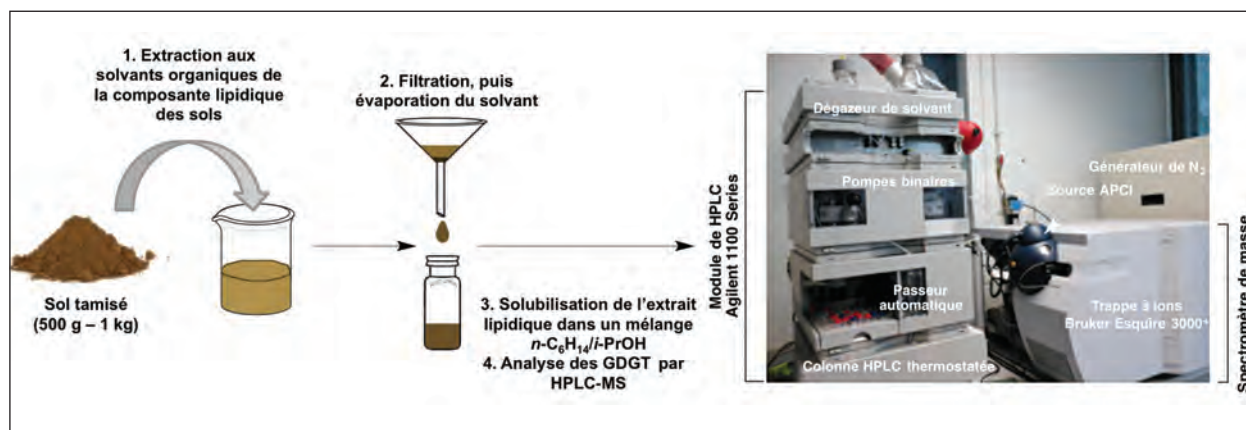


Figure 1 - Protocole analytique utilisé pour l'obtention d'un extrait lipidique et analyse qualitative des GDGT.

II - DÉVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE ANALYTIQUE D'ISOLEMENT DES GDGTS DANS LES SOLS

Le protocole analytique pour la séparation des *i*- et *br*-GDGT décrit ci-dessous (Figure 2) combine différentes techniques chromatographiques et a été appliqué, dans un premier temps, au sol prélevé en profondeur (40-50 cm), puis à celui de surface ne contenant que des *br*-GDGT.

1 - Etape 1 : Purification par chromatographie sur colonne de silice

A l'extrait lipidique solubilisé dans du CH_2Cl_2 , est ajouté de la silice, puis le solvant est éliminé sous pression réduite pour conduire à l'obtention d'un solide poudreux contenant l'extrait organique adsorbé. Celui-ci est alors déposé en tête d'une

colonne de chromatographie liquide (CL) contenant de la silice comme phase stationnaire. Cette première étape de purification est importante car non seulement elle permet d'éliminer les composantes les plus apolaires et les plus polaires de l'extrait lipidique, mais elle permet également de séparer la fraction des *i*-GDGT de celle des *br*-GDGT. En effet, les *i*-GDGT sont légèrement moins polaires que les *br*-GDGT, et sont donc élués avant ces derniers. Après plusieurs essais pour trouver le solvant d'éluion le plus approprié pour permettre une bonne séparation entre *i*- et *br*-GDGT, notre choix s'est porté sur un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (AcOEt) en proportion 4:1 (v/v). L'utilisation d'un tel éluant conduit à l'obtention des *i*-GDGT qui sont récupérés après éluion de l'équivalent de 2 volumes morts (le volume mort

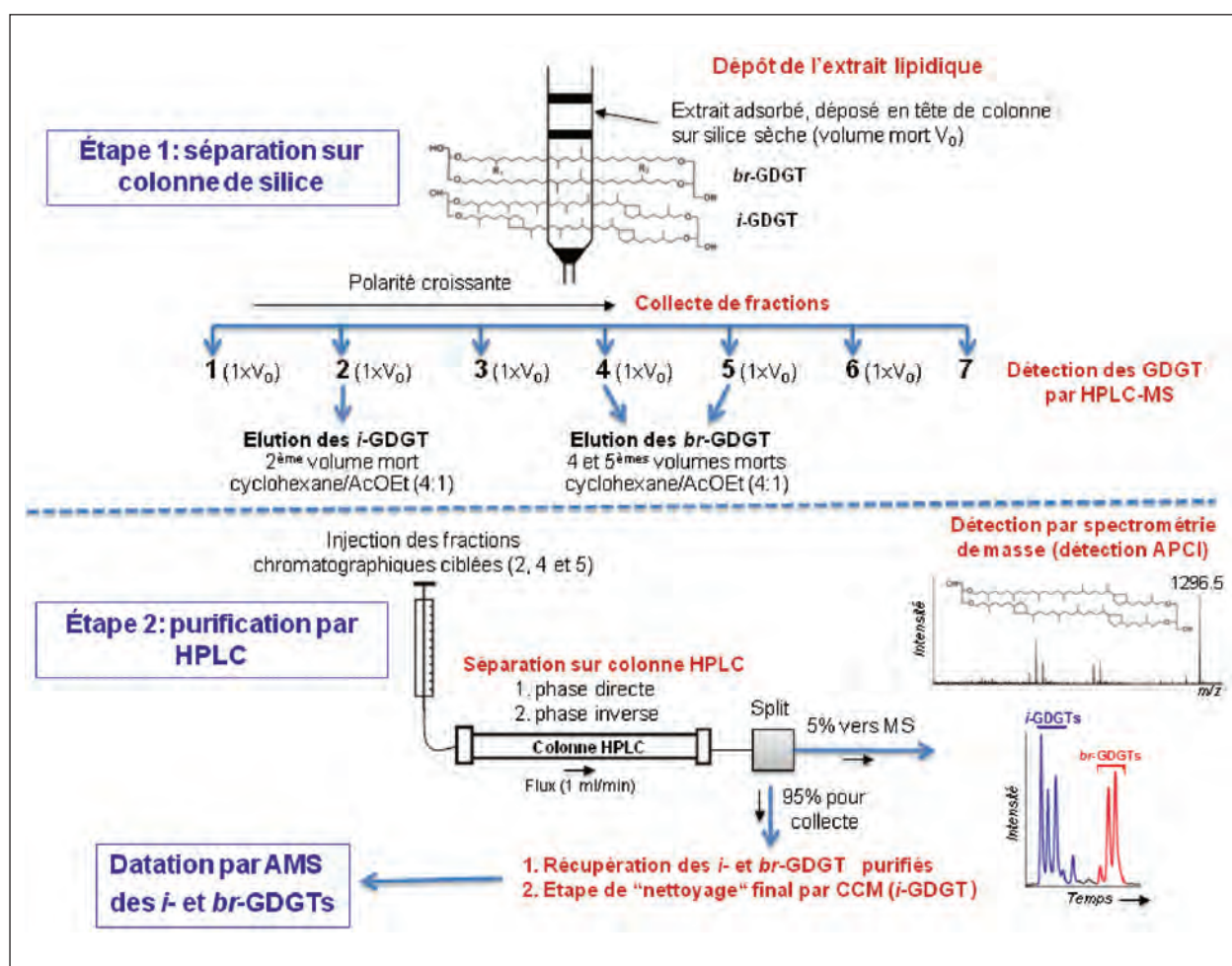


Figure 2 - Protocole analytique développé pour l'isolement des *i*- et *br*-GDGT dans les extraits lipidiques de sols en vue de leur datation au ^{14}C par AMS MICADAS. Ce protocole comprend l'utilisation de la chromatographie liquide sur colonne, de la chromatographie liquide haute performance en phase directe, puis en phase inverse et de la chromatographie sur couche mince (*i*-GDGT). AcOEt : acétate d'éthyle ; AMS : Spectrométrie de masse avec accélérateur ; APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique ; CCM : chromatographie sur couche mince ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; MS : spectrométrie de masse.

V0 ayant servi à mouiller la silice n'étant pas compris dans le calcul), tandis que les *br*-GDGT le sont après élution de 4 et 5 volumes morts (étape 1, Figure 2). Le contenu lipidique de chaque fraction collectée est contrôlé par HPLC-MS (présence d'*i*- et *br*-GDGT) et par GC-MS (présence d'autres composés lipidiques comme des stérols). Ainsi, les fractions 2 (*i*-GDGT) et 4+5 (*br*-GDGT) contiennent bien les lipides ciblés, mais également de très nombreux composés interférents (stérols, triterpènes de végétaux), qu'il s'agit d'éliminer par d'autres techniques chromatographiques, comme la HPLC, en utilisant différents types de phases stationnaires.

2 - Etape 2 : Purification par chromatographie haute performance

Les fractions enrichies en GDGT sont alors purifiées par deux étapes successives de séparation par HPLC (étape 2, Figure 2), impliquant, dans un premier temps, une purification avec une phase directe présentant un greffage de type cyano, puis, dans un second temps, une séparation avec une phase inverse de type C18. Alors qu'un protocole analytique performant d'analyse par HPLC des GDGT avec une phase directe est bien décrit dans la littérature (Hopmans et al., 2000), il n'existe que très peu d'exemples de purification de GDGT en phase inverse (Birkholz et al., 2013). Ces travaux ont donc nécessité en amont le développement d'une méthode analytique appropriée. La première étape de purification en phase directe est ainsi réalisée avec une colonne analytique de type Prevail Cyano (150 x 2,1 mm x 3 µm, Grace Davison Discovery Sciences, Alltech) en utilisant un gradient linéaire (Figure 3). Afin de collecter les GDGT ciblés, une technique de collecte a été mise au point avec un système de dérivation en sortie de colonne permettant de collecter environ 95 % de l'éluant, les 5 % restants étant introduits dans la source du spectromètre de masse pour détection des composés ciblés (étape 2, Figure 2). Cette étape permet ainsi de considérablement enrichir les fractions en *i*-GDGT et *br*-GDGT, mais entraîne une diminution importante de la quan-

tité de matériel. A titre d'exemple, dans le cas de la fraction des *i*-GDGT, en partant de 17 mg de la fraction enrichie en *i*-GDGT obtenue par chromatographie liquide (fraction 2, Figure 2), la première étape de purification par HPLC en phase directe résulte en l'isolement de 900 µg d'une fraction d'*i*-GDGT.

Quant à la séparation des GDGT en phase inverse, une phase d'optimisation de la méthode a été réalisée à partir d'échantillons de sédiments, de sols et d'une tourbe utilisés comme référence, et contenant des *i*- et *br*-GDGT. Différentes phases mobiles (mélanges acétone/MeOH ou AcOEt/MeOH en diverses proportions) ont été testées en mode gradient ou isocratique ainsi que trois phases stationnaires de natures différentes – colonnes Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent), Zorbax Eclipse C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent) et VYDAC C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Cette étape a montré des optimisations différentes dans le cas des *i*- et *br*-GDGT, nous amenant à choisir pour les deux familles des protocoles distincts. Concernant l'isolement spécifique des *i*-GDGT, les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne VYDAC C18 avec un gradient d'élution mettant en jeu un mélange d'AcOEt et de MeOH (Figure 4). Ces conditions opératoires nous permettent une bonne séparation des *i*-GDGT à des temps de rétention convenables pour ce qui en est de la collecte (composés élués entre 10 et 20 minutes).

Par ailleurs, dans le cas des *br*-GDGT, il s'est avéré que la colonne VYDAC n'était pas adaptée, dans la mesure où ces composés, bien que très bien séparés, possédaient un temps de rétention bien trop important, ce qui se traduit par des pics chromatographiques qui « traînent » (Figure 5a), peu propices à la collecte. Il est ressorti de nos différents essais que le protocole analytique le plus adapté pour la purification des fractions chromatographiques contenant les *br*-GDGT comprend l'utilisation d'une colonne ZORBAX C18 avec un gradient binaire à partir d'un mélange de MeOH et d'AcOEt (Figure 5). De telles conditions ne permettent pas, toutefois, la séparation entre les différents homologues de *br*-GDGT, qui apparaissent sous la forme d'un pic unique, qui correspond au pic collecté (Figure 5b).

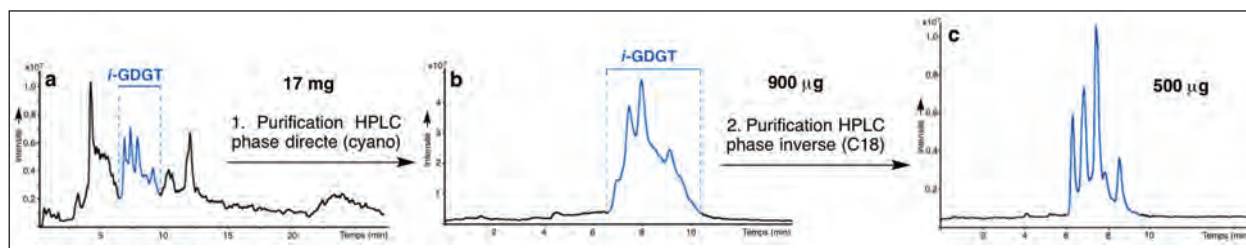


Figure 3 - Exemple de l'isolement des *i*-GDGT par deux étapes de purification HPLC. Chromatogrammes HPLC (TIC, phase directe) a) de la fraction chromatographique F2 isolée par chromatographie liquide ; b) de la fraction des *i*-GDGT après purification par HPLC en phase directe ; c) de la fraction des *i*-GDGT après purification par HPLC en phase inverse. TIC : Courant d'ions total. Colonne HPLC Prevail Cyano Grace Davison Discovery Sciences (Alltech) (150 x 2,1 mm x 3 µm), gradient : isopropanol dans l'hexane 0,5% à 1,3% en 20 min, puis de 1,3% à 5% en 5 min, débit 1 ml/min.

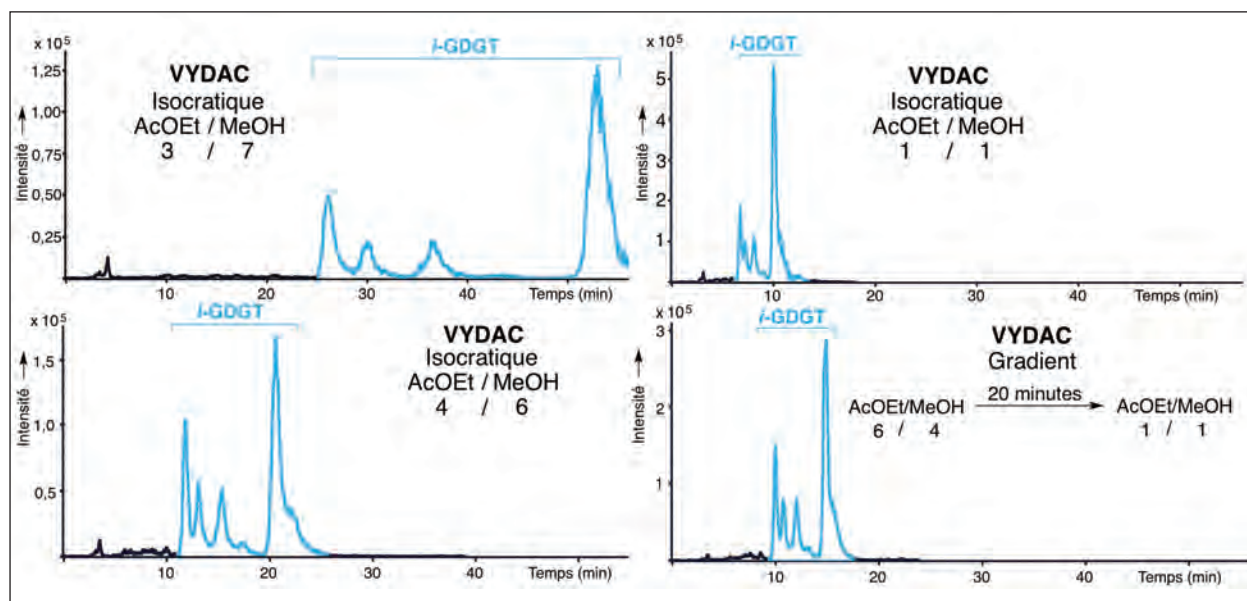


Figure 4 - Chromatogrammes HPLC (ions extraits $[M+H]^+$ 1302,5+1300,5+1298,5+1296,5.+1292,5) montrant la séparation des *i*-GDGT en fonction de différentes conditions d'analyse avec une colonne de type VYDAC C18.

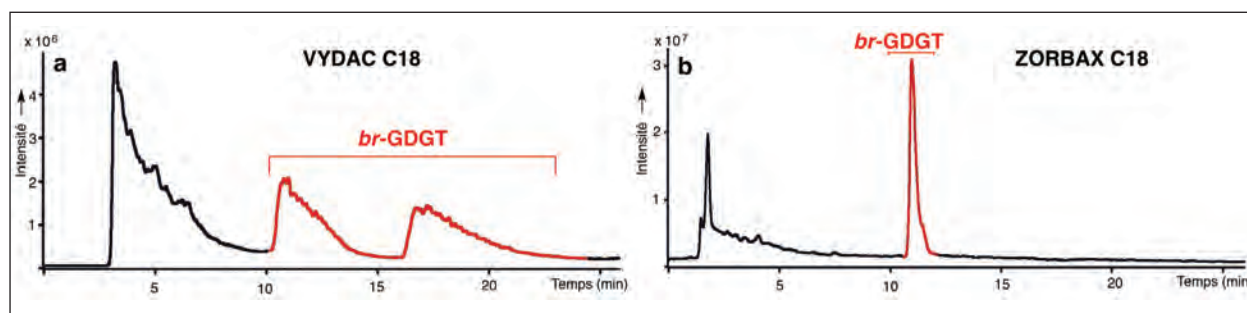


Figure 5 - Chromatogrammes HPLC (ions extraits $[M+H]^+$ 1036,0+1022,0) montrant la séparation des *br*-GDGT sur : a) Colonne HPLC Vydac C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), gradient : AcOEt/MeOH 55/45 à 90/10 en 25 min, puis palier isocratique (5 min), débit 1 ml/min ; b) Colonne HPLC Zorbax C18 SB Agilent (150 mm x 4,6 mm x 5 μm), gradient : AcOEt/MeOH 30/70 à 65/35 en 15 min, puis de 65/35 à 80/20 en 10 min, débit 1 ml/min.

Une dernière étape de purification peut être envisagée selon le degré de pureté obtenu après la purification par HPLC, ce degré de pureté étant contrôlé par HPLC-MS et par GC-MS. Ainsi, cette dernière étape de « nettoyage » est effectuée par CCM, qui va notamment permettre d'éliminer les contaminations potentiellement introduites consécutivement à l'utilisation d'importants volumes de solvants lors de la collecte par HPLC, ces solvants étant ensuite évaporés à sec (ce qui a pour conséquence de concentrer les impuretés des solvants). Dans notre cas, cette dernière phase de purification a été réalisée après isolement par HPLC des *i*-GDGT. La fraction collectée après purification par HPLC est dissoute dans du CH_2Cl_2 , puis déposée sur une plaque préparative de SiO_2 d'épaisseur 0,25 mm. Un composé de référence (GDGT-0; Figure 6), isolé à partir de l'archée *Methanobacterium thermoautotrophicum* (P. Schaeffer, résultats non

publiés) est déposé sur les marges de la plaque afin de délimiter la zone d'intérêt où auront migré les GDGT. L'élution des composés est assurée à l'aide d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (9:1) et le produit de référence est révélé au moyen d'acide phosphomolybdique dans de l'éthanol (GDGT-0 : Rf de 0,69). La zone de Rf choisie, dans laquelle les *i*-GDGT cibles ont été élués, est récupérée (Figure 6). Une filtration sur une courte colonne de silice (éluant : AcOEt) permet alors d'obtenir la fraction des *i*-GDGT qui, après évaporation du solvant, sera prête pour les mesures de datation au ^{14}C par spectrométrie de masse AMS MICADAS. Dans le cas des *br*-GDGT, nous n'avons pas eu recours à cette dernière étape de purification, mais celle-ci est tout à fait transposable à cette famille de composés. Il serait toutefois utile de disposer de composés de référence adéquats pour délimiter au mieux la zone de Rf des *br*-GDGT à récupérer.

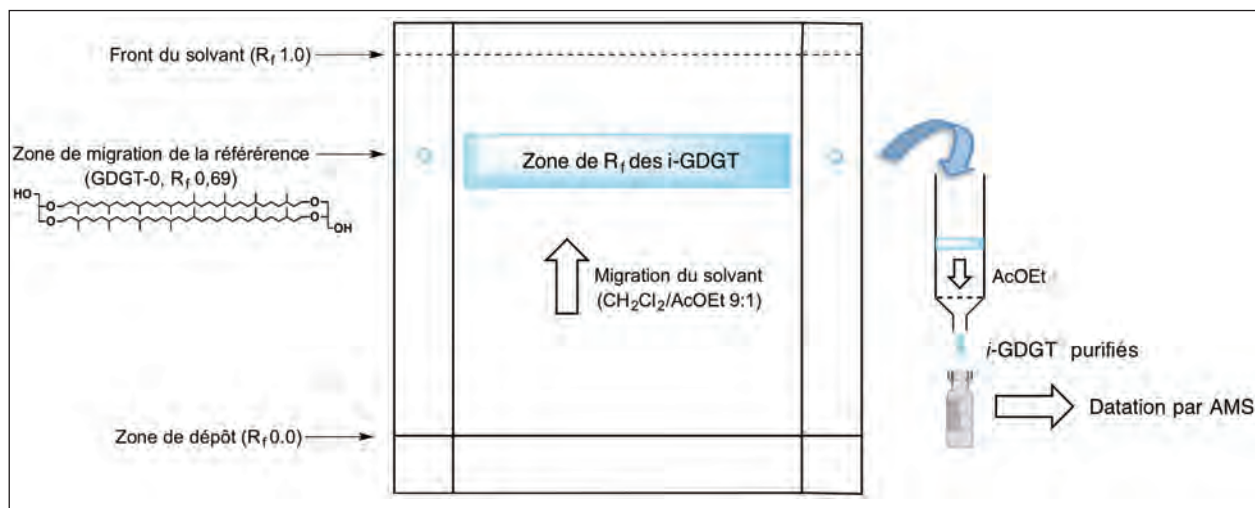


Figure 6 - Dernière étape de purification des *i*-GDGTs par chromatographie sur couche mince en vue de leur datation par spectrométrie de masse AMS MICADAS.

III - DISTRIBUTION ET DATATION PAR AMS DES GDGT

1 - Distribution des GDGT dans le profil de sol du Falimont

L'analyse par HPLC-MS des distributions de GDGT provenant des extraits lipidiques des quatre échantillons du profil de sol révèle d'importantes différences en fonction de la profondeur (Figure 7). Seule la famille des *br*-GDGT est détectée dans l'échantillon de surface et est prédominante par rapport aux *i*-GDGT dans l'échantillon à 20-30 cm, alors que

l'abondance relative des *i*-GDGT augmente significativement avec la profondeur (40-50 cm et 50-60 cm).

Dans la mesure où l'absence d'*i*-GDGT en surface pourrait être due à l'existence d'une population active d'archées produisant essentiellement des GDGT possédant des groupements polaires (appelés IPLs, pour « intact polar lipids ») non analysés par le protocole utilisé dans notre cas, nous avons effectué un traitement acide (HCl/MeOH) afin de convertir ces éventuels IPLs en *i*-GDGT (Lipp et al., 2008). Toutefois, cette hydrolyse n'a pas permis de libérer d'*i*-GDGT,

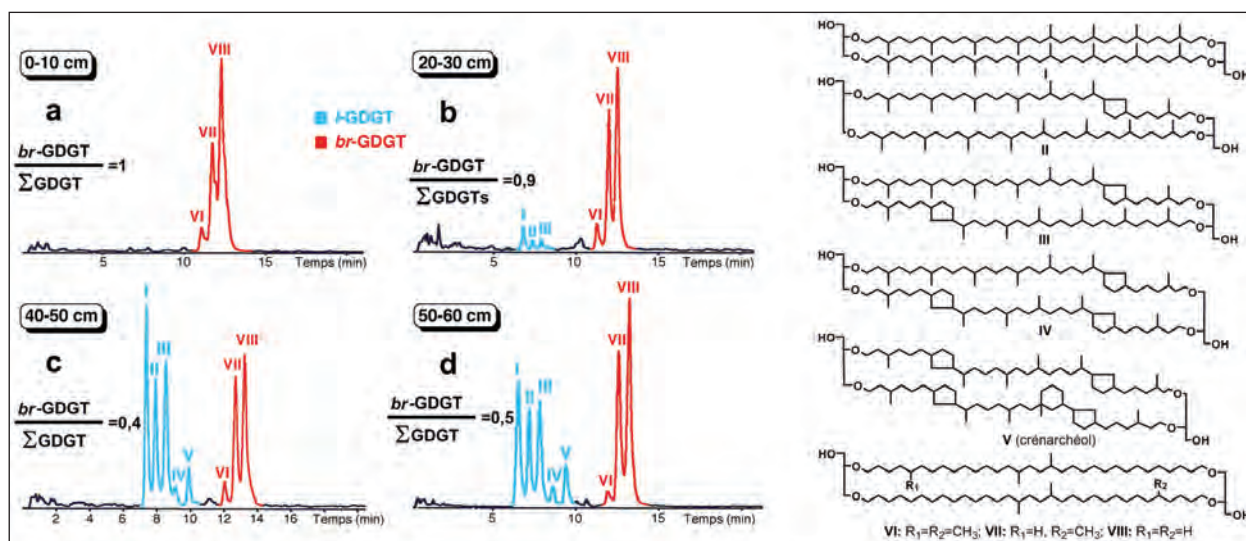


Figure 7 - Distribution des GDGT obtenus par HPLC-MS dans le cas d'un profil de sol du Falimont. Échantillon de surface à 0-10 cm (a), 20-30 cm (b), 40-50 cm (c) et 50-60 cm (d). Les composés sont détectés au moyen de leur ion $[M+H]^+$ avec une source APCI (I, m/z 1302,5 ; II, m/z 1300,5 ; III, m/z 1298,5 ; IV, m/z 1296,5 ; V, m/z 1292,5 ; VI, m/z 1050,0 ; VII, m/z 1036,0 ; VIII, m/z 1022,0).

ce qui exclut *a priori* la présence d'archées dans l'horizon de surface. En revanche, nous ne pouvons déterminer, à ce stade, si les *i*-GDGT détectés plus en profondeur correspondent plutôt à une signature de GDGT ancienne préservée dans les horizons de sol profonds, ou plutôt à une population active vivant en profondeur, voire à une combinaison de ces deux possibilités. Ce point et des éléments de réponse seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Par ailleurs, d'après la littérature, les distributions des GDGT dans les différents types de sols et de sédiments permettent de remonter à des paramètres environnementaux, comme le pH, la température moyenne annuelle de l'air, ou encore la proportion de matière organique marine/lacustre vs terrestre (cf. Schouten *et al.*, 2013 et références citées). Cette dernière, basée sur la proportion relative des *i*- et *br*-GDGT, repose sur le fait que les *i*-GDGT sont majoritairement représentés en milieu aquatique, alors que les *br*-GDGT sont principalement retrouvés en milieu terrestre (sols, tourbières ; Weijers *et al.*, 2006b; Huguet *et al.*, 2010). Dans notre cas, où la proportion de ces deux familles varie en fonction de la profondeur dans un profil de sol, il apparaît que des études supplémentaires sont clairement nécessaires afin de mieux comprendre l'évolution des distributions des GDGT, dans les horizons de sols profonds, notamment au travers de l'étude de leur TMR. On peut, en effet, se demander si les GDGT trouvés en profondeur correspondent à une signature moléculaire fossile – et dans ce cas l'évolution de leur distribution avec la profondeur pourrait refléter une évolution des conditions environnementales en surface au cours du temps – ou, au contraire, s'ils sont issus d'organismes vivant dans les horizons profonds. Les différences de distributions liées à la profondeur refléteraient alors les différences entre les conditions environnementales prévalant dans les différents horizons dans lesquels les microorganismes à l'origine des GDGT se sont développés. Il est possible enfin que la situation réelle soit intermédiaire entre ces deux extrêmes. La détermination des TMR des GDGT peut donc contribuer à apporter des éléments de réponse à ces questions.

2 - Datation des GDGT par AMS

a - Méthode de datation

La méthode de datation au carbone ^{14}C qui a été mise au point par Libby dans les années 1950 (Libby *et al.*, 1949; Libby, 1960) repose sur la mesure de comptage de la radioactivité résiduelle du carbone (^{14}C) dans de la matière organique, cette radioactivité pouvant être reliée à l'âge absolu du matériel organique biologique par une loi de décroissance radioactive tenant compte de la demi vie du ^{14}C qui est de 5730 ans (Libby *et al.*, 1949; Libby, 1960). En effet, tout être vivant assimile

par sa respiration ou son alimentation, de manière continue, du radiocarbone lors des processus de fixation du carbone (biomasse), ce ^{14}C étant issu de la réaction entre un neutron cosmique et une molécule d'azote atmosphérique (^{14}N). Ensuite, à la mort de l'organisme, ce processus d'assimilation du radiocarbone cesse et le ^{14}C se désintègre lentement en suivant cette loi de décroissance radioactive. Cette technique de datation, qui révolutionna le domaine de l'archéologie, permet de dater des objets entre -50 000 ans et 1950, période où les essais nucléaires en haute atmosphère ont profondément modifié les teneurs en ^{14}C atmosphérique (Reimer *et al.*, 2004). Cette méthode de datation « classique » nécessite toutefois l'utilisation de calibrations afin de pallier les variations de la teneur en ^{14}C atmosphérique qui ont eu lieu dans le passé (Fontugne, 2004). Une limitation majeure liée à cette technique vient de la très faible abondance naturelle de l'isotope radioactif ^{14}C (un atome de ^{14}C pour 1.10^{12} atomes de ^{12}C), ce qui implique de travailler à partir d'une grande quantité d'échantillon, de l'ordre du gramme de carbone, pour effectuer une mesure de datation par comptage de la radioactivité résiduelle (comptage β et scintillation liquide). Pour pallier ce problème d'échantillonnage, une technique de datation novatrice a été développée, vers la fin des années 1970, associant un accélérateur de particules à un spectromètre de masse et permettant de séparer et détecter les différents isotopes d'un même atome (Muller, 1977). Cette technique, dite de spectrométrie de masse avec accélérateur (AMS, pour Accelerator Mass Spectrometry), permet ainsi d'évaluer de manière directe la teneur en ^{14}C au sein d'un échantillon avec une bien meilleure sensibilité (absence de comptage de désintégration). Au cours des dernières décennies, la sensibilité de cette méthode n'a cessé d'être accrue, avec notamment le développement de réacteurs de graphitisation/oxydation adaptés à l'introduction de très petits volumes (Ruff *et al.*, 2007). Dans le cadre de nos travaux, nous avons ainsi eu accès au spectromètre de masse MICADAS équipé d'un périphérique d'introduction des gaz pour de très petits volumes, qui est l'instrument de ce type le plus sensible au monde actuellement, et qui permet d'effectuer des mesures de datation d'échantillons en quantités de l'ordre de la dizaine de microgrammes (Figure 8). Il convient de noter ici que l'équipement en soi permettrait même de descendre à des quantités inférieures de carbone, mais à des teneurs si basses se pose le problème critique de l'introduction inévitable de contaminations lors de la manipulation de l'échantillon. Les paramètres liés à l'instrumentation et aux mesures de datation sont décrits par Birkholz *et al.* (2013).

b - Résultats et discussion

En ce qui concerne les mesures de datation des GDGT (Tableau 1), il ressort de nos travaux que les

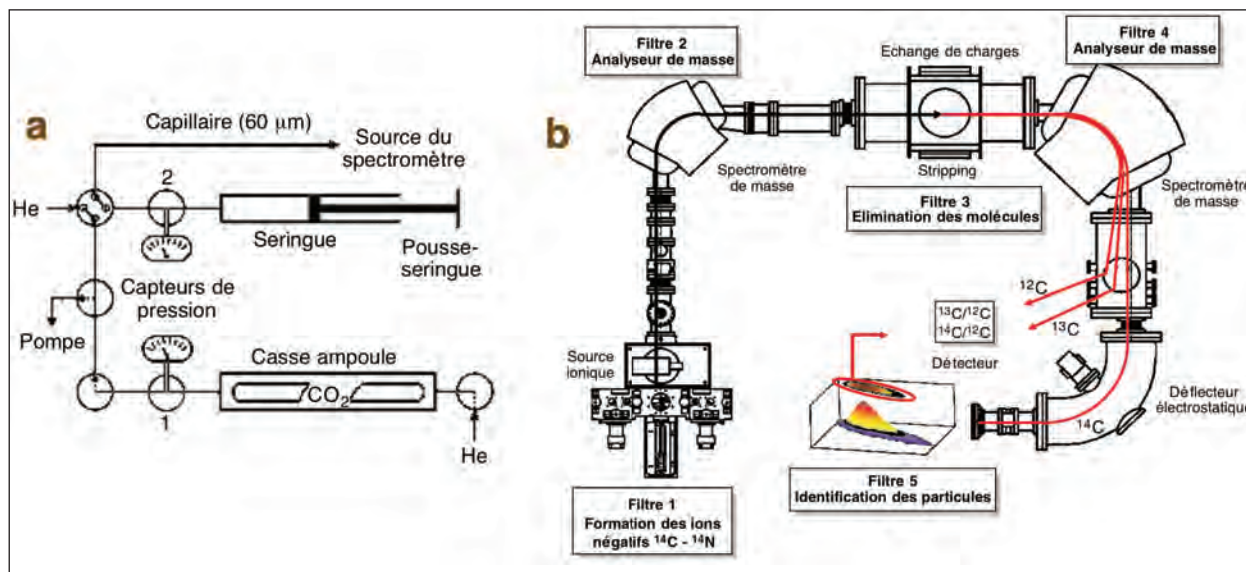


Figure 8 - a) Périphérique d'introduction des gaz (CO₂) pour de très petits volumes (modifié d'après Ruff et al., 2007) ; b) Principe de fonctionnement du spectromètre de masse AMS MICADAS (modifié d'après Suter, 2008).

br-GDGT présents à une profondeur de 40-50 cm (échantillon FAL 3) sont en moyenne plus âgés que ceux de surface puisqu'ils présentent un TMR de 1543 ± 147 ans BP, contre 165 ± 205 BP en surface. Nous pouvons voir ici que les incertitudes sont relativement importantes, notamment dans le cas des horizons de surface du sol, ce qui peut être attribué à la faible quantité de matériel mesuré. Quant aux *i*-GDGT, isolés uniquement dans le cas de l'échantillon FAL 3, ceux-ci présentent un TMR identique à celui des *br*-GDGT du même échantillon (1527 ± 115 BP). Ces valeurs sont à comparer avec celles obtenues pour la matière organique totale, pour l'extrait lipidique (valeurs négatives donc âge moderne en surface vs 3159 ± 35 BP pour FAL 3), ou encore de la fraction des *n*-alcane isolée de ces quatre échantillons de sols (âge moderne en surface, puis croissant avec la profondeur). Dans le cas des *n*-alcane dans nos échantillons, principalement issus de cires cuticulaires de végétaux, cette fraction est généralement considérée comme réfractaire à la dégradation, et semble bien dans les horizons profonds être originaire d'apports végétaux majoritairement anciens ayant été préservés. Les GDGT, quant à eux, présentent en profondeur un TMR nettement plus faible que l'ensemble de la composante organique de ce sol, quels que soient les compartiments considérés.

Les TMR mesurés pour les GDGT en profondeur sont difficiles à expliquer mais plusieurs hypothèses qui ne s'excluent pas mutuellement pourraient être proposées. Ainsi, on peut envisager que la signature moléculaire en profondeur provient des bactéries/archées, connues pour être capables de se développer sur des substrats organiques simples (*i.e.*, en C1-C3; Weijers et al., 2010 ; Tourna et al., 2011),

vivant en profondeur et utilisant une source organique constituée d'un mélange de matériel récent et fossile (matériel récent apporté en profondeur par lessivage et bioturbation). Une autre hypothèse, moins probable, concernant les GDGT en profondeur, serait qu'ils proviennent d'un mélange de GDGT issus de populations anciennes (de même TMR que les *n*-alcane correspondants?), et d'une population plus récente provenant de la surface (mais cette explication ne convient pas pour les *i*-GDGT) ou vivant en profondeur mais utilisant des substrats organiques simples, comme mentionné plus haut, issus de matériel récent et fossile. Ces différentes contributions conduiraient ainsi à un âge « moyen » pour les GDGT.

A l'inverse, dans l'horizon de surface, les différents compartiments de la matière organique sont, assez logiquement, d'âge moderne, alors que les *br*-GDGT sont âgés d'environ 200 ans BP. Il se pourrait donc, en ce qui concerne les *br*-GDGT en surface, que les bactéries dont ils découlent utilisent un mélange de matière organique récente et ancienne comme source de carbone, le matériel ancien pouvant être apporté en surface par bioturbation ou encore que le « turnover » de ces composés n'est pas aussi rapide que celui des autres marqueurs lipidiques, tout au moins dans le sol du Falimont. Il en résulterait que les paramètres environnementaux déduits des distributions de GDGT dans des horizons de surface pourraient, dans certains cas de sols, correspondre à des valeurs moyennées sur des périodes assez importantes. Ceci aurait également une influence sur les paramètres moléculaires basés sur les GDGT obtenus à partir de sédiments ayant reçu des apports de matière organique de sols et sur leur interprétation (décalage en temps par rapport à l'empreinte moléculaire issus du milieu aquatique).

CONCLUSION

Un protocole analytique pour l'isolement spécifique, à partir d'échantillons de sol, des tétraéthers de diglycérol isoprénoides (*i*-GDGT) et ramifiés (*br*-GDGT), composés d'origine microbienne, a été développé et optimisé dans le but de procéder à leur datation au ^{14}C . Ce protocole, qui combine plusieurs techniques chromatographiques, permet d'isoler les *i*- et *br*-GDGT présents en quantités très faibles dans une matrice complexe constituée par la matière organique des sols, et pourra être utilisé par la suite plus généralement pour l'étude (datation) des GDGT dans tout type d'«environnement» (milieux marins, lacustres, sols, tourbières). La datation au ^{14}C de ces deux séries de composés dans deux échantillons issus d'un profil de sol, l'un de surface, l'autre en profondeur (40-50 cm) indique des TMR identiques pour les *i*- et *br*-GDGT en profondeur, TMR qui sont différents de ceux de la matière organique globale et des différents compartiments de celle-ci, y compris les extraits lipidiques et les *n*-alcane. Ceci suggère soit que ces lipides proviennent de microorganismes utilisant une source de carbone constituée d'un mélange de matière organique récente et ancienne, à moins qu'ils ne proviennent d'une population microbienne constituée d'une composante ancienne et d'une population plus récente. Il ressort de ce résultat que les distributions des GDGT en profondeur sont difficiles à interpréter, et en tout cas ne peuvent être interprétées simplement en termes de paramètres moléculaires paléoenvironnementaux

archivés dans les horizons profonds. En effet, il est difficile d'exclure la possibilité que les GDGT dans les horizons profonds soient issus, au moins en partie, de populations actuelles ou assez récentes vivant en profondeur dans des conditions différentes de celles se développant en surface. D'autre part, comme le TMR des *br*-GDGT en surface est plus élevé que celui des autres constituants lipidiques (ces derniers étant clairement modernes), la signature moléculaire des *br*-GDGT en surface peut correspondre à un signal intégré sur une période de temps relativement importante. Ces observations remettent donc en question la pertinence de l'utilisation de (paléo)proxies basés sur la distribution des GDGT dans le cas des sols, ou, tout au moins, incitent à la prudence dans l'interprétation des distributions de GDGT issus de sols dans le cadre de reconstitutions (paléo)environnementales. Ces observations montrent également clairement la nécessité d'études supplémentaires, notamment basées sur la détermination des TMR des GDGT si l'on vise à une interprétation plus fiable des distributions de ces composés en termes de (paléo)environnement. En dehors de proposer un protocole d'isolement des GDGT, ces travaux mettent en avant le potentiel que représente la datation de composés individuels en biogéochimie, donnant désormais accès à leurs temps moyens de résidence, ce qui demande toutefois la mise en œuvre de méthodes analytiques complexes et généralement chronophages.

Remerciements

Cette étude a bénéficié du soutien de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) dans le cadre du programme GESSOL3-APOGEE. Nos remerciements vont à J.-M. Trendel pour l'aide au prélèvement des échantillons, à E. Motsch pour sa contribution aux analyses de spectrométrie de masse. Nous remercions également les Dr. C. Hatté et J. Jacob, ainsi que le rapporteur anonyme, pour leur relecture, corrections et suggestions.

BIBLIOGRAPHIE

- BASTIEN C., LIAUD C., COUREL B., SCHAEFFER P., TRENDL J.-M., ADAM P., GIERGA M., BERNASCONI S.M., ERTLEN D., SCHWARTZ D., HAJDAS I., 2013. Investigating the mean residence time of soil organic matter: are soil lipids reliable biomarkers?, 26th International Meeting on Organic Geochemistry, Tenerife, Espagne, Book of Abstracts, 2, 505-506.
- BIRKHOLZ A., SMITTENBERG R.H., HAJDAS I., WACKER L., BERNASCONI S.M., 2013. Isolation and compound specific radiocarbon dating of terrigenous branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (brGDGTs). *Organic Geochemistry*, 60, 9-19.
- BULL I.D., SIMPSON I.A., DOCKRILL S.J., EVERSLED R.P., 1999. Organic geochemical evidence for the origin of ancient anthropogenic soil deposits at Tofts Ness, Sanday, Orkney. *Organic Geochemistry*, 30, 535-556.
- FENG X., SIMPSON M.J., 2007. The distribution and degradation of biomarkers in Alberta grassland soil profiles. *Organic Geochemistry*, 38, 1558-1570.
- FONTUGNE M., 2004. Les derniers progrès du calibrage des âges radiocarbones permettent-ils une révision des chronologies entre 25 et 50 000 ans B.P. . *Quaternaire*, 15, 245-252.
- HOPMANS E.C., SCHOUTEN S., PANCOST R.D., VAN DER MEER M.T.J., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2000. Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14, 585-589.

- HUANG Y., BOL R., HARKNESS D.D., INESON P., EGLINTON G., 1996. Post-glacial variations in the distributions, ^{13}C and ^{14}C contents of aliphatic hydrocarbons and bulk organic matter in the three types of British acid upland soils. *Organic Geochemistry*, 24, 273-287.
- HUGUET A., FOSSE C., LAGGOUN-DÉFARGE F., TOUSSAINT M.L., DERENNE S., 2010. Occurrence and distribution of dialkyl glycerol tetraethers in a French peat bog. *Organic Geochemistry*, 41, 559-572.
- INGALLS A.E., SHAH S.R., HANSMAN R.L., ALUWIHARE L.I., SANTOS G.M., DRUFFEL A.R.M., PEARSON A., 2006. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6442-6447.
- LAVRIEUX M., BRÉHERET J.G., DISNAR J.R., JACOB J., LE MILBEAU C., ZOCATELLI R., 2012. Preservation of an ancient grassland biomarker signature in a forest soil from the French Massif Central. *Organic Geochemistry*, 51, 1-10.
- LIBBY W.F., ANDERSON E.C., ARNOLD J.R., 1949. Age determination by radiocarbon content: World-wide assay of natural radiocarbon. *Science*, 109, 227-228.
- LIBBY W.F., 1960. Radiocarbon Dating. Nobel Lecture, 12 Décembre 1960.
- LIPP J.S., MORONO Y., INAGAKI F., HINRICHS K.U., 2008. Significant contribution of archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, 454, 991-994.
- LOOMIS S.E., RUSSELL J.M., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2011. Distributions of branched GDGTs in soils and lake sediments from western Uganda: Implications for a lacustrine paleothermometer. *Organic Geochemistry*, 42, 739-751.
- MENDEZ-MILLAN M., NGUYEN TU T.T., BALESDENT J., DERENNE S., DERRIEN D., EGASSE C., THONGO M'BOU A., ZELLER B., HATTÉ C., 2014. Compound-specific ^{13}C and ^{14}C measurements improve the understanding of soil organic matter dynamics. *Biogeochemistry*, 118, 205-223.
- MULLER, R.A., 1977. Radioisotope dating with a cyclotron. *Science*, 196, 489-494.
- NORRIS C.E., DUNGAIT J.A.J., JOYNES A., QUIDEAU S.A., 2013. Biomarkers of novel ecosystem development in boreal forest soils. *Organic Geochemistry*, 64, 9-18.
- OTTO A., SIMPSON M.J., 2005. Degradation and preservation of vascular plant-derived biomarkers in grassland and forest soils from Western Canada. *Biogeochemistry*, 74, 377-409.
- REIMER P.J., BROWN T.A., REIMER R.W., 2004. Discussion: Reporting and calibration of post-bomb ^{14}C data. *Radiocarbon*, 46, 1299-1304.
- RUFF M., WACKER L., GÄGGELER H.W., SUTER M., SYNAL H.A., SZIDAT S., 2007. A gas ion source for radiocarbon measurements at 200 kV. *Radiocarbon*, 49, 307-314.
- SCHOUTEN S., HOPMANS E.C., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2013. The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: a review. *Organic Geochemistry*, 54, 19-61.
- SHAH S.R., MOLLENHAUER G., OHKOUCHI N., EGLINTON T.I., PEARSON A., 2008. Origins of archaeal tetraether lipids in sediments: insights from radiocarbon analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72, 4577-4594.
- STUIVER M., POLACH H.A., 1977. Discussion. Reporting of ^{14}C data. *Radiocarbon*, 19, 355-363.
- SUTER M., 2008. Archaeology radiocarbon dating with accelerator mass spectrometry (AMS). European Summer University, "Physics Probes", Strasbourg, 30 juin - 5 juillet 2008.
- SCHWARTZ D., ERTLEN D., FROELICHER L., VYSLOUZILOVA B., BASTIEN C., COUREL B., SCHAEFFER P., TRENDL J.M., LIAUD C., MOTSCH E., ADAM P., SEFRNA L., HAJDAS I., GIERGA M., BERNASCONI S., 2014. Les archives pédologiques : des concepts de base aux apports du programme GESSOL. Nouvelles approches en spectroscopie proche infrarouge (SPIR) et sur les biomarqueurs moléculaires lipidiques. In CHALMIN E., FAIVRE P., POULENARD J., DAMBRINE E., DAVID B. (dir.), Sols et matières organiques : mémoires et héritages. Actes des sessions communes des colloques « Sols en héritage, les 12^e Journées d'étude des sols » et de la « 2^e réunion des chercheurs francophones en géochimie organique », 30 juin-4 juillet 2014, Université de Savoie, Le Bourget-du-Lac. *Collection EDYTEM*, 18, 104 p.
- SINNINGHE DAMSTÉ J.S., RIJSTRA W.I.C., HOPMANS E.C., WEIJERS J.W.H., FOESEL B.U., OVERMANN J., DEDYSH S.N., 2011. 13,16-Dimethyl octacosanedioic acid (isodiabolic acid), a common membrane-spanning lipid of *Acidobacteria* subdivisions 1 and 3. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4147-4154.
- SMITH R.W., BIANCHI T.S., LI X., 2012. A re-evaluation of the use of branched GDGTs as terrestrial biomarkers: Implications for the BIT Index. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 80, 14-29.
- TOURNA M., STIEGLMEIER M., SPANG A., KÖNNEKE M., SCHINTLMIESTER A., URICH T., ENGEL M., SCHLOTTER M., WAGNER M., RICHTER A., SCHLEPER C., 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 8420-8425.
- TRENDL J.M., SCHAEFFER P., ADAM P., ERTLEN D., SCHWARTZ D., 2010. Molecular characterization of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France). *Organic Geochemistry*, 41, 1036-1039.
- WEIJERS J.W.H., SCHOUTEN S., SPAARGAREN O.C., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2006a. Occurrence and distribution of tetraether membrane lipids in soils: Implications for the use of the TEX86 proxy and the BIT index. *Organic Geochemistry*, 37, 1680-1693.
- WEIJERS J.W.H., SCHOUTEN E.C., HOPMANS E.C., GEENAVASEN J.A.J., DAVID O.R.P., COLEMAN J.M., PANCOST R.D., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2006b. Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environmental Microbiology*, 8, 648-657.
- WEIJERS J.W.H., SCHOUTEN S., VANDENDONKER J.C., HOPMANS E.C., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., 2007. Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 703-713.
- WEIJERS J.W.H., WIESENBERG G.L.B., BOL R., HOPMANS E.C., PANCOST R.D., 2010. Carbon isotopic composition of branched tetraether membrane lipids in soils suggest a rapid turnover and a heterotrophic life style of their source organism(s). *Biogeosciences*, 7, 2959-2973.
- YANG H., DING W., WANG J., JIN C., HE G., QIN Y., XIE S., 2012. Soil pH impact on microbial tetraether lipids and terrestrial input index (BIT) in China. *Science China Earth Sciences*, 55, 236-245.