



HAL
open science

Devenir de la matière organique végétale dans les environnements actuels et passés

Thanh Thuy Nguyen Tu

► **To cite this version:**

Thanh Thuy Nguyen Tu. Devenir de la matière organique végétale dans les environnements actuels et passés. Sciences de l'environnement. Université P. et M. Curie, 2017. tel-03958227

HAL Id: tel-03958227

<https://hal.science/tel-03958227v1>

Submitted on 26 Jan 2023

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.

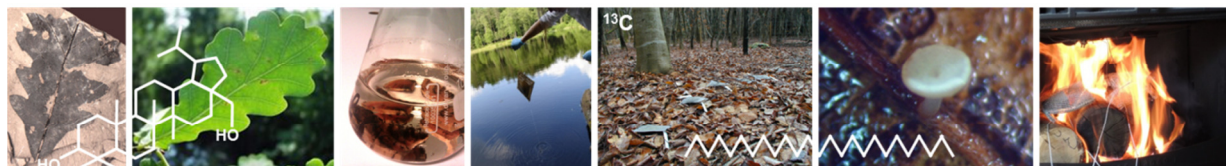
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire présenté en vue de l'obtention de
l'*Habilitation à Diriger les Recherches*

par **Thanh Thuy NGUYEN TU**, Maître de conférences UPMC à l'UMR 7619 METIS
Milieux environnementaux : transferts & interactions dans les hydrosystèmes et les sols

Devenir de la matière organique végétale dans les environnements actuels et passés

**Apport des caractérisations isotopique et moléculaire
à la reconstitution des (paléo)environnements, des organismes sources
et des processus de transformation de la matière organique**



Soutenance prévue le 12 mai 2017

devant le jury composé de :

Brigitte MEYER	Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Vincent GROSSI	Directeur de recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
Luc LAMBS	Directeur de recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
Sylvie DERENNE	Directeur de recherche CNRS, Paris	Examineur
François BAUDIN	Professeur UPMC, Paris	Examineur

Remerciements

Je remercie Brigitte Meyer, Vincent Grossi et Luc Lambs d'avoir eu la gentillesse de rapporter ce manuscrit. J'adresse également un grand merci à François Baudin d'avoir accepté de faire partie du jury et pour ses conseils éclairés depuis le début de ma carrière. Toute ma reconnaissance va à Sylvie Derenne qui a non seulement accepté de faire partie du jury mais qui en a encouragé la rédaction, pour son soutien, sa confiance, son accueil dans son équipe de recherche et pour m'avoir appris les bases de la géochimie organique dès le D.E.A.

Je tiens également à remercier les directeurs des laboratoires de recherche qui m'ont successivement accueillie depuis mon recrutement à l'UPMC : Jean Broutin grâce à qui je peux exercer le métier passionnant d'enseignant-chercheur, Sevket Sen, Philippe Janvier, Luc Abbadie et Jean-Marie Mouchel.

Ce mémoire est le reflet de mes activités de recherche mais je me dois de remercier les collègues qui m'ont particulièrement épaulée pour les enseignements à l'UPMC : Catherine Bajon (mon maître Jedi), Fabienne Audebert, Cécile Drevon, Elodie Boucheron-Dubuisson, Dominique Boucher, Agnès Lameta, François Sarrazin et Régine Vignes. Je remercie également tous les enseignants des UE *Diversité du vivant* et *Insertion professionnelle* avec qui j'ai (eu) beaucoup de plaisir à travailler, ainsi que les étudiants qui, malgré certaines réticences, finissent quand même par intégrer avec satisfaction quelques-uns des concepts enseignés. Je n'oublie pas les collègues qui ont facilité avec enthousiasme le bon fonctionnement de ces UE, notamment Françoise Prudhomme, Ewa Watroba, Martine Dutailly, Ghislaine Lebreton, Nadia Foka et Odette Combrisson.

Je suis redevable à tous les doctorants et stagiaires que j'ai (co)encadrés, qui ont contribué de près ou de loin aux résultats exposés dans ce mémoire : Franck Baton, Romain Tramoy (mon "poulain"), Florent Zanetti, Eric Lascar, Aude Cincotta, Jakub Sakala, Martine Berthelin, Elise Canolle, Alexandre Delorme, Azdine Ravin, Sébastien Bégé, Thomas Silberfeld, Aurélie Kriloff, Nadège Grisat, Thomas Rebaud, Marine Lubin, Blandine Broquet, Katia Grira et Marion Plessis.

Je suis reconnaissante à tous les collègues du LPP puis du CR2P pour leur chaleureux accueil, leur aide et leurs conseils durant les 10 ans que j'ai passés à leurs côtés. J'adresse des remerciements particuliers à Denise Pons, Catherine Gill et Jean-Claude Nicaise. Je remercie également Pim van Bergen, Wolfram Kurschner et Stefan Schouten, pour mon court mais sympathique post-doctorat à Utrecht.

Je remercie Thierry Bariac, Philippe Biron, Patricia Richard, Gérard Bardoux, Bernd Zeller et Sylvain Huon pour leurs précieuses contributions à mon premier projet de recherche, merci pour votre patience (le dernier papier vient seulement de sortir !). Un grand merci à Christine Hatté et Mercedes Mendez-Millan pour notre collaboration sur le projet DynaMOS, et bien d'autres choses encore. Je remercie Johann Schnyder pour m'avoir entraînée dans PaléoNitrogen ; je dois avouer une certaine réticence initiale pour ce projet qui m'a finalement beaucoup apporté. Je suis reconnaissante à Katell Quénéa et Johan Yans qui m'ont conduit à m'intéresser à d'autres choses qu'à la matière organique végétale : celle des vers de terre et des dinosaures. Je remercie sincèrement Alexa Dufraisse qui m'a initiée aux problématiques de l'archéobotanique, et avec qui c'est toujours un plaisir de travailler.

J'ai une pensée particulière pour la Société Française des Isotopes (Stables) qui est mon "foyer isotopique" depuis 15 ans, où j'ai rencontré de nombreux collaborateurs. Je suis redevable à Robert Barbault, Laurent Labeyrie, Claude Largeau et André Mariotti qui m'ont inspirée et guidée au début de ma carrière de chercheur. Je remercie également Céline Egasse, Stéphane Lemette et Brigitte

David qui ont contribué efficacement à la préparation et à l'analyse de nombreux échantillons. Merci à Agnès Ducharne pour ses conseils pratiques sur la préparation de ce mémoire.

Toute ma gratitude va aux collègues du 4^{ème} étage du couloir 56-66 avec qui c'est un plaisir de vivre et travailler au quotidien : Véronique Vaury, Emmanuel Aubry, Marie Alexis, Alexandre Thibault, Amélie Guittet, Yannick Agnan, Jean-Robert Gowe, Maryse Rouelle, Arnaud Huguet, Frédéric Delarue and the last but not the least : Agnès Derieux. Je n'oublie pas les anciens collègues : Joëlle Templier, Sarah Coffinet, Alix Vidal, Antoine Versini et Véronique Marciat. J'adresse des remerciements particuliers à Christelle Anquetil qui analyse consciencieusement tous mes échantillons, même les moins ragoutants, et est toujours partante pour de nouvelles aventures !

Je tiens enfin à remercier tous mes proches, famille et amis, qui ne se sont pas lassés de m'accompagner, me soutenir et m'encourager depuis tout ce temps : mes parents, Stéphane, Solène, Martin, Long, Audrey, Sao Mai, Lili, Magali, Véronique, Sébastien, Kurt, Pierre, Antoine, Elise, Philippe, Roseli, Robert, Philippe, Fernanda, Xavier, Aurélia, Alain, Maud, Salam, Anne et les autres ...

Table des matières

Introduction	7
I. Apport de la biogéochimie à la reconstitution de la paléobiologie des végétaux fossiles ...	9
I.1. Chimiotaxonomie lipidique.....	9
I.1.a. Contexte scientifique et objectifs.....	9
I.1.b. Chimiotaxonomie de hêtres pliocènes.....	10
I.1.c. Chimiotaxonomie de ginkgoacées cénomaniennes.....	14
I.1.d. Chimio-taxonomie et -taphonomie de cheirolépidiacées cénomaniennes.....	16
I.1.e. Méthode, intérêts et limites de la chimiotaxonomie appliquée aux fossiles.....	19
I.2. Paléoécologie isotopique.....	20
I.2.a. Principe et précautions.....	20
I.2.b. Paléoécologie de feuilles fossiles cénomaniennes.....	21
I.2.c. Dendroclimatologie sur charbon de bois néolithiques.....	25
I.2.d. Méthode, intérêts et limites de la géochimie isotopique sur macrorestes végétaux.....	28
II. Effets de la dégradation sur la signature biogéochimique des végétaux	31
II. 1. Effets de la dégradation sur la signature isotopique du bois : incubation en microcosme aquatique.....	31
II.1.a. Principe et design expérimental.....	32
II.1.b. Perte en masse des rondelles.....	33
II.1.c. Colonisation fongique des rondelles.....	33
II.1.d. Microflore des poudres.....	34
II.1.e. Dynamique du carbone.....	35
II.1.f. Dynamique de l'azote.....	37
II.1.g. Conclusions et implications.....	38
II.2. Dégradation des biomarqueurs lipidiques dans les sols et les sédiments : expérience en sac de litière.....	39
II.2.a. Principe et design expérimental.....	39
II.2.b. Perte en masse et en lipides totaux au cours de la dégradation.....	40
II.2.c. Effet de la dégradation sur les biomarqueurs lipidiques.....	42
II.2.d. Conclusions et implications.....	45
II.3. Effet de la dégradation sur la signature isotopique des biomarqueurs : expérience en sac de litière avec feuilles marquées au ¹³ C.....	45
II.3.a. Principe et design expérimental.....	46
II.3.b. Caractéristiques globales de la dégradation.....	47
II.3.c. Caractéristiques isotopiques de la dégradation.....	48
II.3.d. Conclusions et implications.....	50
III. Perspectives de recherche	51
III.1. Poursuite des travaux engagés.....	51
III.1.a. Contributions de la biogéochimie aux reconstructions anciennes.....	51
III.1.b. Optimisation d'outils biogéochimiques de reconstitutions anciennes.....	53
III.1.c. Devenir de la MO végétale dans l'environnement.....	54
III.2. Nouveau projet à engager : Rôle des champignons sur les transformations de la MO végétale (dans les sols).....	56
III.2.a. Etat de l'art et contexte du projet de recherche.....	57
III.2.b. Objectif général et questions de recherche traitées.....	58
III.2.c. Caractère innovant et prise de risque.....	59
III.2.d. Actions proposées, méthodologies et calendrier.....	60
III.2.e. Résultats attendus.....	64
Synthèse et conclusion	65
Références bibliographiques	67
Annexe 1 : Curriculum vitae détaillé	77
Annexe 2 : Sélection de 5 articles significatifs	91

Principaux acronymes

Techniques analytiques

^{13}C -CP/MAS-NMR : résonance magnétique nucléaire du carbone avec polarisation croisée et rotation à l'angle magique

AWCD : indice d'activité métabolique moyenne des bactéries cultivables sur une plaque Biolog^{ECO}, calculé à partir de la densité optique des puits avant et après incubation

CRDS : spectroscopie par absorption laser dans un résonateur optique en anneau

EA-IRMS : analyseur élémentaire couplé à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques

GC-C-IRMS : chromatographie (en phase) gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de rapports isotopiques via une interface de combustion

GC-MS : chromatographie (en phase) gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (quadripolaire)

IRMS : spectrométrie de masse de rapports isotopiques

LC-MS : chromatographie (en phase) liquide couplée à la spectrométrie de masse (quadripolaire)

MEB : microscope électronique à balayage

(Nano)SIMS : sonde ionique à haute résolution spatiale (nanométrique)

TMAH Py-GC-MS : pyrolyse point de Curie assistée par transméthyltion à l'hydroxyde de tétraméthylammonium, couplée à la GC-MS

Institutions

AASPE : Archéozoologie & archéobotanique - Sociétés, Pratiques & Environnements (UMR 7209 CNRS-MNHN)

ALYSES : Pôle d'expérimentation et d'analyse des sols et sédiments tropicaux (plateforme IRD-UPMC)

BEF : Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138 INRA)

CR2P : Centre de Recherche sur la Paléobiodiversité et les Paléoenvironnements (UMR 7207 CNRS-MNHN-UPMC)

EC2CO : initiative structurante CNRS Ecosphère continentale et côtière

iEES : Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (UMR 7618 UPMC-CNRS-IRD-UPEC-Paris 7)

IMPMC : Institut de minéralogie, de physique des matériaux et de cosmochimie (UMR 7590 UPMC-CNRS-IRD-MNHN)

ISTeP : Institut des Sciences de la Terre de Paris (UMR 7193 UPMC-CNRS)

LPP : Laboratoire de Paléobotanique et Paléoécologie (EA 3496 UPMC)

Introduction

La biogéochimie s'intéresse, entre autres, aux interactions entre les êtres vivants et leur environnement, biotique comme abiotique, en suivant le devenir d'éléments chimiques et de molécules organiques. Elle vise notamment à documenter les cycles biogéochimiques tels que celui du carbone, dont la compréhension est devenue cruciale en ces temps de changement global. La biogéochimie comporte de nombreux volets dont l'étude de l'influence des conditions environnementales sur la conversion de carbone inorganique en carbone organique (la photosynthèse), l'allocation de carbone dans les différents constituants chimiques des êtres vivants, ou encore la balance minéralisation/stabilisation de la matière organique dans les sols et les sédiments. C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes activités de recherche. Des reconstitutions paléobiologiques aux effets de la dégradation sur la biogéochimie des débris végétaux, ce mémoire présente les principaux résultats que j'ai acquis depuis une vingtaine d'années. Comme le métier d'enseignant-chercheur qui permet une grande diversité de missions, mes activités de recherche sont résolument pluridisciplinaires : (1) à l'interface entre géologie, biologie et chimie, (2) elles couplent les observations micro- et macro-scopiques aux analyses chimiques et isotopiques, et (3) sont basées sur la caractérisation d'échantillons naturels comme sur l'expérimentation.

Ce mémoire est organisé en trois parties. La première résume mes contributions à l'étude des végétaux fossiles par les outils de la géochimie. Dans un premier temps, les principes de la chimiotaxonomie basée sur biomarqueurs lipidiques sont exposés, avant de présenter trois études de cas illustrant les intérêts et limites de l'approche, pour préciser la taxonomie des fossiles. C'est ensuite les reconstitutions paléoenvironnementales à partir des rapports des isotopes stables du carbone qui sont abordées, avec deux applications, l'une sur des feuilles cénomaniennes, l'autre sur des charbons néolithiques. La deuxième partie de ce mémoire détaille trois expériences consacrées à l'étude des effets de la dégradation sur la signature biogéochimique des débris végétaux. La première menée au laboratoire visait à suivre la composition isotopique de bois total en milieu aquatique. La deuxième compare le devenir de lipides foliaires dans un sol et à l'interface eau-sédiment. Et la troisième est consacrée aux effets de la dégradation sur la composition isotopique de lipides spécifiques : les *n*-alcanes à longue chaîne. La troisième partie de ce mémoire présente mes perspectives de recherche : certaines dans la continuité de travaux déjà engagés, mais également un nouveau projet focalisé sur le rôle des champignons dans la transformation de la matière organique végétale. Des annexes complètent ce mémoire : un curriculum vitae détaillé incluant la liste de mes publications et des programmes de recherche auxquels j'ai participé, ainsi qu'une sélection de 5 publications significatives.

I. Apport de la biogéochimie à la reconstitution de la paléobiologie des végétaux fossiles

Cet axe de recherche, que j'ai commencé à explorer dès mon D.E.A., part du constat que nombre de fossiles végétaux contiennent de la matière organique (MO, Fig. 1), et qu'une fois isolée du sédiment encaissant (par séchage, grattage ou attaque acide) cette MO peut être étudiée par les outils (classiques) de la géochimie. Encouragés par quelques travaux précurseurs (Knoche & Ourisson, 1967 ; Degens, 1969) et des analyses suggérant que la biogéochimie des fossiles pouvait avoir conservé des informations paléobiologiques (Bocherens et al., 1993; Logan et al., 1995), mes travaux avaient pour objectifs **d'évaluer le potentiel de l'analyse de la MO des végétaux fossiles par les outils de la géochimie, pour reconstituer leur**



Figure 1. Feuille de chêne du Miocène du Bassin du Rhin.

paléobiologie. Outre le défi méthodologique, ce type d'approche est particulièrement prometteur dans les cas où l'anatomo-morphologie des plantes fossiles est mal préservée ou tellement différente des plantes actuelles que leur interprétation est limitée. Il n'en reste pas moins que, comme en paléobotanique, l'étude géochimique des fossiles à des fins paléobiologiques repose sur le principe d'actualisme. Ce chapitre se décline en deux volets, chimiotauxonomique et paléoécologique, qui sont détaillés ci-après. L'interprétation paléobiologique de la signature biogéochimique des fossiles requiert préalablement de s'assurer qu'elle n'a pas été substantiellement affectée par les processus diagénétiques, et notamment qu'elle n'a pas été oblitérée par celle du sédiment encaissant. Les résultats présentés dans ce chapitre sont volontairement focalisés sur des plantes (1) dont la préservation morphologique est de bonne qualité et (2) issues de contextes sédimentaires/environnementaux bien documentés (par des méthodes indépendantes), afin de tester les approches proposées dans un cadre favorable (avant de pouvoir les généraliser à des conditions moins bien contraintes).

I.1. Chimiotauxonomie lipidique

I.1.a. Contexte scientifique et objectifs

La chimiotauxonomie repose sur le principe que plus des taxons sont étroitement apparentés, plus leur composition chimique est similaire (Smith, 1976). Si les analyses génétiques sont désormais privilégiées pour préciser la taxonomie des organismes actuels, la chimiotauxonomie demeure une méthode pertinente pour l'étude des fossiles. Toute étude paléochimiotauxonomique requiert de disposer de la composition chimique d'échantillons actuels de référence, adaptés à la problématique étudiée. Par exemple, la consultation d'un référentiel de composition chimique des grands taxons végétaux actuels est indispensable pour déterminer si un fossile énigmatique est plus proche des fougères, des conifères ou des plantes à fleurs. S'il s'agit de décider quelle espèce actuelle de chêne est la plus proche d'un fossile de chêne mal identifié, il convient d'analyser au préalable la chimie des principales espèces actuelles de chênes.

A condition qu'elles aient été préservées au cours de la fossilisation, la plupart des molécules constitutives des tissus végétaux peuvent théoriquement faire l'objet de caractérisations chimiques chez les fossiles : lipides, lignine, cutine, sucres, etc. Toutefois, ce sont les lipides qui sont les plus étudiés pour la chimiotauxonomie des fossiles. Chez les végétaux, on trouve des lipides à l'intérieur des cellules, dans les membranes cellulaires et en couche imperméable (cires

épicuticulaires) recouvrant tous les organes aériens (feuilles, tiges, organes reproducteurs). Les lipides constituent des molécules de choix en paléochimiotaxonomie pour les raisons suivantes :

- La caractérisation des lipides est assez simple : après extraction aux solvants organiques, leur analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) permet d'identifier directement leurs constituants.

- C'est parmi les lipides que l'on trouve le plus de marqueurs taxonomiques. Par exemple dans la famille des terpènes polycycliques, les triterpènes pentacycliques "non-stéroïdiens" tels que la firiédeline ou la bétuline sont considérés, chez les plantes actuelles, comme caractéristiques des angiospermes alors que les diterpènes tricycliques comme le ferruginol ou l'acide abiétique sont les plus fréquents dans les conifères actuelles (Fig. 2; Otto & Wilde, 2001).

- Le caractère hydrophobe des lipides favorise leur préservation dans de nombreux fossiles. De plus, de nombreuses molécules lipidiques conservent des informations taxonomiques même après transformation diagénetique.

Pour reprendre l'exemple des terpènes, le séconocarboxyfriedelane est un produit de dégradation caractéristique de la firiédeline et signe donc des affinités angiospermiennes chez les fossiles. De même, l'hydroxysimonellite est un dérivé diagénetique du ferruginol : il est donc caractéristique des conifères. Les diterpènes du groupe du ferruginol permettent même d'aller plus loin dans l'identification des fossiles puisqu'ils sont typiques des cupressacées sensus lato, chez les conifères actuelles.

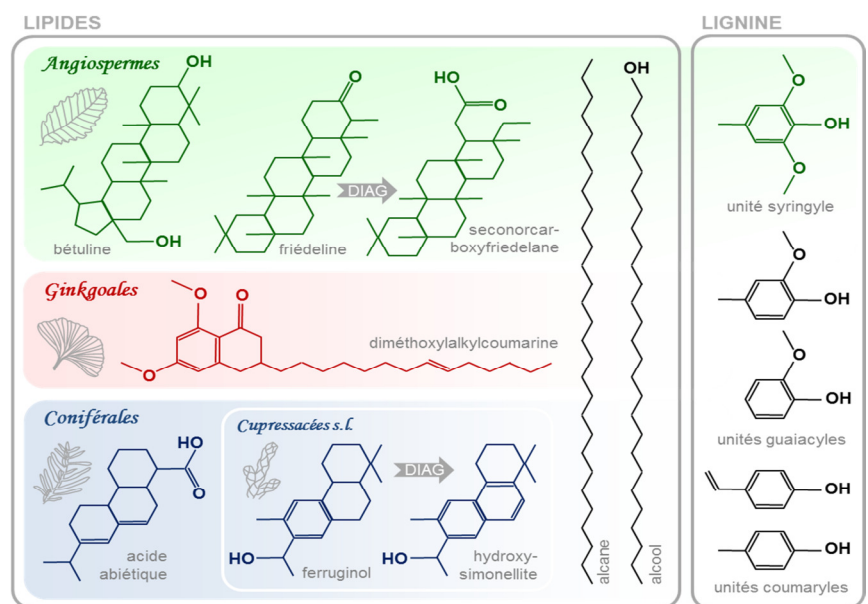


Figure 2. Exemple de marqueurs taxonomiques chez les plantes actuelles et fossiles.

- Enfin, plusieurs analyses comparatives de fossiles et de leur sédiment encaissant ont montré que si les lipides des fossiles pouvaient être légèrement influencés par les lipides de l'encaissant, ils restaient généralement concentrés dans et sur les fossiles (Logan et al., 1995).

Les études chimiotaxonomiques que j'ai menées sur des végétaux fossiles ont principalement porté sur des fossiles de feuilles, rattachés aux "gymnospermes" et aux angiospermes, datant du Permien au Pliocène. Trois études de cas sont présentées ci-après afin de rendre compte de la diversité des informations que l'analyse chimique des lipides peut fournir, mais également des contraintes liées à cette approche.

1.1.b. Chimiotaxonomie de hêtres pliocènes



Figure 3. Feuille de hêtre du Pliocène du Valdarno.

Cette étude (thèse F. Zanetti) a porté sur des feuilles pliocènes ($\pm 2,7$ Ma) du genre *Fagus* issues de sédiments silteux du bassin du Valdarno, dans les environs de Florence (Fig. 3). Ces feuilles qui sont rapprochées de l'espèce fossile *F. haidingeri*, présentent de grandes similitudes anatomo-morphologiques avec le hêtre commun actuel, *Fagus sylvatica* (Zanetti et al., 2007). La matière organique des feuilles fossiles a

été isolée de l'encaissant par grattage au scalpel puis les lipides ont été extraits, fractionnés et analysés en GC-MS. La composition chimique des lipides foliaires du hêtre fossile a été analysée et comparée à celle (1) du sédiment encaissant et (2) de *F. sylvatica*, afin d'en évaluer la valeur chimiotaxonomique.

Les lipides foliaires du hêtre européen actuel sont apparus en GC-MS comme un mélange complexe de plus de 60 molécules identifiées, appartenant à des familles chimiques variées : stérols, composés isopréniques acycliques, composés aliphatiques à longue chaîne (> C₂₀), monoglycérides et triterpènes pentacycliques (Fig. 4 ; Nguyen Tu et al., 2007). Les molécules identifiées chez *F. sylvatica* correspondent majoritairement à des constituants communs des lipides de plantes terrestres, et plus spécialement d'angiospermes concernant les triterpènes pentacycliques non stéroïdiens. Les lipides du hêtre fossile se sont avérés assez diversifiés, bien

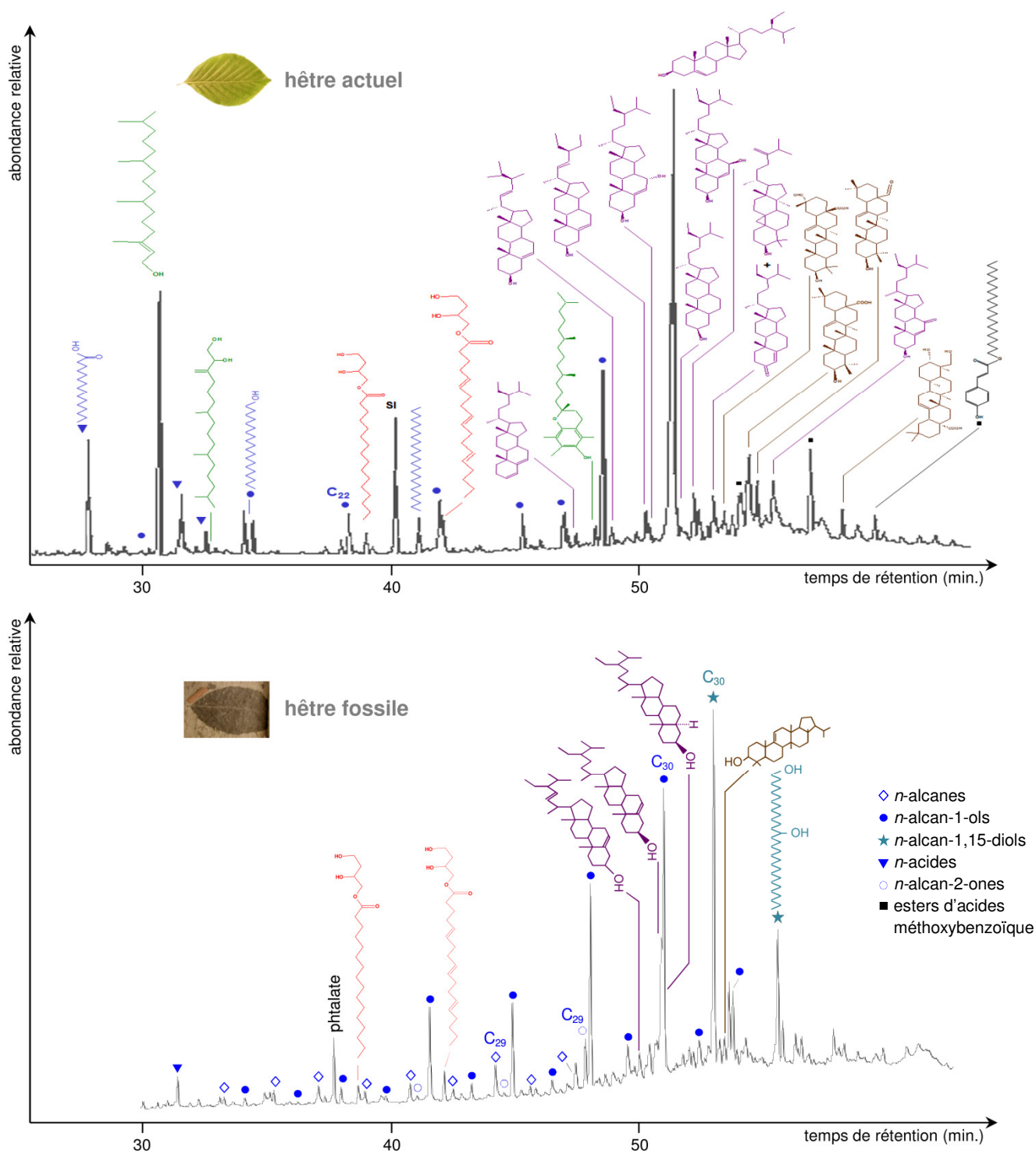


Figure 4. Chromatogramme de la fraction majoritaire des lipides foliaires des hêtres actuel et fossile étudiés. Fraction éluée au CH₂Cl₂/CH₃OH des lipides extraits au CH₂Cl₂/CH₃OH.

que moins complexes que ceux de leur équivalent actuel (Zanetti et al., 2007). Ils sont dominés par des alcools à chaîne saturée (*n*-alcan-1-ols, *n*-alcan-1,15-diols), en plus d'autres séries de composés aliphatiques à longue chaîne (*n*-alcanes, *n*-alcan-2-ones, *n*-acides, *n*-alcanals,...), de monoglycérides, de diterpènes tricycliques (totarane, phyllocladane, ferruginol), d'hopanoïdes, de stéroïdes (dérivés du cholestérol et du sitostérol) et d'autres triterpènes pentacycliques (à squelette lupane, arborane et oléanane; Fig. 4). La présence de molécules au potentiel de préservation limité, comme les alcools ou les aldéhydes, montre que le niveau de préservation chimique de la MO étudiée est élevé. Toutes les molécules identifiées dans les feuilles fossiles ont également été détectées dans les lipides du sédiment encaissant, bien que leurs abondances relatives et la distribution des séries de composés aliphatiques soient différentes entre les deux types d'échantillons.

Les composés aliphatiques à longue chaîne sont généralement considérés comme caractéristiques des cires épicuticulaires des plantes terrestres (Eglinton & Hamilton, 1967; Baker, 1980; Bianchi, 1995). Ce n'est pas le cas des constituants à chaîne courte et moyenne ou des dérivés du glycérol qui sont ubiquistes et n'ont aucune valeur chimiotaxonomique. Les hopanoïdes, les stéroïdes de la famille du cholestérol et les diols identifiés ne correspondent vraisemblablement pas à des constituants originaux des fossiles dans la mesure où ils sont respectivement caractéristiques de bactéries, d'eucaryotes non photosynthétiques et d'Eustigmatophycées, une famille de microalgues phytoplanctoniques (Versteegh et al., 1997 ; Peters et al., 2005). Les diterpènes tricycliques, stéroïdes dérivés du sitostérol et triterpènes pentacycliques non stéroïdiens identifiés constituent des molécules typiquement végétales. Alors que les dérivés du sitostérol se trouvent dans la plupart des organismes photosynthétiques, les diterpènes identifiés sont typiques des conifères (même du groupe des cupressacées *sensus lato* pour le totarol) et les triterpènes pentacycliques non stéroïdiens caractéristiques des angiospermes.

La présence de tous ces constituants dans les lipides sédimentaires montre la multiplicité des sources de la MO sédimentaire : phytoplancton, bactéries et plantes terrestres (angiospermes et conifères). La présence de biomarqueurs caractéristiques des cupressacées dans le sédiment est en accord avec l'abondance de ce groupe de conifères dans la macroflore fossile du gisement (Bertini & Roiron, 1997 ; Bertini, 2002). La présence de molécules communes aux fossiles et au sédiment encaissant suggère une origine identique pour ces lipides, qui pourrait être due à (Zanetti et al., 2007) :

- la colonisation des feuilles par des bactéries et des micro-algues de leur vivant ou durant le transport et l'enfouissement, la surface des feuilles vivantes comportant une microflore bactérienne importante (Last & Deighton, 1965) qui peut s'enrichir de micro-algues ou champignons au cours de la sénescence des feuilles et de la dégradation sur le sol (Nguyen Tu et al., 2007, 2011) ⇒ diols, hopanoïdes ;
- le dépôt/l'adsorption de matière organique aquatique sur les feuilles au cours de leur transport, de leur traversée de la colonne d'eau et de leur sédimentation (Logan et al., 1995) ⇒ tous lipides, notamment diols, dérivés du cholestérol, diterpènes ;
- la contribution de (microparticules de) feuilles de hêtre à la matière organique sédimentaire (⇒ composés aliphatiques, triterpènes pentacycliques non stéroïdiens) combinée à la diffusion de lipides sédimentaires à l'intérieur des feuilles au cours de la diagenèse et de la compaction (⇒ diols, hopanoïdes, diterpènes) ;
- un prélèvement (accidentel) de quelques particules sédimentaires qui auraient pu contaminer les fossiles, lors du prélèvement des feuilles fossiles, bien que la teneur en lipides du sédiment soit bien plus faible que celle des fossiles ⇒ tous lipides, notamment diols, dérivés du cholestérol, diterpènes.

Il est vraisemblable que ces diverses hypothèses aient toutes contribué à la similitude des compositions chimiques obtenues pour les feuilles de hêtre fossile et leur sédiment encaissant. Contrairement aux résultats de l'étude menée sur le site à préservation exceptionnelle de Clarkia (Miocène, Idaho, USA ; Logan et al., 1995), il semble donc qu'il puisse y avoir quelques échanges de lipides entre fossiles et sédiments, même pour des fossiles végétaux présentant une préservation morphologique de qualité. L'exceptionnelle préservation des fossiles de Clarkia est à souligner puisque les fossiles y ont une couleur verte aussitôt après avoir été dégagés, qui vire rapidement au brun après quelques minutes à d'exposition à l'air (Niklas & Brown, 1981).

Dériver une information taxonomique de la composition chimique des lipides du hêtre fossile s'avère donc compliqué et doit être mené avec circonspection. Toutefois, la distribution des longueurs de chaîne des composés aliphatiques (*n*-alcane et *n*-alcools) est différente entre les fossiles qui montrent la dominance marquée d'un ou deux homologues (alcane en C₂₉, alcools en C₂₈ et C₃₀), et le sédiment dont les composés aliphatiques présentent une distribution étalée sans prédominance marquée (Fig. 5). Cette différence de distribution des séries aliphatiques suggère que ces molécules pourraient avoir enregistré certaines informations paléobiologiques. La distribution des composés aliphatiques est susceptible de varier au cours du développement des feuilles, principalement durant les premiers stades de leur développement (Gülz et al., 1991, 1992) et en réponse à des stress environnementaux. On constate souvent une augmentation de la longueur de chaîne avec la maturité des feuilles (El-Otmani & Coggins, 1985) et le stress hydrique (Weete et al., 1978 ; Shepherd & Wynne Griffiths, 2006), sans que ces tendances se retrouvent systématiquement chez toutes les plantes (Salasoo, 1983). La distribution des composés aliphatiques peut également constituer un critère taxonomique, notamment chez le hêtre. Les lipides foliaires de plusieurs espèces de hêtre (*F. crenata*, *F. grandifolia*, *F. japonica*, *F. orientalis*, *F. sylvatica*) ont fait l'objet d'analyses chimiques, et montrent des caractéristiques de distribution diverses qui varient d'une espèce à l'autre, avec une distribution soit largement dominée par un seul homologue (C₂₇ ou C₂₉ pour les alcanes, C₂₈ ou C₃₀ pour les alcools), soit plus étalée (Gülz et al., 1989; Lockheart et al., 1997; Nguyen Tu et al., 2007). En assumant que toutes ces études ont été menées sur des feuilles de maturité similaire, on peut les comparer, à des fins taxonomiques, aux fossiles étudiés. Ces derniers présentent des distributions de lipides assez différentes de ce qui a déjà été publié, notamment chez *F. sylvatica* (Fig. 5). Ces différences de distribution pourraient montrer que malgré leur grande similitude morphologique avec le hêtre commun actuel, les fossiles du Valdarno appartiennent à une espèce différente.

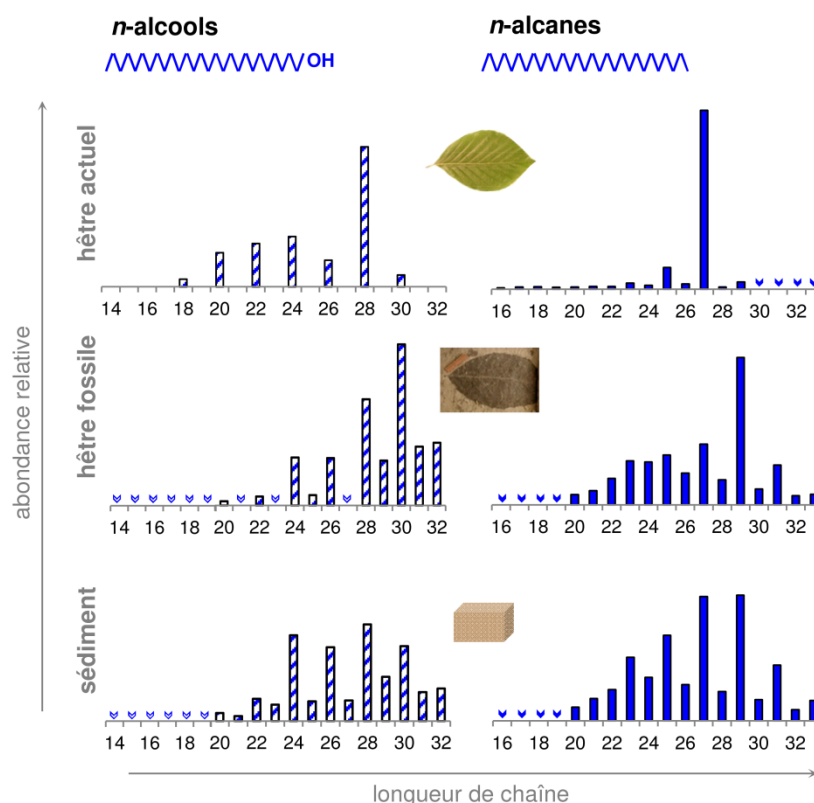


Figure 5. Distribution des *n*-alcools et *n*-alcane des échantillons étudiés au Valdarno. Les flèches indiquent la présence de quantités traces des homologues.

1.1.c. Chimiotaxonomie de ginkgoacées cénomaniennes

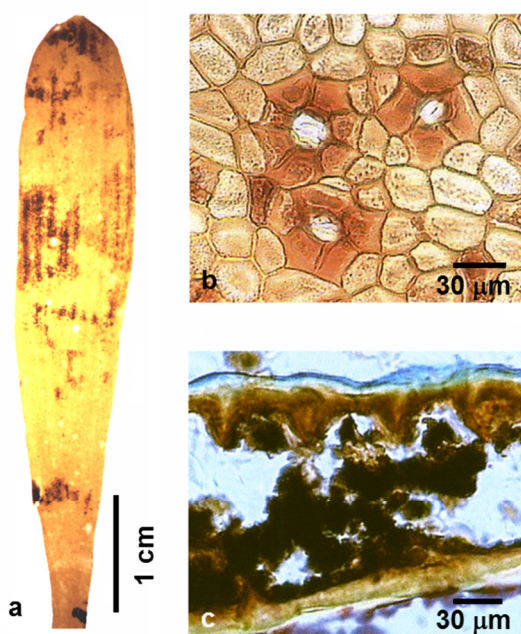


Figure 6. Feuille d'*Eretmophyllum andegavense* (Cénomaniens d'Anjou). a. Vue d'ensemble de la feuille, b. Epiderme inférieur, c. Coupe transversale.

Les fossiles étudiés appartiennent à la ginkgoacée *Eretmophyllum andegavense* et sont issus d'un gisement argileux du Cénomaniens basal (± 96 Ma) des environs d'Angers (Pons et al., 1976; Pons & Vozenin-Serra, 1992). Les feuilles d'*E. andegavense* présentent une exceptionnelle préservation morphologique (Fig. 6), en partie due à la forte épaisseur de leur cuticule. Cette cuticule épaisse marque le caractère xérophytique de la plante, qui se développait vraisemblablement dans des environnements secs voire salés (Pons et al., 1980). La composition chimique des lipides des feuilles d'*E. andegavense* a été comparée à celle (1) de leur sédiment encaissant et (2) des feuilles de *Ginkgo biloba*, la seule ginkgoacée actuelle. Les feuilles ont été soumises successivement à deux types d'extraction des lipides : (1) une immersion rapide (15 s.) dans de l'heptane (C_7H_{16}) pour extraire les lipides externes correspondant principalement aux cires épicuticulaires, et (2) une extraction prolongée

(15 h.) dans un mélange dichlorométhane/méthanol (CH_2Cl_2/CH_3OH , 2/1, v/v) pour extraire les lipides internes. Les objectifs de cette étude étaient triples :

- tester la préservation de lipides originels d' *E. andegavense* dans les fossiles,
- identifier des molécules spécifiques aux Ginkgoacées,
- déterminer quel réservoir de lipides est le plus porteur d'information taxonomique.

L'analyse en GC-MS des lipides extraits des feuilles du *G. biloba* actuel a révélé un mélange de molécules diverses (Fig. 7, Nguyen Tu et al., 2001) :

- un alcool secondaire (nonacosan-10-ol) et la cétone correspondante ;
- plusieurs familles de composés phénoliques à chaîne aliphatique saturée : des 3-alkylphénols (C_{13} , C_{15} , C_{17}), des acides 3-alkylhydroxybenzoïques (C_{13} , C_{15} , C_{17}) et des diméthoxyalkylcoumarines (C_{12} , C_{14} , C_{16}) identifiées ici pour la première fois ;
- des composés isopréniques à chaîne acyclique : tocophérols (α - et γ -), phytol, phytadiènes et cétone isoprénique en C_{18} ;
- des séries de composés aliphatiques à chaîne saturée : *n*-alcane (C_{21} - C_{35} , max. C_{27}), *n*-acides (C_{12} - C_{32} , max. C_{16}) et *n*-alcools (C_{24} - C_{30} , max. C_{28}).

Alors que les lipides internes de *G. biloba* sont dominés par les alkylphénols, le nonacosan-10-ol domine les lipides externes. La plupart des constituants présents dans les lipides externes se retrouvent dans les lipides internes, à l'exception notable des *n*-alcane. Ces derniers se révèlent donc, chez *G. biloba*, caractéristiques des lipides externes, en accord avec leur caractère très hydrophobe et le rôle de barrière imperméable des cires épicuticulaires qui servent notamment à protéger les organes aériens de la dessiccation.

Contrairement aux feuilles de *G. biloba*, l'immersion rapide des feuilles d'*E. andegavense* dans de l'heptane n'a pas permis d'extraire de lipides externes (Nguyen Tu et al., 2003). Les lipides obtenus par extraction prolongée des feuilles d'*E. andegavense* dans un mélange

diclorométhane/méthanol se sont avérés correspondre à un mélange assez simple, dominé par des séries de composés aliphatiques à chaîne saturée (Fig. 7) : *n*-alcane (C_{23} - C_{35} , max. C_{29}), *n*-acides (C_9 - C_{32} , max. C_{16}), *n*-diacides (C_7 - C_{12} , max. C_9) et *n*-alcools (C_{12} - C_{30} , max. C_{18}). Des traces de cadalène et deux diméthoxyalkylcoumarines à chaîne insaturée (C_{14} , C_{16}) ont également été détectées. Les lipides du sédiment encaissant sont apparus plus diversifiés que ceux des fossiles : en plus des composés aliphatiques à longue chaîne (*n*-alcane, *n*-acides, *n*-alcan-2-ones), d'importantes quantités de plusieurs diterpènes tricycliques (nor-abiétriène, déhydroabiétane, simonellite, ferruginol, acide déhydroabiétique) ont été mises en évidence (Fig. 7). La présence, dans le sédiment encaissant, de constituants qui n'ont pas été détectés dans les fossiles (cétones, diterpènes) et inversement (diacides, coumarines) suggèrent que les lipides extraits de feuilles d'*E. andegavense* correspondent principalement à des constituants originels des fossiles. La présence de *n*-alcane dans les lipides d'*E. andegavense* extraits au CH_2Cl_2/CH_3OH suggère que ces lipides correspondent en fait à la somme des lipides internes et des lipides externes. Une telle combinaison

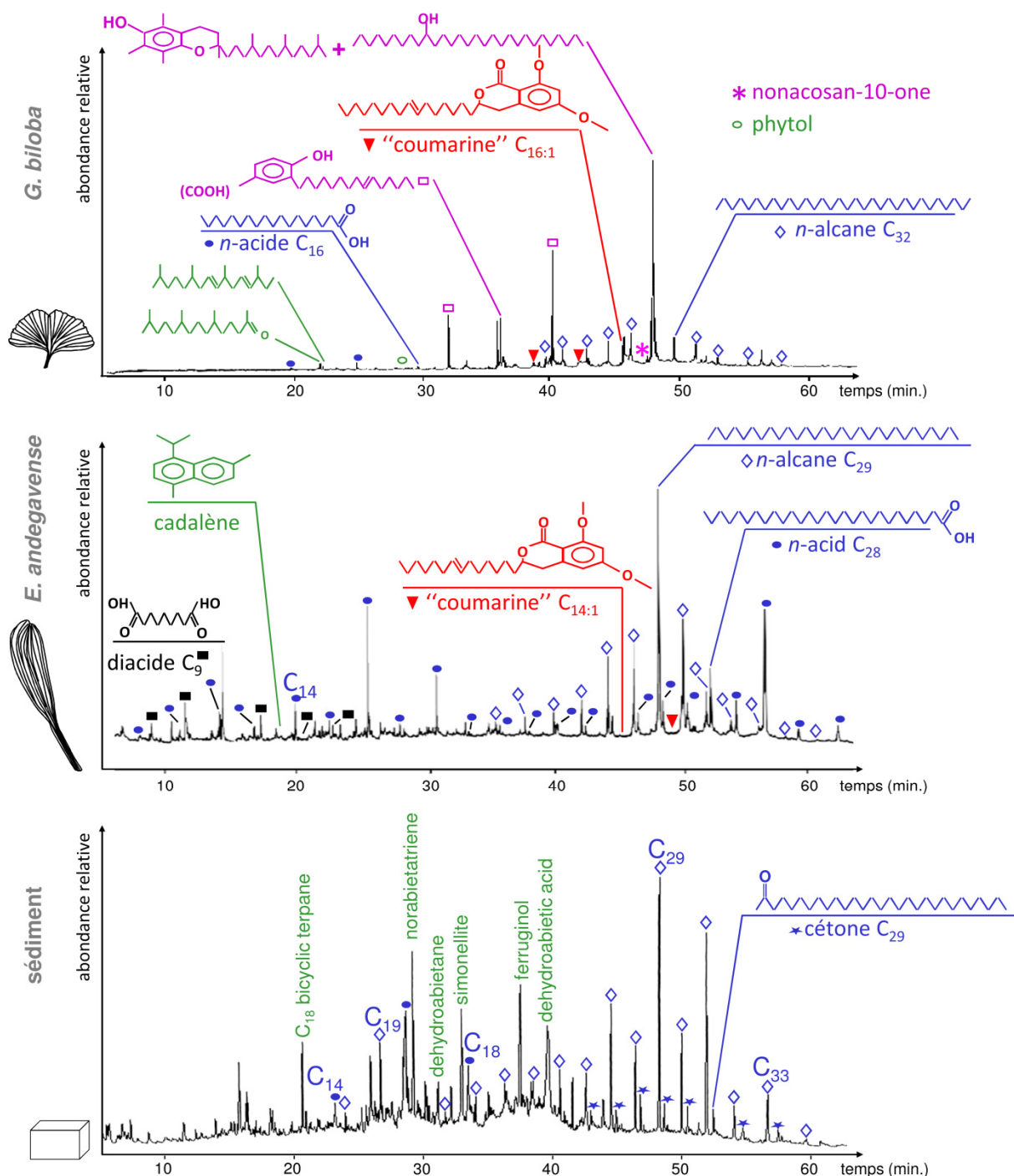


Figure 7. Courants ioniques totaux des lipides totaux de l'étude chimiotaxonomique des Ginkgoacées. Lipides extraits au CH_2Cl_2/CH_3OH .

pourrait être due aux processus associés à la diagenèse et à la fossilisation, comme la migration des lipides externes à l'intérieur des feuilles ou encore leur association plus ou moins forte avec les constituants macromoléculaires des fossiles. Ces résultats suggèrent qu'il est plus judicieux de travailler directement sur les lipides totaux des végétaux (obtenus par extraction prolongée aux solvants) pour la comparaison plantes actuelles/plantes fossiles. La présence de molécules réputées sensibles à la dégradation telles que les alcools et les diméthoxyalkylcoumarines montre que l'excellente préservation morphologique des fossiles étudiés s'accompagne d'une excellente préservation chimique. La présence de molécules très originales, les diméthoxyalkylcoumarines, qui n'ont été détectées que chez *G. biloba*, confirme sur des bases chimiques, le lien de parenté entre *E. andegavense* et *G. biloba*. Ces molécules pourraient donc constituer des marqueurs taxonomiques de la famille des ginkgoacées.

1.1.d. Chimio-taxonomie et -taphonomie de cheirolépidiacées cénomaniennes

Les fossiles étudiés appartiennent à l'espèce *Frenelopsis alata* (Velenovsky & Viniklar, 1926 ; Pons, 1979) rattachée aux conifères. *Frenelopsis* a longtemps été classée dans la famille des cupressacées avant d'être incluse dans les cheirolépidiacées, famille entièrement éteinte, aux contours mal définis, mais néanmoins apparentée aux cupressacées (Taylor, 1981 ; Stewart & Rothwell, 1993). Les spécimens de *F. alata* étudiés proviennent de deux gisements cénomaniens européens situés en Bohême (République Tchèque) et en Anjou. Comme *E. andegavense*, la ginkgoacée fossile issue des mêmes gisements, *F. alata* présente une excellente préservation morphologique et plusieurs adaptations xérophytiques (Fig. 8). On remarque chez *F. alata* une adaptation originale à des climats arides : la présence, à l'extrémité des feuilles, de micropoils qui auraient pu favoriser la condensation nocturne de l'humidité atmosphérique (Broutin & Pons, 1975). L'observation microscopique des fossiles d'Anjou a révélé la présence de champignons épiphylls fossiles sur les épidermes et à l'intérieur des rameaux de *F. alata* (Pons & Boureau, 1977), tandis que les spécimens de Bohême se sont avérés vierges de toute invasion fongique (Nguyen Tu et al., 2000). Les champignons identifiés sur les spécimens angevins correspondent à des espèces parasites et épiphytes qui se sont vraisemblablement développées du vivant des conifères (Pons & Boureau, 1977). Les lipides de spécimens d'Anjou et de Bohême ont été analysés et comparés à ceux de *Tetraclinis articulata*. Bien que *F. alata* et *T. articulata* ne soient pas spécialement apparentés, *T. articulata* est la seule cupressacée actuelle à présenter des micropoils à l'extrémité de ses feuilles. Outre des objectifs chimiotaxonomiques semblables à ceux des études précédentes, ce travail visait également à tester si la présence de champignons épiphylls était détectable dans la composition chimique des lipides végétaux.

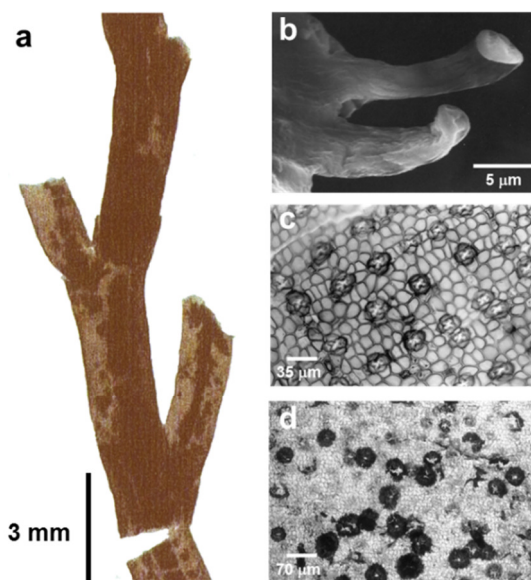


Figure 8. Rameau de *Frenelopsis alata*. a. Vue d'ensemble, b. Micropoils, c. Epiderme sain, d. Epiderme envahi par les champignons

La caractérisation en GC-MS des lipides de *T. articulata* a révélé un mélange complexe de molécules très diverses avec 51 composés différents (Fig. 9). Ces lipides sont largement dominés par des terpénoïdes (5 monoterpénoïdes, 18 sesquiterpénoïdes et 8 diterpénoïdes) qui appartiennent pour la plupart à des familles chimiques ubiquistes chez les conifères (Otto & Wilde,

2001). Les composés les plus abondants correspondent à des diterpènes tricycliques à squelette pimarique. On trouve également deux lignanes (molécules dérivées de la combinaison de deux unités phénoliques de lignine), deux composés isopréniques acycliques dérivés de la chaîne phytyle de la chlorophylle (phytol et phytadiène) et quelques composés aliphatiques à chaîne saturée : *n*-alcanes (C₃₃-C₃₅, max C₃₅) et *n*-acides (C₁₄-C₂₂, max C₁₆).

Les lipides de *F. alata* se sont révélés plus simples que ceux de leur équivalent actuel, bien que présentant une certaine diversité (Fig. 9 ; Nguyen Tu et al., 2000). Ils sont dominés par des composés aliphatiques à chaîne saturée (*n*-alcanes C₁₄-C₃₅, max. C₂₉ ou C₃₁; *n*-acides C₁₀-C₃₂, max. C₁₆), mais comportent également deux molécules benzéniques (acide benzoïque et hydroxybenzaldéhyde) et cinq terpénoïdes polycycliques (cadalène, bényrane, déhydroabiétane, ferruginol et oxoferruginol). Les lipides de spécimens de *F. alata* envahis par des champignons épiphylls comportent en plus sept composés phénoliques et des acides dicarboxyliques (Fig. 9, (Nguyen Tu et al., 2000). Les lipides de *F. alata* montrent quelques constituants communs avec ceux de leur sédiment encaissant (voir section I.1.c. pour la composition du sédiment) : les *n*-alcanes à longue chaîne maximisant en C₂₉ ou en C₃₁, les *n*-acides maximisant en C₁₆, le déhydroabiétane et le ferruginol. Toutefois, plusieurs molécules se trouvent exclusivement dans les fossiles (composés phénoliques, bényrane) ou dans le sédiment (norabiétatriène, simonellite) suggérant que les molécules identifiées dans les lipides fossiles correspondent principalement à des constituants de *F. alata*. L'absence de composé original commun aux deux conifères peut refléter leur éloignement taxonomique mais également l'altération diagénétique de composés plus originaux comme les lignanes. Alors que les diterpènes de l'actuelle *T. articulata* relèvent principalement de la classe pimarine, qui est ubiquiste chez les conifères actuelles (Otto & Wilde, 2001), ceux de *F. alata* relèvent des classes abiétane, abiétane phénolique et bényrane. Contrairement aux abiétanes, les abiétanes phénoliques et les bényranes ne se trouvent que dans un nombre limité de conifères actuelles, notamment les cupressacées (Otto & Wilde, 2001). La présence de ces molécules chez *F. alata* confirme, sur des bases chimiques, le rapprochement souvent proposé entre la famille fossile des cheirolepidiacées et les cupressacées actuelles, au moins concernant la lignée à laquelle appartient *F. alata*.

Les composés phénoliques identifiés dans les spécimens envahis par les champignons sont similaires aux unités élémentaires constitutives de la lignine. De nombreux champignons sont capables de dégrader la lignine grâce à l'activité d'enzymes conduisant à l'oxydation de groupements alcools, à la coupure de liaisons C α -C β et aryl-C α ou encore à la déméthoxylation et à l'ouverture des cycles aromatiques (Evans, 1987 ; Eriksson et al., 1990 ; Dashtban et al., 2010). Les composés phénoliques identifiés dans les fossiles envahis pourraient donc être issus de la dégradation/dépolymérisation de la lignine par les champignons épiphytes, plusieurs de ces molécules ayant été décrites comme des produits de dépolymérisation de la lignine (Odier & Rouau, 1985; Youn et al., 1995). Ces composés pourraient donc constituer des marqueurs moléculaires de l'activité lignolytique des champignons fossiles observés. Si les biomarqueurs typiques de champignons (ergostérol, PLFA 18:2 ω 6,9) n'ont pas pu être détectés dans les spécimens envahis par les champignons, c'est parce que ces biomarqueurs sont en fait caractéristiques de champignons vivants (Högberg, 2006).

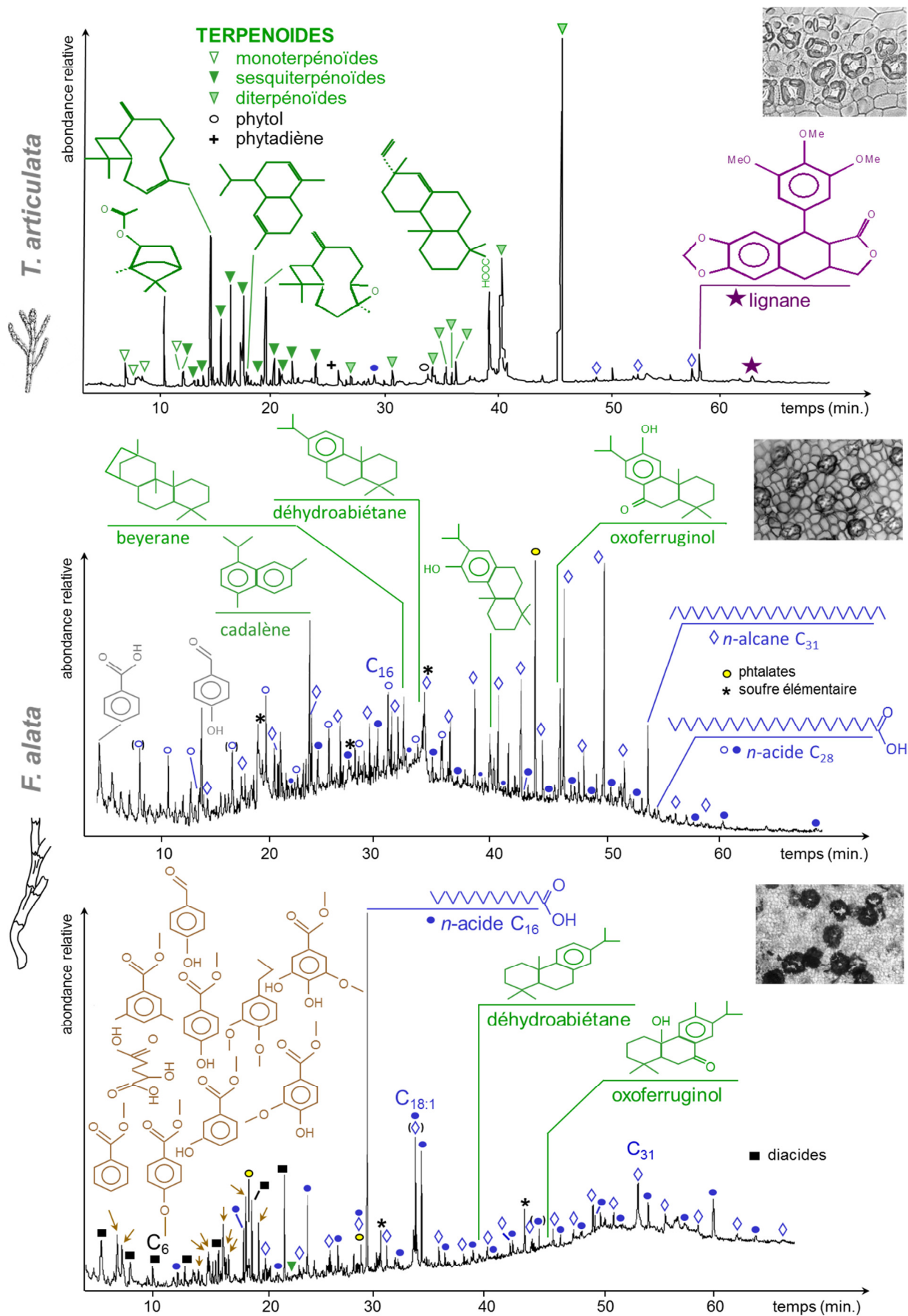


Figure 9. Courants ioniques totaux des lipides totaux de l'étude chimiotaxonomique de *Frenelopsis alata*. Lipides extraits au CH_2Cl_2/CH_3OH .

1.1.e. Méthode, intérêts et limites de la chimiotaxonomie appliquée aux fossiles

Outre les précisions sur la composition chimiques des fossiles étudiés et leurs conditions de fossilisation, ces trois études de cas ont permis de souligner les deux principales contraintes de l'utilisation des lipides des plantes fossiles à des fins taxonomiques : (1) l'intégrité des lipides fossiles et (2) la disponibilité d'échantillons de référence et de marqueurs taxonomiques de plantes actuelles.

La chimiotaxonomie appliquée aux plantes fossiles nécessite que les lipides extraits des fossiles n'incluent pas de quantités substantielles de lipides sédimentaires, ou que du moins, ces derniers soient aisément identifiables. Si l'idéal serait que fossiles et sédiments encaissant ne présentent aucun constituant commun, ceci est rarement le cas. D'autant moins que de la MO dérivée de fossiles plus ou moins fragmentés contribue souvent à la MO du sédiment encaissant les macrofossiles. Un critère alternatif raisonnable est de disposer de constituants propres au sédiment, d'une part, et au fossile, d'autre part. Ceci était le cas des plantes cénomaniennes étudiées et a permis l'identification de marqueurs taxonomiques des plantes et métaboliques des champignons épiphylls. L'interprétation des lipides du hêtre pliocène était plus délicate dans la mesure où tous les constituants identifiés dans le fossile avaient également été détectés dans leur sédiment encaissant. Des différences d'abondances relatives des lipides entre fossiles et sédiments peuvent toutefois éventuellement autoriser quelques interprétations chimiotaxonomiques. Par ailleurs, alors que les fossiles cénomaniens sont bien plus anciens que les fossiles pliocènes, ils semblent avoir été moins affectés par les lipides sédimentaires que les hêtres fossiles. A l'instar de ce que l'on observe généralement pour la morphologie des fossiles, le sédiment encaissant plus fin en Anjou (argiles) que dans le Valdarno (silts), et la cuticule des plantes plus épaisse dans les plantes cénomaniennes (adaptation xérophytique) que dans le hêtre pliocène, ont certainement favorisé l'intégrité de la MO des fossiles d'Anjou. Les trois études de cas présentées ici ont également souligné la contribution potentielle de micro-organismes épiphylls et/ou dégradeurs qui peut influencer les lipides végétaux.

L'étude des végétaux fossiles par chimiotaxonomie requiert en outre la disponibilité d'échantillons et de marqueurs taxonomiques de plantes actuelles, adaptés à la problématique. La composition chimique des spécimens présentés dans ce chapitre est représentative des marqueurs communément reconnus en paléochimiotaxonomie : diterpènes tricycliques pour les conifères et triterpènes pentacycliques pour les angiospermes (Otto & Wilde, 2001 ; Diefendorf et al., 2014). Il convient néanmoins de rappeler que ces critères sont statistiques. Par exemple, des diterpènes existent chez plusieurs angiospermes ; de même que les fougères peuvent produire certains triterpènes pentacycliques (Otto & Wilde, 2001). En l'absence de molécules spécifiques adaptées à la problématique étudiée, une approche alternative consiste à comparer la distribution des séries de composés aliphatiques des cires épicuticulaires ; mais cette méthodologie est soumise à d'éventuels biais liés à des variations de longueurs de chaîne, dues à la maturité des feuilles ou aux changements environnementaux. Par ailleurs, contrairement, aux résultats obtenus pour les ginkgoacées, aucune molécule originale, spécifique aux hêtres actuel et fossile étudiés, n'a pu être identifiée, alors que la morphologie des feuilles fossiles atteste de leur appartenance au genre *Fagus*. On peut théoriquement envisager que d'éventuels marqueurs taxonomiques des Fagacées n'aient pas résisté aux altérations diagénétiques qui ont accompagné la fossilisation des feuilles étudiées. Cependant, il est plus vraisemblable qu'aucun marqueur spécifique aux fagacées n'existe dans les lipides foliaires de ces plantes. En effet, aucune des études chimiotaxonomiques publiées sur les lipides de cette famille n'a mis en évidence de molécule d'intérêt. Cette absence de marqueur taxonomique dans les lipides des fagacées souligne également la limitation de l'échantillonnage disponible chez les plantes apparentées aux ginkgoacées actuelles (et fossiles).

En effet, le seul représentant actuel de la famille des ginkgoacées, de l'ordre des ginkgoales, de la classe de ginkgopsides ou encore de la division des ginkgophytes, est le *G. biloba*. Dans la mesure où la diversité des ginkgophytes était bien supérieure au Mésozoïque qu'actuellement (Stewart and Rothwell, 1993), les diméthoxyalkylcoumarines identifiées peuvent ne correspondre qu'à des marqueurs (relictuels) de taxons supérieurs à la famille, à l'instar des diterpènes tricycliques des conifères ou des triterpènes pentacycliques des angiospermes.

Plus généralement, les études chimiotaxonomiques des végétaux fossiles peuvent conduire à identifier des biomarqueurs ou des empreintes moléculaires caractéristiques de plantes aujourd'hui disparues. De tels biomarqueurs peuvent ensuite être utilisés en géochimie sédimentaire pour évaluer la contribution de ces plantes à la MO sédimentaire, voire leur importance dans les végétations passées (Diefendorf et al., 2014).

I.2. Paléoécologie isotopique

I.2.a. Principe et précautions

La paléoécologie isotopique utilise les variations naturelles des rapports des isotopes stables d'un élément dans les êtres vivants, en réponse aux variations environnementales. Transposées aux fossiles, ces variations isotopiques peuvent aider à reconstituer les caractéristiques des environnements dans lesquels ils se développaient, et ainsi contribuer à documenter leur écologie. Mon travail s'est focalisé sur les isotopes stables du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) car leurs variations sont bien documentées chez les plantes actuelles. De plus, du fait de l'abondance du carbone dans les êtres vivants, son analyse isotopique dans de la MO ancienne est assez aisée (par spectrométrie de masse isotopique). Les rapports des isotopes stables du carbone s'expriment, en part pour mille (‰), par rapport à un étalon (Craig, 1953) : $\delta^{13}\text{C} = \left\{ \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{échantillon}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{étalon}}} \right] - 1 \right\} \times 1000$, l'étalon étant le standard international Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB). Le $\delta^{13}\text{C}$ des plantes actuelles dépend de 3 principaux facteurs : le type de photosynthèse utilisé par la plante (principalement C_3 ou C_4), les caractéristiques de leur environnement (disponibilité de l'eau et des nutriments, température, luminosité, etc.) et la composition du CO_2 atmosphérique ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, teneur en CO_2 atmosphérique ; Farquhar et al., 1982). En se plaçant dans un contexte où deux de ces paramètres sont établis, il est possible d'utiliser le $\delta^{13}\text{C}$ d'une plante fossile pour reconstituer le troisième. Bien que j'aie travaillé sur des projets s'intéressant aux trois grands facteurs influençant le $\delta^{13}\text{C}$ des plantes, les travaux détaillés ci-après portent sur l'utilisation du $\delta^{13}\text{C}$ de plantes anciennes pour reconstituer certains paramètres environnementaux, notamment la disponibilité de l'eau pour les plantes, qui est l'un des paramètres environnementaux qui influence le plus leur $\delta^{13}\text{C}$.

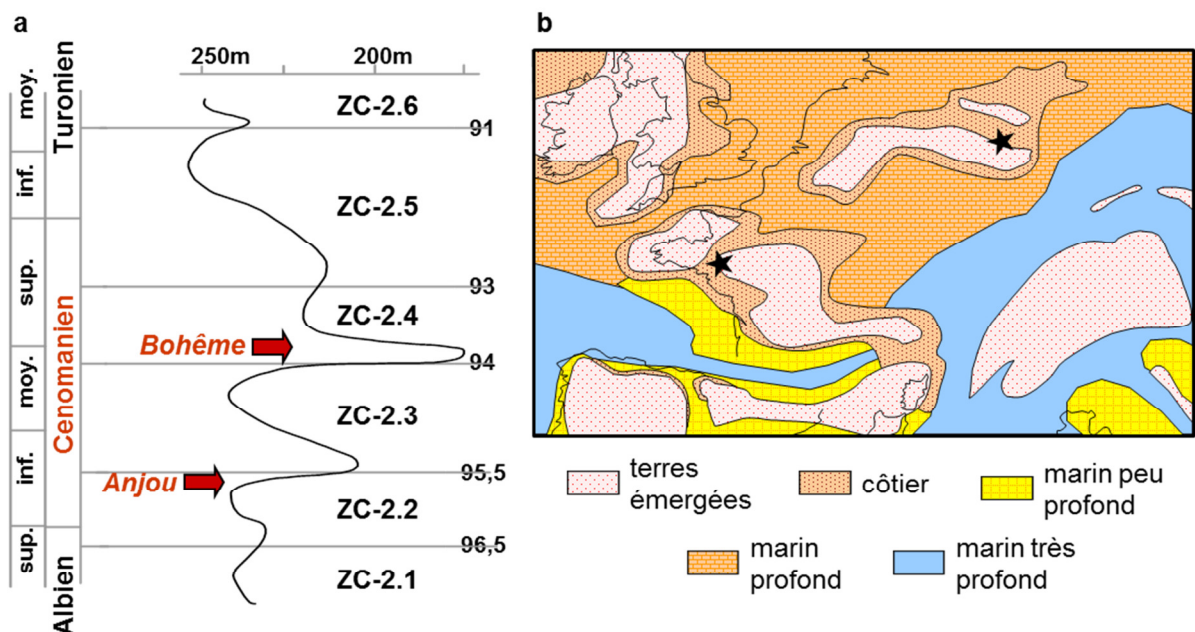
Avant toute utilisation des rapports isotopiques dans les fossiles, il convient de s'assurer qu'ils n'ont pas été significativement affectés par la diagenèse. La première étape consiste à tester la présence de carbone exogène, minéral ou organique, susceptible d'être adsorbé sur les fossiles et de biaiser les mesures. Ce carbone peut être éliminé par traitement acide et basique. La fossilisation peut conduire à une modification de la composition isotopique moyenne d'un fossile, si elle s'accompagne d'une perte préférentielle de constituants de composition isotopique différente de la moyenne. Une corrélation entre le $\delta^{13}\text{C}$ des fossiles et leur teneur en carbone, azote ou oxygène peut permettre de mettre en évidence une modification diagénétique du signal isotopique par perte préférentielle de constituants particuliers. Enfin, il convient de s'assurer que la composition

isotopique des fossiles est du même ordre de grandeur que celle de plantes actuelles équivalentes, et qu'elle varie selon les mêmes schémas. On peut par exemple vérifier :

- variabilité intra-organe \leq variabilité intra-spécifique \leq variabilité interspécifique,
- $\delta^{13}\text{C}_{\text{feuilles}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{tiges}} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{racines}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{troncs}}$,
- $\delta^{13}\text{C}_{\text{lipides}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{lignine}} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{protéines}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{carbohydrates}}$.

1.2.b. Paléoécologie de feuilles fossiles cénomaniennes

Cette étude visait à évaluer la pertinence d'une approche isotopique pour la reconstitution des environnements et de l'écologie de végétaux fossiles ; elle est basée sur les paléoflores cénomaniennes d'Anjou et de Bohême dont les principaux végétaux (*E. andegavense* et *F. alata*) ont fait l'objet des caractérisations chimiques décrites dans la partie chimiotaxonomie. Ces flores ont non seulement été choisies pour la grande qualité de la préservation morphologique et chimique des fossiles, mais également pour la disponibilité de nombreuses informations paléoenvironnementales fournies par des études indépendantes, principalement sédimentologiques et palynologiques (Pons et al., 1980; Ulicny et al., 1997). Si la photosynthèse en C_4 était (peut-être) déjà apparue en quelques endroits du globe, c'est la photosynthèse en C_3 qui domine largement au Cénomanien en Europe (Osborne & Beerling, 2006). En conséquence, le facteur photosynthèse, qui joue un rôle majeur sur le $\delta^{13}\text{C}$ des plantes actuelles, n'est pas susceptible d'avoir varié pour les plantes fossiles étudiées. De plus, en Bohême, les flores étudiées sont issues de plusieurs gisements contemporains localisés dans une aire géographique limitée (75 km entre les deux gisements les plus éloignés) de sorte que des variations locales/régionales de composition atmosphérique ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, teneur en CO_2 atmosphérique) ne sont pas susceptibles d'avoir influencé le $\delta^{13}\text{C}$ des fossiles. En effet, ces variations se produisent généralement sur le long terme, ou le long de gradients géographiques très importants. Les principaux paramètres susceptibles d'avoir influencé le $\delta^{13}\text{C}$ des végétaux fossiles étudiés relèvent donc des caractéristiques (locales) de l'environnement. Enfin, les études paléoenvironnementales existantes montrent que les différents gisements à végétaux du Cénomanien de Bohême, correspondent à des environnements assez diversifiés (Cech et al., 1980; Pacltova, 1990; Ulicny et al., 1997). Ainsi, la caractérisation isotopique de ces paléoflores permet de tester le potentiel de l'approche isotopique pour reconstituer paléoenvironnements et paléoécologie végétale.



Les paléoflores étudiées sont issues de formations argileuses continentales ou péricontinentales du Cénomaniens basal des régions étudiées. Les paléoflores d'Anjou et de Bohême sont diachrones ; elles sont datées respectivement du Cénomaniens inférieur (± 96 Ma) et moyen (± 94 Ma), mais correspondent toutes les deux aux formations qui marquent le début de la transgression cénomaniens dans les régions considérées (Fig. 10). Ces paléoflores présentent de nombreux éléments communs : elles sont dominées par des fossiles des genres *Eretmophyllum* et *Frenelopsis*, mais incluent également diverses conifères, des cycas, des fougères et plusieurs angiospermes (Fig. 11). Des tests préliminaires (immersion dans la soude et l'acide chlorhydrique) ont montré que les feuilles fossiles étudiées n'avaient pas adsorbé des quantités significatives de carbone organique ou inorganique exogène qui aurait pu biaiser leur composition isotopique (Nguyen Tu et al., 1999, 2002). De plus, les feuilles présentent des $\delta^{13}\text{C}$ (1) systématiquement différents de leur sédiment encaissant, (2) qui varient au sein d'un même gisement et d'un gisement à l'autre, et (3) distribués, pour les différentes composantes d'un même individu, de la même façon que chez les plantes actuelles (e.g. $\delta^{13}\text{C}_{\text{lipides}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{cuticule}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{limbe}} \leq \delta^{13}\text{C}_{\text{pétiole}}$). Ces critères montrent que les rapports des isotopes stables des fossiles étudiés n'ont pas été substantiellement affectés par la diagenèse et la fossilisation ; ces rapports peuvent donc être interprétés en termes de paléoenvironnement/paléoécologie. Les résultats présentés ci-après sont focalisés sur les flores de Bohême, plus nombreuses et diversifiées que leur homologue angevine, qui fera toutefois l'objet d'une étude paléoécologique spécifique à la fin de cette partie.

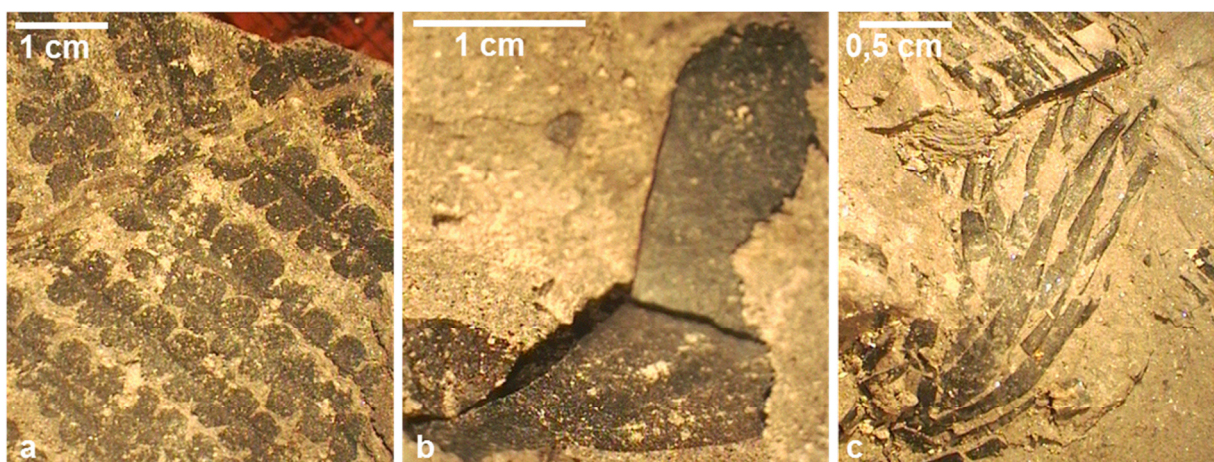


Figure 11. Quelques fossiles représentatifs des paléoflores de Bohême.
a. *Gleichenia zippei*, b. *Grevilleophyllum constans*, c. *Cunninghamites lignitum*.

Quatre gisements différents ont été sélectionnés pour des caractérisations isotopiques dans les formations du Cénomaniens de Bohême, de l'ouest à l'est : Pecinov, Hloubetin, Hrousaný et Brník. Les feuilles fossiles de ces gisements montrent des $\delta^{13}\text{C}$ compris entre $-28,1\text{‰}$ et $-22,4\text{‰}$, pour des valeurs moyennes de l'ordre de $-24,7\text{‰}$ (Nguyen Tu et al. 2002). Ces valeurs rentrent dans la gamme de variation de celles rapportées pour les plantes en C_3 fossiles (Rigby et al., 1981 ; Bocherens et al., 1993 ; Gröcke, 1998 ; Nguyen Tu et al., 2004a ; Barral et al., 2015). Les plantes en C_3 actuelles présentent des compositions isotopiques variant entre -35‰ et -20‰ , centrées autour de -28‰ (O'Leary, 1981). Il semble hasardeux de faire des comparaisons directes entre les compositions isotopiques absolues des plantes actuelles et fossiles pour les raisons suivantes :

- les plantes fossiles apparaissent systématiquement enrichies en ^{13}C par rapport aux plantes actuelles ;
- la signature isotopique des plantes actuelles est dépendante de celle du CO_2 atmosphérique qui s'appauvrit continuellement en ^{13}C du fait de la combustion des énergies fossiles, et la reconstitution de la composition isotopique des atmosphères passées conduit à des incertitudes importantes ;

- même si tous les critères sont rassemblés pour montrer que la composition isotopique des fossiles a conservé un signal paléoécologique, on peut difficilement considérer qu'aucune modification diagénétique n'ait affecté leur composition isotopique (on peut notamment envisager qu'une faible modification diagénétique ait affecté leur signal isotopique tout en conservant des écarts caractéristiques de leur écologie) ;

- si l'on peut raisonnablement supposer que par le passé les réponses isotopiques des plantes aux changements environnementaux variaient dans les mêmes directions qu'aujourd'hui, il est plus incertain de se prononcer sur l'amplitude de ces variations, notamment pour des plantes très anciennes dont il n'existe aucun équivalent actuel.

Par conséquent, il paraît plus raisonnable, pour faire des reconstitutions paléoécologiques basées sur les rapports isotopiques, de se limiter à des comparaisons d'échantillons équivalents, d'âges proches, issus de localités voisines. Pour se faire, il convient de disposer d'un point de référence local de plantes qui se sont développées dans un environnement optimal. Parmi les paléoflores cénomaniennes de Bohême, celle du gisement de Brnik montre deux critères suggérant un environnement non-stressé :

- les caractéristiques sédimentologiques de l'encaissant sont typiques d'une plaine d'inondation avec paléosols, marécages et chenaux méandrisants, sans aucune trace d'influence marine (Ulicny & Spicakova, 1996) ;

- l'assemblage floristique comporte une part importante de végétaux inféodés à des milieux assez humides, comme les fougères, et inclut même une angiosperme à l'écologie proche des nénuphars (Kvacek, 1998).

Il semble donc que les végétaux de Brnik se sont développés dans un environnement optimal, notamment sans stress hydrique, et leur composition isotopique ($-25,6 \pm 0,7\%$) a été utilisée comme référence de plantes non stressées. La composition isotopique des végétaux issus des autres gisements a ainsi été comparée à celle des végétaux de Brnik à des fins paléoécologiques (Nguyen Tu et al., 2002).

La flore retrouvée dans l'unité 2 du gisement de Pecinov comporte plusieurs angiospermes dicotylédones (dont certaines proches du laurier, du platane), une monocotylédone et une bennettitale. Les fossiles se sont vraisemblablement développés près de leur milieu de dépôt : la plaine d'inondation d'une large rivière en tresse (Ulicny et al., 1997). Le $\delta^{13}\text{C}$ des végétaux fossiles de Pecinov (unité 2) varie entre $-28,1\%$ et $-25,6\%$ pour une valeur moyenne de $-26,7\%$. Ces plantes sont appauvries en ^{13}C d'environ $1,1\%$ par rapport à celle de Brnik et cette différence est apparue statistiquement significative (test de Mann-Whitney). L'environnement le plus fréquent pouvant conduire à une diminution du $\delta^{13}\text{C}$ des végétaux est une canopée, sous laquelle la luminosité est réduite et la part de CO_2 appauvri en ^{13}C issu de la respiration du sol est importante (Medina & Minchin, 1980 ; Hanba et al., 1997). Ces caractéristiques

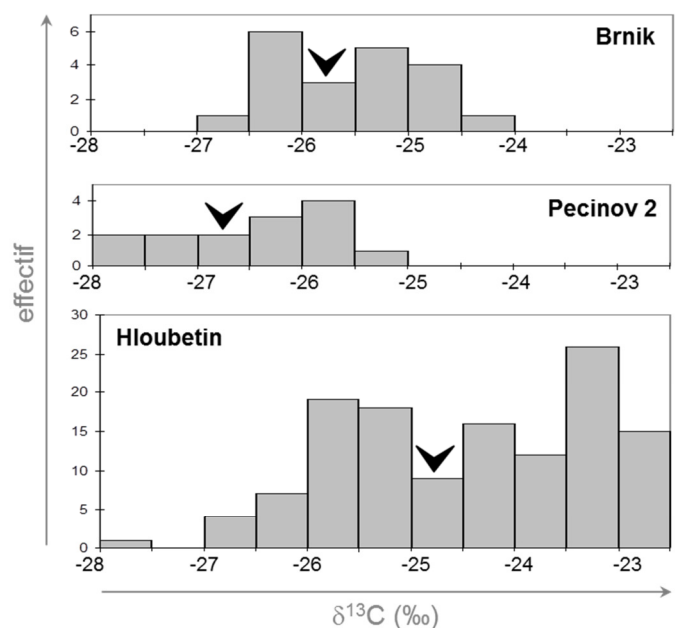


Figure 12. Distribution des compositions isotopiques des plantes des 3 gisements étudiés en Bohême. Les flèches indiquent la valeur moyenne du gisement.

environnementales locales conduisent à un appauvrissement en ^{13}C des végétaux se développant près du sol, sous une canopée (Buchmann et al., 1997; Martinelli et al., 1998). L'appauvrissement en ^{13}C des plantes fossiles du gisement de Pecinov (unité 2) pourrait donc témoigner de l'existence d'une canopée (Nguyen Tu et al., 2002), d'autant plus que les plantes herbacées ou arbustives (e.g. laurier) présentent des $\delta^{13}\text{C}$ inférieurs aux plantes arborescentes (e.g. platane).

Les paléoflores issues des gisements de Hlobetin et Horausany sont comparables : elles sont constituées de plusieurs conifères dont *Frenelopsis*, la ginkgoacée *Eretmophyllum*, une cycadophyte, une plante pouvant s'apparenter aux gnétales et une angiosperme. Les fossiles, qui se sont déposés dans des milieux sub-tidaux à supra-tidaux, se sont vraisemblablement développés dans des environnements de type marais salant/pré salé (Hlustik, 1986; Spicakova, 1999). La composition isotopique des plantes de ces gisements est comprise entre $-27,6\text{‰}$ et $-22,4\text{‰}$, pour une valeur moyenne de $-24,5\text{‰}$. Ces plantes sont significativement enrichies en ^{13}C par rapport au gisement de référence de Brnik (test de Mann-Whitney). Le principal paramètre environnemental pouvant conduire à une augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ des végétaux est le stress hydrique (Ehleringer & Cooper, 1988; Farquhar & Richards, 1984). Dans la mesure où ces végétaux poussaient dans des environnements influencés par la mer, le stress hydrique subi était probablement d'origine saline (Nguyen Tu et al., 2002).

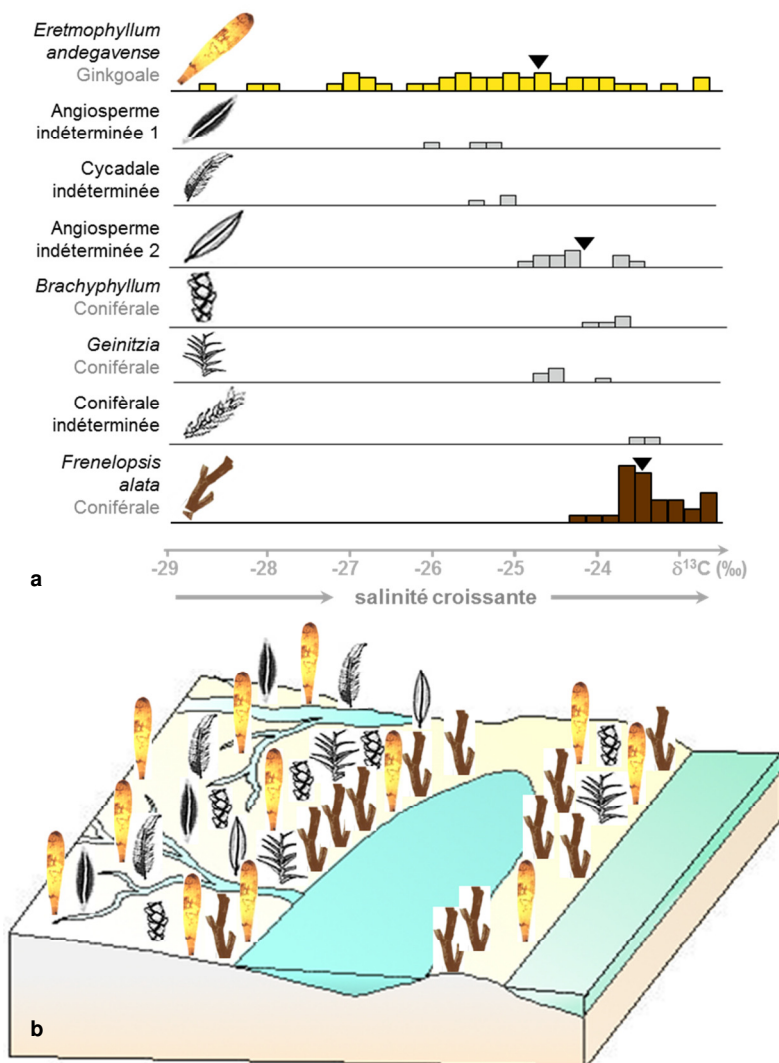


Figure 13. Distribution par espèce du $\delta^{13}\text{C}$ des fossiles d'Anjou (a) et reconstitution paléoécologique proposée (b).

Le gisement fossilifère étudié en Anjou, présente des caractéristiques sédimentologiques et paléobotaniques similaires à celles des gisements tchèques de Hlobetin et Horausany. Un échantillonnage exhaustif des végétaux composant la paléoflore d'Anjou a permis de détailler la paléoécologie de ce type de flore assez répandue en Europe durant le Cénomanién basal. Les végétaux fossiles d'Anjou présentent des $\delta^{13}\text{C}$ compris entre $-28,8\text{‰}$ et $-22,6\text{‰}$ pour une valeur moyenne de l'ordre de celle trouvée à Hlobetin et Horausany ($-24,4\text{‰}$; Nguyen Tu et al., 1999). La plupart des espèces étudiées montre une composition isotopique moyenne distincte des autres espèces, ce qui a conduit à proposer une répartition écologique des plantes selon un gradient de salinité croissant de la plaine d'inondation vers les zones littorales et lagunaires, en fonction de leur $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 13). Ainsi, *Frenelopsis*, à la composition isotopique riche en ^{13}C , se développait dans les zones les plus salées du paysage alors

qu'*Eretmophyllum*, à la composition isotopique très variable, pouvait s'installer dans des zones de salinité contrastée.

Cette étude isotopique des paléoflores cénomaniennes d'Anjou et de Bohême a donc montré qu'à condition de (1) s'assurer que le signal isotopique n'avait pas été significativement affecté par la diagenèse et (2) disposer de référence de composition isotopique adaptée à l'étude, le $\delta^{13}\text{C}$ des plantes fossiles pouvait aider à reconstituer les environnements dans lesquels elles se sont développées, voire leur paléoécologie.

1.2.c. Dendroclimatologie sur charbon de bois néolithiques

L'analyse isotopique des charbons de bois peut également aider à reconstituer les paléoenvironnements. En effet, les charbons présentent un potentiel de préservation supérieur aux organes non carbonisés dans la mesure où la carbonisation leur confère une structure chimique résistante à la dégradation (Figueiral, 1999 ; Bird & Ascough, 2012). De fait, les charbons de bois sont plus fréquents dans le registre sédimentaire que le bois. De plus, certaines études ont suggéré que la carbonisation ne conduisait pas à des modifications significatives du signal isotopique (Czimczik et al., 2002; Krull et al., 2003 ; Ascough et al., 2008). Par ailleurs, la caractérisation isotopique à l'échelle du cerne a fait ses preuves sur les bois actuels (ou récents) pour reconstituer des variations fines du climat (dendroclimatologie isotopique; Leavitt & Long, 1991; Treydte et al., 2001; Young et al., 2012). L'objectif de ce projet (collaboration A. Dufraisse, AASPE, MNHN ; thèse F. Baton) était donc d'évaluer la pertinence d'une approche isotopique cerne à cerne sur charbon de bois, pour reconstituer paléoenvironnements et paléoclimats.

La première étape du projet a été de développer une technique de prélèvement cerne à cerne pour les charbons de bois. Adapté des méthodes utilisées en archéozoologie, le prélèvement à la microforeuse sous loupe binoculaire, s'est avéré optimal. Il permet en effet (1) la récupération d'une poudre directement analysable en spectrométrie de masse isotopique et (2) le prélèvement de sous-échantillons de cernes en distinguant le bois de printemps du bois d'été (Fig. 14). La pertinence de l'approche a ensuite été testée en combinant caractérisation morphométrique/dendrologique et analyse isotopique sur des charbons anciens issus d'environnements variés documentés par des méthodes indépendantes.

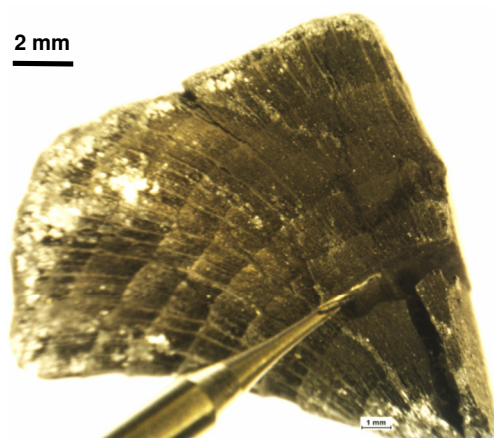


Fig. 14. Prélèvement de cernes de croissance à la microforeuse sur un fragment de charbon du Néolithique de Chalain.

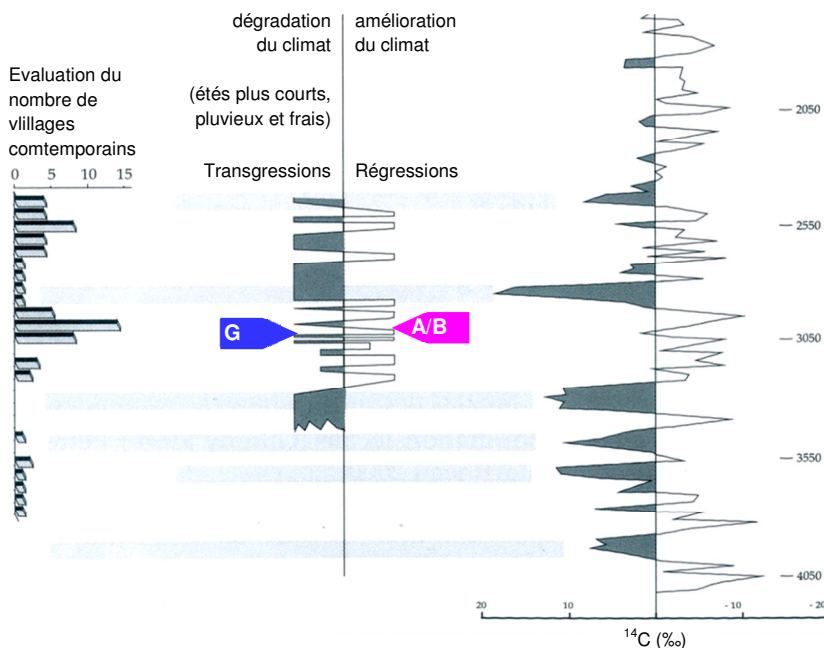
Les charbons étudiés sont issus des sites néolithiques du bord du lac de Chalain (Jura) datés de 5300 à 600 BP. Des études archéologiques, malacologiques, palynologiques, sédimentologiques et géochimiques (^{14}C) ont montré que plusieurs phases d'occupation des sites se sont succédées, au gré d'alternances de périodes d'amélioration et de péjoration climatiques (Fig. 15 ; Damon et al., 1989; Magny, 1993; Mouthon, 1997; Richard, 1997 ; Pétrequin, 2012). Cette étude exploratoire s'est focalisée sur des charbons de la station 4 du lac, correspondant à deux périodes climatiques différentes :

- une période de péjoration climatique (diminution de la température, augmentation des précipitations) : le niveau G (3040 BP)

- une période d'amélioration climatique (augmentation de la température, diminution des précipitations): le niveau A/B (3000 BP)

Les échantillons ont été sélectionnés de façon à limiter les sources de variabilité du signal isotopique qui ne seraient pas environnementales/climatiques :

- Une seule essence de bois a été étudiée afin de limiter les variations isotopiques dues à des différences interspécifiques. Le chêne caducifolié (*Quercus* sp.) a été choisi pour son abondance dans les forêts tempérées actuelles et dans les spectres anthracologiques, ainsi que pour son anatomie présentant des cernes de croissance clairement identifiables, et sa capacité à enregistrer



les variations climatiques en climat tempéré (Michelot, 2011; Young et al., 2012).

- Les charbons issus d'un seul type de feu ont été échantillonnés pour cette étude afin de limiter d'éventuelles variations isotopiques liées à des différences de conditions de combustion (température, oxygénation, etc.). Les charbons de bois issus de foyers domestiques ont ainsi été privilégiés car les foyers domestiques sont abondants et aisément reconnaissables dans les niveaux archéologiques.

Figure 15. Données climatiques sur la période d'occupation du lac de Chalain. d'après Pétrequin et al. (2002).

Des tests préliminaires (immersion dans la soude et l'acide chlorhydrique) ont montré que les charbons étudiés n'avaient pas adsorbé des quantités significatives de carbone organique ou inorganique exogène qui aurait pu biaiser leur composition isotopique (Baton et al. accepté). Les charbons ont également été étudiés par microspectrométrie Raman afin d'estimer leur température de carbonisation. Le rapport des hauteurs des bandes "graphite" et "défaut" des spectres Raman (H_D/H_G) et le paléothermomètre de Deldicque et al. (Deldicque et al., 2016) suggèrent des températures de combustion proches de 700 °C et semblables pour les charbons des deux niveaux étudiés de Chalain 4 (collaboration F. Delarue, IMPMC, MNHN). De telles températures sont supérieures à celles généralement présumées pour les charbons issus de foyers domestiques (<450 °C, Whelan 1995). Quoi qu'il en soit, les charbons des deux niveaux étudiés sont issus de températures de carbonisation similaires et leur composition isotopique n'est donc pas susceptible d'avoir été affectée par des différences de carbonisation.

Le $\delta^{13}C$ mesuré sur les cernes des charbons étudiés sont centrés autour de -25,9‰ pour le niveau A/B et -26,5‰ pour le niveau G (Baton et al. accepté). Une nouvelle méthode de caractérisation microscopique des charbons (Dufraisse et al. accepté) a permis de distinguer les charbons de duramen (bois de cœur, aux vaisseaux bouchés, n'assurant plus la conduction de sève), des charbons issus d'aubier (bois périphérique, assurant la conduction de sève). Les charbons de duramen sont apparus systématiquement appauvris en ^{13}C par rapport aux charbons d'aubier (Fig. 16), en accord avec (1) l'appauvrissement en ^{13}C de la lignine par rapport aux tissus totaux (Benner et al., 1987) et (2) l'augmentation de la teneur en lignine du bois au cours de la duraminisation (Hillis, 1987). Les charbons du niveau A/B sont significativement enrichis en ^{13}C par

rapport à ceux de la couche G (ANOVA), et ce, quel que soit l'échantillon testé : tous échantillons confondus, exclusivement le bois de printemps, le bois d'été, le duramen ou l'aubier (Fig. 16). Cet enrichissement en ^{13}C est en accord avec les paléoclimats reconstitués précédemment dans la mesure où (1) le climat du niveau A/B a été démontré comme ayant été légèrement plus sec et plus chaud que celui du niveau G (Magny, 1993) et (2) augmentation de la température et diminution des précipitations conduisent à des augmentations du $\delta^{13}\text{C}$ des plantes (Farquhar et al., 1982 ; Dawson et al., 2002) et notamment du $\delta^{13}\text{C}$ des cernes de bois de chêne (Michelot, 2011). La teneur en ^{13}C mesurée dans les cernes de charbon de bois semble donc pouvoir enregistrer des variations paléoenvironnementales/ paléoclimatiques fines sous climat tempéré. En effet, les quelques études isotopiques publiées jusqu'à présent portaient sur des climats beaucoup plus contrastés (méditerranéens voire désertiques ; Hall et al., 2008 ; Aguilera et al., 2009 ; Masi et al., 2013 ; Vaiglova et al., 2014). De plus, l'enrichissement systématique de l'aubier en ^{13}C par rapport au duramen, souligne la nécessité de bien distinguer ces types de bois pour des reconstitutions paléoenvironnementales fiables.

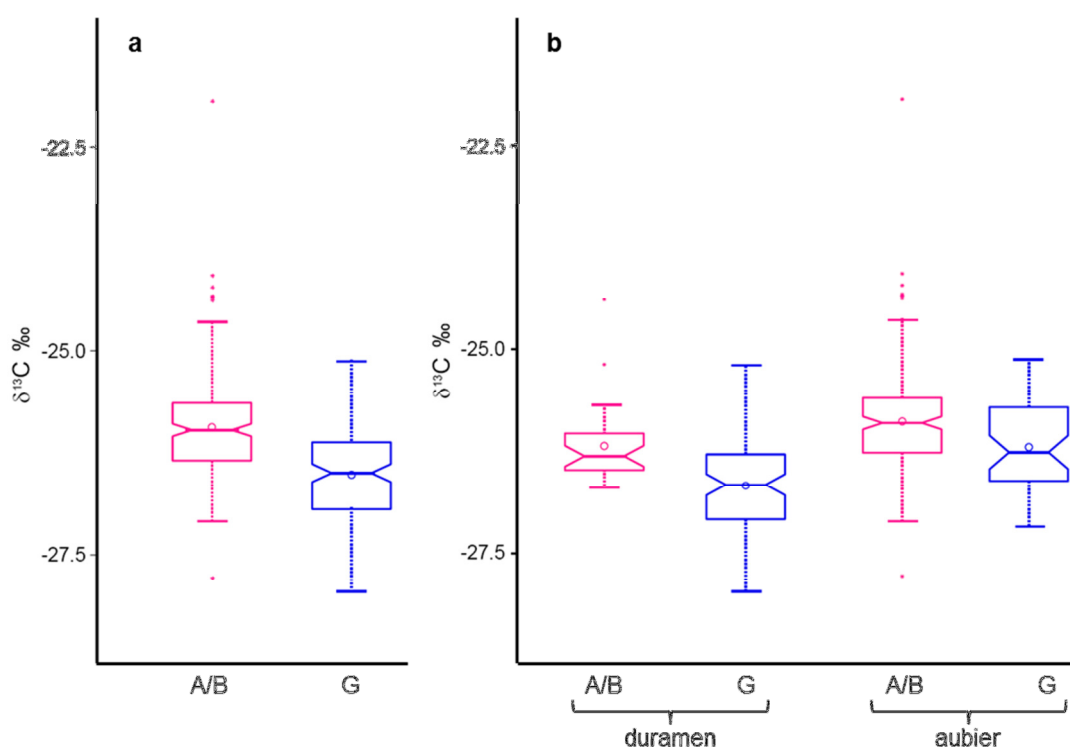


Figure 16. $\delta^{13}\text{C}$ des charbons des niveaux A/B et G (bois de printemps et bois d'été confondus). **a.** duramen et aubier confondus, **b.** duramen et aubier séparés. Les boîtes représentent moyenne, médiane, minimum, maximum, premier et dernier quartile. Les encoches marquent l'intervalle de confiance à 95% de la médiane.

L'échantillonnage des charbons à l'échelle du cerne a également permis de tester le potentiel des isotopes stables du carbone pour restituer les tendances climatiques à court terme. Toutefois, aucune tendance particulière n'est apparue en suivant la composition isotopique des différents cernes composant chacun des charbons (Baton et al. accepté), et ce, même en séparant les niveaux archéologiques ou les types de bois. Bien que les plus gros charbons disponibles (comprenant de 5 à 19 cernes) aient été sélectionnés pour cette étude, l'approche cerne à cerne sur charbon n'est pas pertinente dans ce contexte pour documenter les tendances climatiques à court terme. En dendroclimatologie isotopique sur bois actuel, c'est l'analyse du bois d'été qui est privilégiée à celle du bois de printemps, afin de limiter l'influence de carbone issu des réserves accumulées l'année précédente, sur le signal isotopique (Borella et al., 1998). Toutefois, la comparaison du $\delta^{13}\text{C}$ du bois de printemps et du bois d'été est susceptible de documenter les contrastes saisonniers (Livingston & Spittlehouse, 1996 ; Helle & Schleser, 2004 ; Li et al., 2007). La

différence de composition isotopique entre le bois de printemps et le bois d'été a été calculée ainsi :

$$\Delta_{\text{saisonnalité}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{printemps}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{été}}$$

Le $\Delta_{\text{saisonnalité}}$ calculé pour les charbons de Chalain 4 est centré autour de -0,01‰ pour le niveau A/B et de +0,20‰ pour le niveau G (Fig. 17, Baton et al. accepté). Au sein d'un même niveau archéologique, le $\Delta_{\text{saisonnalité}}$ n'est pas statistiquement différent entre l'aubier et le duramen, montrant que la duraminisation n'influence pas cet indice (influence de façon équivalente le bois de printemps et le bois d'été). La différence de $\Delta_{\text{saisonnalité}}$ entre le niveau A/B et le niveau G est statistiquement significative et suggère des saisons plus contrastées pour le niveau G que pour le niveau A/B. En effet, le $\Delta_{\text{saisonnalité}}$ est vraisemblablement contrôlé par (1) le niveau de remobilisation printanière du carbone accumulé l'année précédente qui est enrichi en ^{13}C , et (2) les différences de précipitations cumulées entre le printemps et l'été, ces deux paramètres étant gouvernés par la disponibilité de l'eau (Livingston & Spittlehouse, 1996 ; Helle & Schleser, 2004; Li et al., 2007). Il semblerait donc que le climat plus froid et plus pluvieux du niveau G ait également été caractérisé par des contrastes saisonniers plus importants, du moins en termes de précipitations.

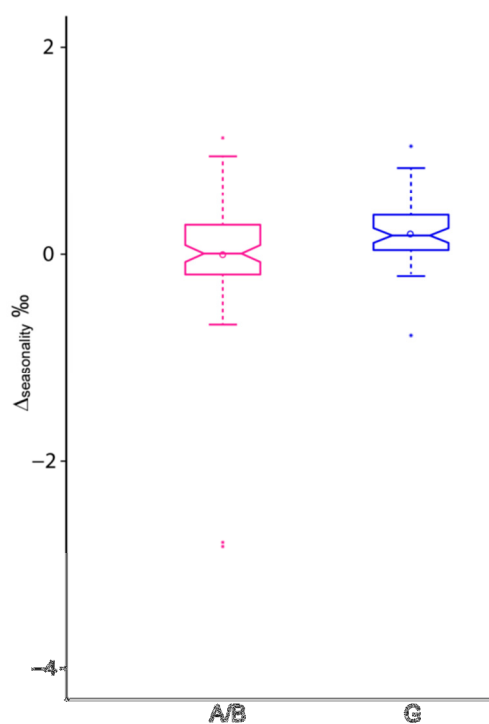


Figure 17. $\Delta^{13}\text{C}$ des charbons des niveaux A/B et G (tout échantillons confondus).

Cette étude exploratoire distinguant bois de printemps et bois d'été suggère donc que les rapports des isotopes stables des charbons de bois archéologiques peuvent enregistrer des variations fines des paléoclimats, voire aider à reconstituer les contrastes saisonniers. Pour les charbons de bois, comme pour les feuilles non carbonisées, il convient au préalable de s'assurer que le signal isotopique n'a pas été substantiellement affecté par la diagenèse ; il est également nécessaire de contrôler le type de bois étudié (duramen/aubier) et d'évaluer la température de carbonisation (microspectrométrie Raman).

1.2.d. Méthode, intérêts et limites de la géochimie isotopique sur macrorestes végétaux

Les études détaillées précédemment ont été menées dans des contextes paléoenvironnementaux bien contraints par d'autres méthodes (e.g. paléobotanique, sédimentologie) afin de tester la pertinence de l'approche isotopique sur macrorestes végétaux pour reconstituer paléoécologie, paléoenvironnements et paléoclimats. Ces études soulignent l'intérêt de l'approche pluridisciplinaire pour faire des reconstitutions les plus complètes et les plus fiables possibles. Par ailleurs, contrairement aux reconstitutions de la paléoécologie d'une espèce donnée, la généralisation des données isotopiques pour des reconstitutions paléoclimatiques ou paléoenvironnementales à grande échelle, nécessite de s'assurer de la représentativité des échantillons. Là encore, une approche pluridisciplinaire peut aider à tester cette représentativité, comme dans le cas de l'étude des charbons de bois du lac de Chalain où l'anthracologie a permis de (1) sélectionner des charbons issus d'une seule essence et d'un seul type de feu et (2) dater les périodes durant lesquelles les bois étudiés se sont développés. Il restera encore à évaluer la représentativité des charbons exploitables en dendroclimatologie isotopique pour les reconstitutions

paléoclimatiques. Une telle évaluation devra passer par des études statistiques de la composition isotopique de charbons issus de foyers expérimentaux.

La caractérisation isotopique des plantes fossiles peut également permettre de mieux appréhender les adaptations des plantes sur le long terme. L'analyse du $\delta^{13}\text{C}$ de feuilles de chêne du Miocène supérieur (± 8 Ma) du bassin du Rhin n'a montré aucune différence de composition isotopique entre les feuilles issues de deux niveaux (séparés de 2 Ma) correspondant à des teneurs en CO_2 atmosphérique différant de 80 ppm (Nguyen Tu et al., 2004a). Alors que de nombreuses expériences montrent que la composition isotopique des plantes actuelles répond à des variations rapides de teneur en CO_2 atmosphérique (Körner et al., 1988; Peñuelas & Estiarte, 1997), cette étude sur le fossile est en accord avec une adaptation, sur le long terme, de la physiologie et de l'anatomie des plantes aux variations atmosphériques. Une telle adaptation passe notamment par une modification de leur densité stomatique.

D'autres isotopes stables peuvent potentiellement apporter des informations paléobiologiques pertinentes : ceux de l'azote, de l'oxygène et de l'hydrogène. Le $\delta^{15}\text{N}$, le $\delta^{18}\text{O}$ et le δD des plantes sont en effet dépendants de nombreux paramètres environnementaux, principalement la température et les précipitations (Dawson et al., 2002). L'analyse du $\delta^{15}\text{N}$ de MO sédimentaires a démontré son intérêt pour reconstituer les paléoenvironnements continentaux (Storme et al., 2012 ; Tramoy et al., 2016). Le $\delta^{18}\text{O}$ et le δD des cernes de bois actuels ou historiques constituent des outils reconnus pour reconstituer les variations climatiques récentes (Feng et al., 1999 ; Danis et al., 2006 ; Young et al., 2012). Pourtant, ces isotopes n'ont pas encore été appliqués à l'étude des plantes anciennes. Les améliorations récentes de la sensibilité des spectromètres de masse permettent désormais la mesure des rapports isotopiques de l'azote et de l'oxygène sur de très faibles quantités de MO ; ces isotopes stables sont donc inscrits dans les perspectives de mes travaux de recherche notamment en dendroclimatologie isotopique sur charbons. Quels que soient les éléments étudiés, l'utilisation de leurs rapports isotopiques à des fins paléoenvironnementales demeure dépendante des connaissances disponibles concernant la variabilité des rapports isotopiques des plantes actuelles en réponse aux variations de l'environnement. Dans la mesure où les données sur les plantes actuelles ne sont pas toujours adaptées aux problématiques paléoenvironnementales, il peut être nécessaire de mettre au point de nouveaux référentiels actuels. Ainsi, un référentiel de $\Delta_{\text{saisonnalité}}$ chez des arbres actuels est indispensable pour valider cette approche sur charbons de bois anciens.

II. Effets de la dégradation sur la signature biogéochimique des végétaux

L'étude biogéochimique des végétaux fossiles soulève des questions sur les modifications subies par la MO au cours de la diagenèse et de la fossilisation, ou plus généralement entre la mort de la plante et son isolement du sédiment encaissant. Le suivi réel de ces processus est compliqué par leur durée, par le fait qu'ils se déroulent, pour la plupart, au sein des sédiments, ainsi que par la multiplicité des sources de la MO sédimentaire et des paramètres pouvant influencer la diagenèse.

La comparaison de débris végétaux à divers stades de dégradation/préservation permet d'appréhender les grandes tendances de l'évolution de leur signature biogéochimique au cours de la diagenèse. Ainsi, la comparaison de feuilles fraîches et de litière, ou de MO de sédiments récents prélevés à différentes profondeurs, peut montrer un appauvrissement progressif en ^{13}C qui est parfois attribué à une dégradation préférentielle de la cellulose, elle-même enrichie en ^{13}C par rapport à la MO végétale totale (Benner et al., 1987 ; Spiker & Hatcher, 1987). Une telle approche est toutefois limitée par la multiplicité de sources de la MO sédimentaire, dont des variations de proportions relatives pourraient être interprétées à tort comme des effets de la diagenèse (Meyers & Ishiwatari, 1993). Même en travaillant sur des macrorestes végétaux bien identifiés, comme les fossiles, le problème de contributions de MO externe aux fossiles demeure, notamment concernant la composition moléculaire de la MO (cf. champignons épiphytes de *Frenelopsis alata*).

L'expérimentation en milieu contrôlé, dans des conditions artificielles accélérant les processus de diagenèse et de fossilisation, ou dans des conditions naturelles très propices à la dégradation des végétaux, constituent des alternatives intéressantes. Plusieurs études se sont attachées à suivre la signature biogéochimique de débris végétaux au cours de simulation dans des dispositifs fermés voire scellés permettant d'augmenter température et/ou pression (Finch & Freeman, 2001 ; Gupta et al., 2007). Si ce type d'expérimentation rend compte des modifications physico-chimiques subies par la MO végétale au cours de la diagenèse tardive, la catagenèse voire la métagenèse, il ne permet pas d'appréhender les modifications d'origine biologique subies par la MO, principalement au cours des premiers stades de dégradation qui suivent la mort des végétaux, et de la diagenèse précoce. Pourtant, les études moléculaires de la MO fossile décrites au chapitre précédent ont bien montré l'importance de micro-organismes tels que bactéries et champignons sur la signature biogéochimique des fossiles. Je me suis donc attelée à la mise au point d'expériences permettant une dégradation aussi rapide que possible de la MO tout en restant dans des conditions pouvant conduire à la fossilisation de végétaux, et offrant un contrôle aussi complet que possible des facteurs pouvant influencer la signature biogéochimique de la MO. Les trois expériences rapportées ci-après rendent compte de la diversité des approches utilisées : laboratoire vs terrain, bois vs feuilles, sol vs interface eau-sédiment.

II. 1. Effets de la dégradation sur la signature isotopique du bois : incubation en microcosme aquatique

Cette expérience a été menée dans le cadre d'un projet visant à tester l'utilisation du $\delta^{15}\text{N}$ de MO continentale comme proxy paléoenvironnemental et paléoclimatique dans les sédiments anciens (collaboration J. Schnyder, ITeP, & M. Sebilo, iEES ; thèse R. Tramoy). Elle visait à suivre le $\delta^{13}\text{C}$ et le $\delta^{15}\text{N}$ du bois au cours des premiers stades de la dégradation en milieu immergé, milieu par lequel transite la plupart des débris végétaux amenés à être préservés dans les sédiments voire à se fossiliser.

II.1.a. Principe et design expérimental

Cette expérience focalisée sur les facteurs biotiques influençant la signature isotopique du bois, a été menée en laboratoire dans des microcosmes aux conditions contrôlées limitant les variations des facteurs abiotiques pouvant jouer sur la dégradation de la MO. Des échantillons de bois ont simplement été immergés dans des erlenmeyers remplis d'eau (Fig. 18),

- placés dans le noir afin d'éviter le développement d'organismes photosynthétiques ne jouant aucun rôle sur la dégradation de la MO et pouvant apporter une contribution externe à la MO initiale ;
- agités en continu afin de maintenir l'oxygénation du milieu et accélérer la dégradation ;
- maintenus à température constante (22°C) et fermés par de l'aluminium perforé afin de permettre les échanges gazeux entre l'atmosphère et l'eau tout en évitant les contaminations externes, comme la poussière.

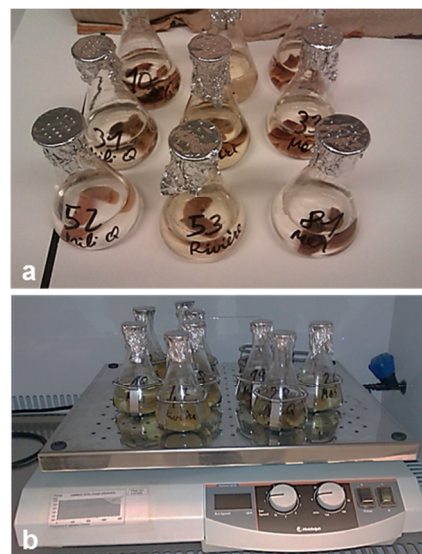


Figure 18. Dispositif expérimental.
a. Erlenmeyers contenant les rondelles de bois. b. Table agitante.

Cette expérience de dégradation a été menée sur du bois de *Sciadopitys verticillata*, une taxodiacée (conifère) endémique du Japon, choisie pour pouvoir mener ultérieurement une étude chimiotaxonomique avec un bois fossile jurassique présentant des affinités avec *S. verticillata* (*Xenoxylon fuxinense*). Le bois, issu d'une branche tombée, récoltée après être restée six mois sur le sol, a été mis à dégrader sous deux formes :

- des rondelles de 2 mm d'épaisseur, représentatives des macrorestes végétaux susceptibles de se fossiliser (Tramoy et al., 2017), et
- des poudres du même bois, représentatives de la MO sédimentaire dispersée, qui devaient permettre en outre une dégradation accélérée par rapport aux rondelles.

Deux types d'eau ont été utilisés pour l'expérience : de l'eau distillée comme témoin et de l'eau de rivière (La Marette, Essonne). Cette dernière a été filtrée à 22 µm pour éliminer les particules tout en conservant sa composante microbienne.

L'expérience a duré 73 semaines. De l'eau distillée ou de rivière a été rajoutée dans les erlenmeyers au bout de 8, 32 et 52 semaines afin de compenser les pertes liées à l'évaporation. Des échantillons ont été prélevés à 8 pas de temps (0, 2, 4, 8, 16, 32, 52 et 73 semaines) pour être analysés par EA-IRMS afin d'en déterminer la teneur et la composition isotopique en carbone et en azote. Les caractéristiques du bois non dégradé sont résumées dans le tableau 1. Alors que les rondelles ont été rincées à l'eau distillée pour éliminer les micro-organismes superficiels avant analyse, les poudres ont été analysées telles quelles. Les rondelles de bois ont également fait l'objet d'un suivi de leur masse et d'observations macroscopiques. Le potentiel d'activité métabolique des

communautés bactériennes a été étudié par la méthode Biolog^{ECO} (collaboration C. Roose-Amsaleg & L. Millot-Cornette, METIS) sur les échantillons de poudre de bois à 73 semaines.

Tableau 1. Variabilité initiale des rondelles de bois. %C, %N, δ¹³C et δ¹⁵N le long de la branche. σ : écart-type.

Eléments	n	Teneur élémentaire (%)			Composition isotopique (‰)		
		Moyenne	2σ	Range	Moyenne	2σ	Range
Carbone	11	47,5	0,9	46,7 ; 48,3	-24,1	0,2	-24,3 ; -23,9
Azote	10	0,08	0,02	0,07 ; 0,10	-0,2	1,0	-0,8 ; 1,1

II.1.b. Perte en masse des rondelles

Après 73 semaines de dégradation, les rondelles de bois ont accusé une perte en masse de 10% dans l'eau distillée et 30% dans l'eau de rivière (Tramoy et al., 2017). Si la perte en masse est significativement plus faible dans l'eau distillée que dans l'eau de rivière, elle n'est pas négligeable et peut être attribuée à la perte des constituants les plus labiles du bois, organiques (monoses, acides aminés, etc.) ou inorganiques, du fait de dégradation abiotique (principalement lessivage) et/ou de dégradation biotique assurées par les (micro-)organismes initialement présents dans les rondelles (Tietema & Wessel, 1994 ; Ibrahima et al., 1995). La masse des rondelles présente une décroissance linéaire avec le temps, de pente respective -0,11 et -0,36 dans l'eau distillée et de rivière (Fig. 19). La décroissance mesurée dans l'eau de rivière est du même ordre de grandeur que celle rapportée par Melillo et al. (1989) au cours de la première phase de dégradation d'aiguilles de pin dans la litière d'un sol (-0,45). Deux phases sont généralement distinguées dans la dégradation des macrorestes végétaux : une première principalement due à la dégradation des carbohydrates et pouvant conduire jusqu'à 80% de perte en masse, et une seconde plus lente conduisant à des pertes en masse plus faibles (Melillo et al., 1989 ; Schleser & Frielingsdorf, 1999). Les pertes en masse mesurées ici sont néanmoins inférieures à celles généralement mesurées dans les sols, en accord avec (1) les caractéristiques des sols qui sont généralement considérés comme plus agressifs pour la MO que la colonne d'eau ou l'interface eau-sédiment, et (2) les caractéristiques biochimiques du bois considéré comme plus résistant à la dégradation du fait de sa plus forte densité et sa plus faible teneur en azote que les feuilles.

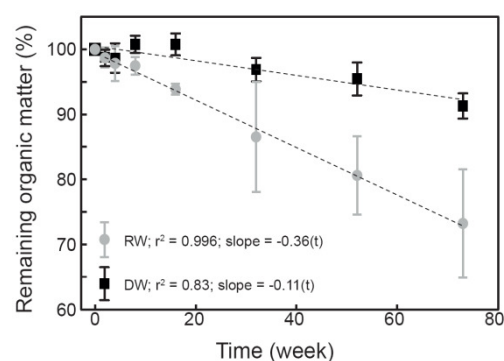


Figure 19. Perte en masse des rondelles au cours du temps. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des triplicats (2σ) ; 100% correspond à la valeur initiale ; DW, eau distillée ; RW, eau de rivière, t, temps.

II.1.c. Colonisation fongique des rondelles

Les champignons sont les principaux organismes capables de dégrader le bois. La colonisation du bois par des champignons dégradateurs peut commencer dès qu'un arbre est coupé ou même avant, dans la mesure où le bois, notamment celui des conifères, abrite souvent des champignons parasites ou épiphytes (Fengel, 1991). On classe les modes de dégradation du bois par les champignons en trois groupes selon l'aspect morphologique du bois dégradé (Fengel, 1991 ; Martinez et al., 2005) :

- La pourriture blanche, principalement assurée par des champignons basidiomycètes, consiste en une dégradation sélective de la lignine et de l'hémicellulose dans un premier temps, qui confère au bois pourri un aspect blanchâtre ; la cellulose est généralement dégradée dans un second temps (notamment dans le bois de conifères).
- La pourriture brune, également assurée par des champignons basidiomycètes, conduit à une pourriture friable de couleur brune du fait de la dégradation préférentielle de la cellulose et de l'hémicellulose,
- La pourriture molle conduit également à une pourriture de couleur sombre, mais d'aspect plus souple, principalement assurée par des ascomycètes et des deutéromycètes, qui dégradent moins efficacement le bois. C'est là encore la cellulose et l'hémicellulose qui sont préférentiellement dégradés dans la pourriture molle.

Contrairement aux pourritures blanches et molles, la pourriture brune ne se développe pas dans des milieux très humides.

A l'état initial, les rondelles de bois présentent des zones brun-rougeâtre, de taille millimétrique (Fig. 20.a & b, t_0 ; Tramoy et al., 2017), vraisemblablement dues à des champignons de type pourriture brune ou pourriture molle déjà présents dans le bois au moment de l'échantillonnage (Eriksson et al., 1990). Les rondelles se dégradant dans de l'eau distillée et de rivière présentent des caractéristiques macroscopiques différentes (Tramoy et al., 2017) :

- Dans l'eau distillée, des champignons blanchâtres et translucides commencent à se développer sur les rondelles au bout de deux semaines de dégradation, puis virent au brun-noir au bout de 8 semaines pour devenir abondants à partir de 16 semaines (Fig. 20.a, t_4). Il s'agit vraisemblablement de champignons de type pourriture molle.

- Des signes évidents de développement fongique significatif n'apparaissent qu'à partir de 16 semaines dans l'eau de rivière : l'eau devient trouble et jaunâtre, des particules millimétriques flottent à la surface, le bois devient spongieux et prend une teinte homogène jaunâtre-blanchâtre

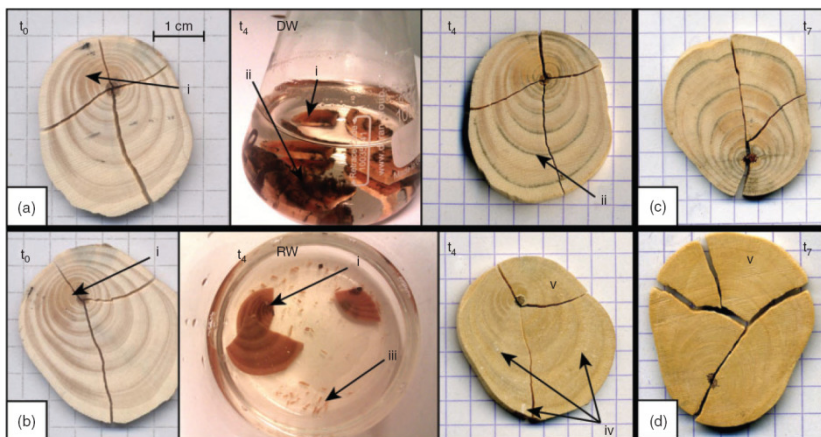


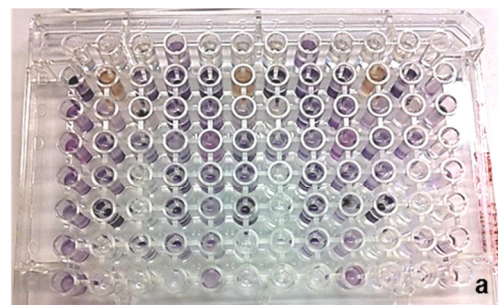
Figure 20. Morphologie des rondelles de bois avant dégradation (t_0) et après 16 (t_4) et 73 (t_7) semaines de dégradation. DW, eau distillée (a,c) ; RW, eau de rivière (b,d) ; i, zones brun-rougeâtre caractéristiques de la pourriture brune ou molle ; ii, champignon brun flottant au-dessus des limites de cerne ; iii, particule de bois flottant ; iv, tâches blanches caractéristiques de pourriture blanche ; v, uniformisation de la coloration.

(Fig. 20.b, t_4). Il s'agit vraisemblablement de champignons de type pourriture blanche. L'efficacité supérieure de la pourriture blanche par rapport à la pourriture molle en termes de dégradation du bois, explique, au moins en partie, la plus grande perte en masse des rondelles se dégradant dans l'eau de rivière par rapport à celle de l'eau distillée.

II.1.d. Microflore des poudres

Le suivi de la perte en masse et l'observation macroscopique des échantillons sont difficiles pour les dispositifs de dégradation de poudres de bois qui consistent en des mélanges assez denses de poudre et d'eau, et pour lesquels l'échantillonnage se fait par prélèvement de quelques centilitres par pas de temps. En revanche, la quantité de matière disponible à la fin de l'expérience a permis d'évaluer la diversité fonctionnelle de leurs communautés bactériennes par la méthode $\text{Biolog}^{\text{ECO}}$ (Garland & Mills, 1991). Cette méthode permet de tester la capacité des communautés bactériennes à utiliser les différents substrats carbonés disponibles dans les puits des plaques $\text{Biolog}^{\text{ECO}}$ prêtes à l'emploi (Fig. 21.a). L'indice AWCD (average well colour development) qui traduit le développement des microorganismes sur les divers substrats testés, est représentatif de l'activité et de la diversité bactérienne des milieux étudiés (Zak et al., 1994 ; Zhao et al., 2013). Le potentiel d'activité métabolique bactérienne s'est avéré plus élevé pour l'expérience avec l'eau distillée que pour celui avec l'eau de rivière ($\text{AWCD}_{\text{B+dist}}=0,98\pm 0,03$ vs $\text{AWCD}_{\text{B+riv}}=0,41\pm 0,09$, moyenne \pm écart-type) alors que le potentiel d'activité métabolique bactérienne de l'eau distillée initiale était inférieur à celui de l'eau de rivière initiale ($\text{AWCD}_{\text{dist-ini}}=0,00\pm 0,00$ vs $\text{AWCD}_{\text{riv-ini}}=0,08\pm 0,08$). Dans la mesure où la perte en masse des rondelles de bois est supérieure dans l'eau de rivière, on peut en déduire que ce ne sont pas les bactéries, ou du moins les communautés bactériennes étudiées par la méthode $\text{Biolog}^{\text{ECO}}$, qui sont les principales responsables de la dégradation du bois dans cette expérience. Comme le montrent les observations macroscopiques, et en accord avec la littérature (e.g. Eriksson et al. 1990), ce sont bien les champignons qui sont les principaux agents de la dégradation du bois.

Le potentiel métabolique des communautés bactériennes caractérisables par la méthode Biolog^{ECO} est apparu comparable pour les deux milieux puisque c'est sur les polymères que le développement microbien a été le plus important, et sur les phénols et les amines qu'il a été le plus faible, pour les deux types d'eau (Fig. 21.b).



II.1.e. Dynamique du carbone

La teneur en carbone des échantillons dégradés est apparue assez variable et légèrement supérieure (50,2% de C au maximum) à celle du bois non dégradé (47,4% de C; Tramoy et al., 2017), sauf pour les poudres de bois prélevées à 4, 25 et 32 semaines (respectivement 47,1%, 47,3% et 45,9%) se dégradant dans de l'eau distillée (Fig. 22). Le $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons dégradés est légèrement supérieur à celui du bois non dégradé (-24,1‰) bien que restant généralement dans la gamme de la précision analytique (0,2‰), à l'exception de quelques poudres après 32 semaines de dégradation qui présentent des $\delta^{13}\text{C}$ proches de -23,7‰ (Fig. 22). Les particules de bois flottant prélevées à 16 semaines dans les erlenmeyers d'eau de rivière montrent, quant à elles, des compositions élémentaire et isotopique en carbone très différentes du bois non dégradé : 35% de C pour un $\delta^{13}\text{C}$ de -22,6‰.

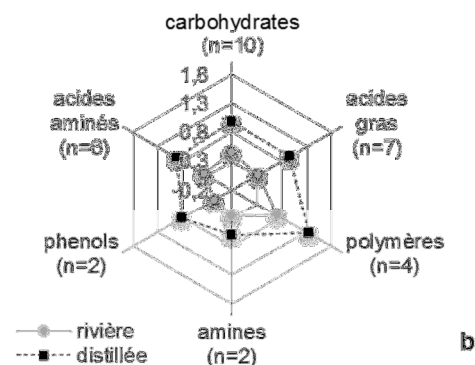


Figure 21. Caractérisation des communautés bactériennes par plaque Biolog^{ECO}. A. Exemple plaque après incubation des échantillons de poudre de rivière ; b. Indice AWCD de l'activité bactérienne potentielle.

La décomposition naturelle ou le vieillissement artificiel de matériel végétal montre souvent un enrichissement en carbone accompagné par un appauvrissement en ^{13}C (Spiker & Hatcher, 1987 ; Schleser & Frielingsdorf, 1999). Ces caractéristiques de dégradation sont généralement attribuées à la dégradation préférentielle de carbohydrates qui sont naturellement appauvris en carbone et enrichis en ^{13}C par rapport aux autres constituants végétaux comme la lignine. De plus, la dégradation microbienne de MO est souvent associée à une perte de carbone appauvri en ^{13}C par respiration (Lerch et al., 2011), pouvant conduire à un enrichissement en ^{13}C de la MO résiduelle. Notons que les échantillons analysés ici, notamment ceux des expériences de dégradation de poudre, correspondent à la combinaison de MO végétale (bois) et microbienne. Notons également que le carbone microbien inclut une composante issue du métabolisme du bois mis à dégrader, ainsi qu'une composante issue de l'environnement.

La variabilité des compositions élémentaire et isotopique des échantillons rend difficile la mise en évidence de tendance au cours de la dégradation et leur interprétation doit être effectuée avec précaution. La légère augmentation de la teneur en carbone des échantillons, notamment dans les poudres, suggère un enrichissement (relatif) en composés riches en carbone qui pourrait être dû au métabolisme préférentiel des carbohydrates par les micro-organismes responsables de la dégradation. Toutefois, cet enrichissement en carbone ne s'accompagne pas d'un appauvrissement en ^{13}C , comme c'est le cas dans certaines expériences de décomposition de débris végétaux (Benner et al., 1987). Une faible tendance à l'augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ semble même se dessiner pour les poudres de bois. On peut formuler les hypothèses suivantes pour expliquer les évolutions observées :

- Seule une faible quantité de matériel a été affectée par la dégradation (seulement 10% des rondelles dans l'eau distillée et 30% dans l'eau de rivière).

- Des composés pauvres en ^{13}C ont également été dégradés (tannins, lignine, autres composés non polaires ; Melillo et al., 1989) ; les champignons de la pourriture blanche, vraisemblablement à l'œuvre dans l'eau de rivière, sont notamment capables de dégrader simultanément la lignine et la cellulose (Eriksson et al., 1990; Martinez et al., 2005);
- La MO totale analysée intègre une composante microbienne enrichie en ^{13}C (notamment du fait de sa synthèse à partir des carbohydrates riches en ^{13}C par rapport au matériel non métabolisé). C'est vraisemblablement ce phénomène, en plus marqué, qui explique la biogéochimie (appauvrissement en C et enrichissement en ^{13}C) des particules flottant dans les erlenmeyers d'eau de rivière où se dégradent les rondelles de bois ;

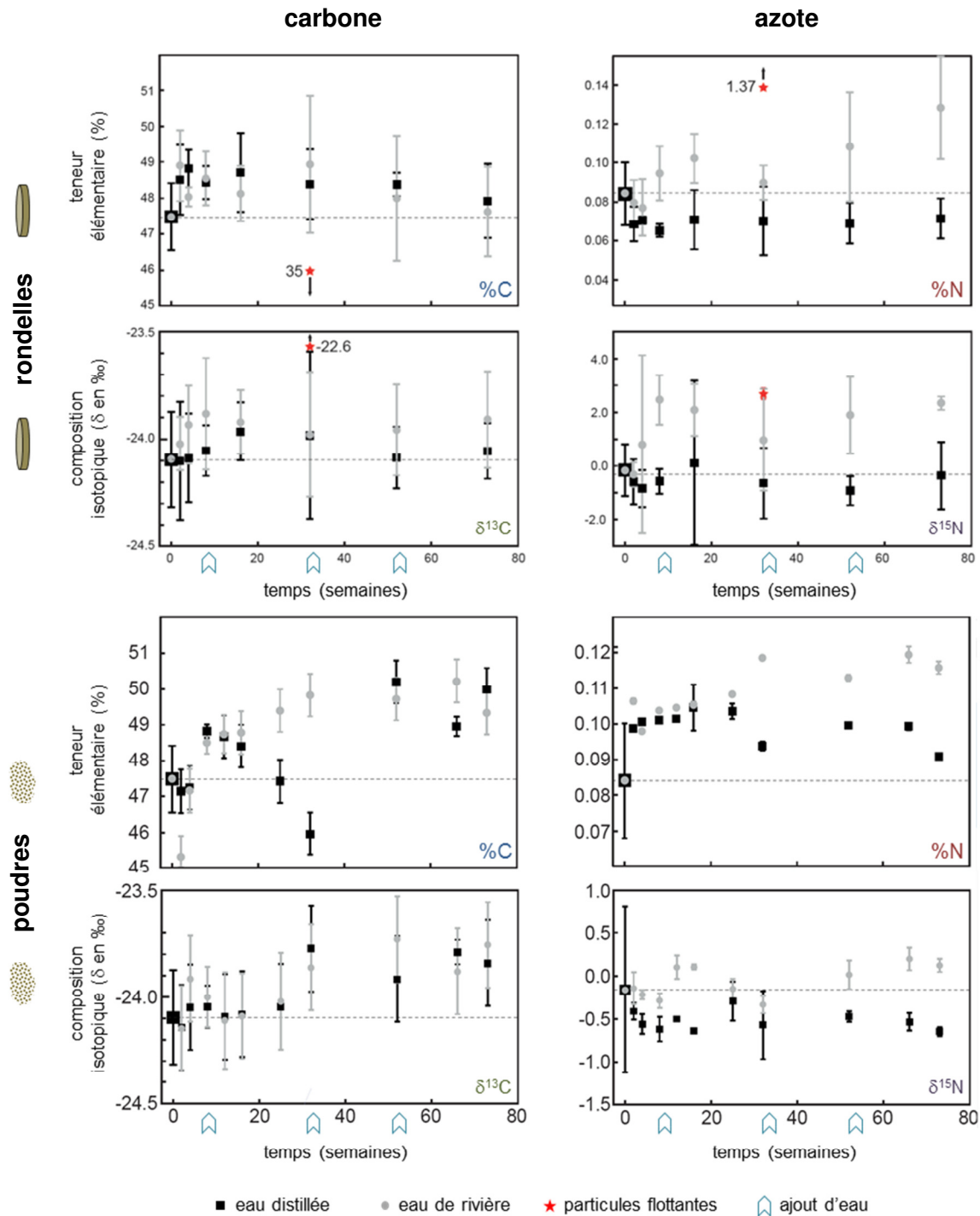


Figure 22. Dynamique du carbone et de l'azote des échantillons de bois au cours du temps.

- La MO résiduelle/non dégradée s'enrichit en ^{13}C du fait du métabolisme préférentiel de ^{12}C qui réagit plus vite que le ^{13}C , au sein d'un réservoir donné de composés végétaux (e.g. cellulose, lignine, protéines, etc. ; Lerch et al., 2011).

La dynamique du carbone observée ici résulte donc vraisemblablement de la combinaison complexe de plusieurs phénomènes jouant simultanément sur sa composition élémentaire et isotopique.

La teneur en carbone des expériences de dégradation de poudres de bois dans de l'eau distillée entre 16 et 32 semaines est difficile à interpréter. Elle pourrait être due à (1) une contamination de l'eau ajoutée en cours d'expérience pour compenser l'évaporation et/ou (2) des conditions particulières dans les erlenmeyers échantillonnés au cours de cette période, qui auraient conduit à une accélération de la respiration microbienne, réduisant ainsi la teneur en C des échantillons.

II.1.f. Dynamique de l'azote

Les compositions élémentaire et isotopique de l'azote montrent des tendances plus marquées au cours de l'expérience que celles du carbone, et plus contrastées entre les deux types d'eau (distillée vs rivière) et les deux formes de bois dégradé (poudres vs rondelles ; Tramoy et al., 2017). Les teneurs en azote des échantillons dégradés sont plus élevées pour les poudres que pour les rondelles, et dans l'eau de rivière que dans l'eau distillée (Fig. 22). Alors qu'à la fin de l'expérience les rondelles se dégradant dans l'eau distillée sont légèrement appauvries en azote par rapport au bois non dégradé, les échantillons des trois autres modalités se trouvent enrichis en azote. L'évolution du $\delta^{15}\text{N}$ au cours de l'expérience tend vers des valeurs supérieures à celles de l'eau distillée pour l'eau de rivière, pour les poudres comme pour les rondelles. Compte-tenu de la forte variabilité du $\delta^{15}\text{N}$ du bois non dégradé ($2\sigma = 1,0\text{‰}$), seules les rondelles se dégradant dans l'eau de rivière montrent une tendance vraiment marquée de leur composition isotopique avec un enrichissement en ^{15}N par rapport au bois non dégradé pouvant atteindre 2‰ (Fig. 22 ; Tramoy et al., 2017). Néanmoins, l'appauvrissement progressif en ^{15}N des rondelles se dégradant dans l'eau distillée ($-0,5\text{‰}$ après 73 semaines de dégradation contre $-0,2\text{‰}$ initialement) apparaît statistiquement significatif (test de Student), de même que l'enrichissement en ^{15}N des poudres d'eau de rivière par rapport aux poudres d'eau distillée. Les particules de bois flottant dans l'eau de rivière sont enrichies en azote et en ^{15}N par rapport au bois non dégradé et aux rondelles de bois se dégradant dans le même erlenmeyer (Fig. 22).

L'augmentation de la teneur en azote du bois résiduel (poudres et rondelles, eau distillée) est vraisemblablement due à l'accumulation d'azote correspondant à la phase d'immobilisation des nutriments souvent décrite dans les litières (Melillo et al., 1989; Laiho & Prescott, 2004 ; Berg & Lakowski, 2005; Bebber et al., 2011). Cette accumulation est généralement attribuée à (1) une fixation de N_2 par des procaryotes spécialisés et/ou (2) une translocation/importation d'azote de l'environnement (nitrates, MO dissoute, etc.) vers le matériel dégradé via le mycélium fongique. Cette dernière hypothèse est confortée ici par le $\delta^{15}\text{N}$ du bois résiduel qui est proportionnel à la teneur en azote. De plus, dans les expériences en eau de rivière, le $\delta^{15}\text{N}$ du bois résiduel est compatible avec le $\delta^{15}\text{N}$ des nitrates des rivières d'Île de France, ($+4\text{‰}$ à $+13\text{‰}$, Sebilo et al., 2003). L'enrichissement en azote et en ^{15}N des particules flottant dans l'eau de rivière suggère un envahissement par des micro-organismes riches en azote. Notons que les processus de fractionnement isotopique microbiens souvent évoqués pour expliquer un enrichissement en ^{15}N , ne semblent pas être à l'œuvre ici car ils sont généralement associés à une perte en azote (Asada et al., 2005; Connin et al., 2001).

La diminution de la teneur en azote et l'appauvrissement en ^{15}N des rondelles se dégradant dans l'eau distillée sont vraisemblablement dus à la consommation d'acides aminés et de protéines riches en ^{15}N (Macko et al., 1987 ; Fogel & Tuross, 1999;) par les champignons (Watkinson et al., 2006 ; Bebber et al., 2011). Un simple lessivage d'azote ne constitue probablement pas le principal facteur ayant influencé la signature biogéochimique de ces échantillons puisqu'a priori, il ne provoque pas de fractionnement isotopique (Benner et al., 1991).

II.1.g. Conclusions et implications

Cette expérience confirme la complémentarité des approches (micro)biologique et géochimique pour étudier le devenir de la signature biogéochimique de la MO végétale dans l'environnement : l'eau distillée et l'eau de rivière ont favorisé le développement de cortèges de (micro)organismes différents (pourriture molle et activité bactérienne intense pour l'eau distillée / pourriture blanche et activité bactérienne moindre pour l'eau de rivière) qui ont conduit à des signatures biogéochimiques différentes. L'azote montre ainsi un enrichissement en ^{15}N du bois résiduel dans l'eau de rivière alors que, dans l'eau distillée, sa composition isotopique tend à demeurer constante voire à diminuer. La forme de la MO végétale joue également un rôle sur l'effet de la dégradation sur sa signature biogéochimique : les phénomènes semblent plus prononcés pour les poudres dont la signature suggère une intégration de MO microbienne plus importante que pour les rondelles. Si ces résultats confirment l'intérêt de travailler sur des petites particules pour étudier la dégradation au laboratoire, ils pourraient également suggérer que l'utilisation de macrorestes végétaux est préférable à celle MO sédimentaire dispersée comme support biogéochimique d'information (paléo)environnementale. Néanmoins, ce sont paradoxalement les rondelles s'étant dégradées dans l'eau de rivière qui montrent, à l'issue de l'expérience, la plus forte variation de leur $\delta^{15}\text{N}$.

De toute évidence la signature biogéochimique de l'azote dans la MO dégradée est plus complexe que celle du carbone, car intégrant une plus forte composante microbienne (champignons et bactéries comportant plus d'azote que les végétaux), elle-même dépendante de l'azote organique et inorganique disponible dans l'environnement. De fait, le $\delta^{13}\text{C}$ du bois a moins varié au cours de l'expérience que son $\delta^{15}\text{N}$, confirmant la relative stabilité du signal isotopique du carbone dans la MO, et donc son intérêt pour les reconstructions paléoenvironnementales. Sans invalider l'utilisation des isotopes stables de l'azote de la MO à des fins paléoenvironnementales, cette étude montre que dégradation et diagenèse conduisent, pour l'azote plus que pour le carbone, à une intégration de la signature isotopique de composantes environnementales multiples qui doivent être prises en compte lors de l'interprétation de la signature isotopique de la MO ancienne. Notons par ailleurs que même si le $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons a peu varié au cours de l'expérience, il tend toutefois à augmenter légèrement, ce qui est en accord avec la signature isotopique des végétaux fossiles qui sont systématiquement enrichis en ^{13}C par rapport aux végétaux actuels (Rigby et al., 1981 ; Bocherens et al., 1993; Gröcke, 1998; Nguyen Tu et al., 2004a ; Barral et al., 2015). Cet enrichissement en ^{13}C des fossiles est de l'ordre de 3‰ et ne peut être exclusivement expliqué par l'effet Suess (injection de CO_2 issus des combustibles fossiles depuis la révolution industrielle ayant conduit à un appauvrissement de l'atmosphère en ^{13}C de l'ordre de 1,5‰). Cependant, l'extrapolation des tendances obtenues pour cette expérience aux compositions élémentaires de la MO ancienne conduit à des compositions isotopiques irréalistes comparées à celles de cette même MO, notamment pour l'azote. Ceci suggère que les effets de la dégradation et de la diagenèse sur la signature biogéochimique de la MO ne sont pas linéaires, sont les plus intenses durant les premiers stades de la dégradation et de la diagenèse, et quasiment instantanés à l'échelle de temps

géologiques (Tramoy et al., 2017). Les résultats obtenus pour cette expérience de dégradation de bois en microcosmes aquatiques reflètent l'état actuel des connaissances sur la nature de la MO préservée ou séquestrée dans l'environnement actuel et fossilisée dans les sédiments anciens : elle correspond à l'intégration de composantes microbiennes et végétales, incluant à la fois des molécules considérées comme stables du fait de leur récalcitrance chimique intrinsèque et d'autres réputées labiles.

II.2. Dégradation des biomarqueurs lipidiques dans les sols et les sédiments : expérience en sac de litière

L'expérience précédente a illustré le rôle de variations des proportions relatives des différents constituants de la MO sur sa signature biogéochimique totale ("bulk"). Mieux comprendre les effets de la dégradation sur la MO passe ensuite par l'étude du devenir de chacun de ses constituants au cours de la dégradation. Dans la mesure où les lipides sont souvent considérés comme parmi les constituants les plus stables des végétaux et que leur caractérisation dans les fossiles peut aider à reconstituer leur taxinomie, les principaux projets que j'ai menés ces dernières années se sont focalisés sur les effets de la dégradation sur les lipides végétaux, principalement foliaires. Si les incubations en laboratoire permettent de contrôler les conditions de dégradation, elles ne sont pas véritablement représentatives des phénomènes naturels. Les résultats décrits dans cette partie concernent donc des expériences en milieu naturel, qui visaient à caractériser les effets de la dégradation sur la composition moléculaire des lipides foliaires, dans deux types d'environnements où sont susceptibles de séjourner les débris végétaux avant enfouissement et fossilisation : l'interface eau-sédiment (thèse F. Zanetti) et le sol. Outre le suivi des lipides au cours de la dégradation des feuilles, l'objectif de cette étude était de comparer la dégradation des lipides dans ces deux types d'environnement afin de déterminer si des séjours dans l'un ou l'autre de ces environnements pouvaient modifier différemment la signature lipidique des feuilles.

II.2.a. Principe et design expérimental

Les feuilles ont été mises à dégrader dans des sacs de litière (Fig. 23), dispositifs de sacs grillagés couramment utilisés en sciences du sol car ils permettent (1) de suivre précisément les feuilles mises à dégrader à un instant donné, sans risque de contribution de feuilles plus récentes ou plus anciennes, et (2) de récupérer les débris de feuilles dégradées même lorsque celles-ci sont très fragmentées. Les expériences de dégradation dans le sol et à l'interface eau-sédiment ont été menées sur un même site : le site atelier INRA de la forêt de Breuil-Chenu (Réseau des Observatoires de Recherche sur l'Environnement, Nièvre, Parc Naturel Régional du Morvan, collaboration B. Zeller, BEF) qui est instrumenté et permet un suivi continu des principaux paramètres climatiques (température, pluviométrie, luminosité, vent, etc.). Le substrat géologique régional correspond au granite alcalin de la Pierre-qui-Vire, couvert par une fine couche de silt éolien. Le sol est un cambisol dystrique avec une forme d'humus de type moder, il est acide ($\text{pH} \approx 4-4,5$) et présente une faible capacité d'échange cationique. L'expérience de dégradation à l'interface eau-sédiment a été menée dans un



Figure 23. Sacs de litières mis à dégrader sur le site atelier de Breuil-Chenu (Morvan). a. Sac de l'interface eau-sédiment ; b. Sacs du sol.

étang adjacent à la parcelle où l'expérience en sol a été effectuée. L'étang, profond d'environ 1,5 m, présente une colonne d'eau caractéristique de solution de sol forestier sur substratum granitique : légèrement acide (pH≈6), peu turbide et saturée en oxygène sur toute l'épaisseur de la tranche d'eau (Nguyen Tu et al., 2017).

Cette étude est focalisée sur le hêtre commun (*Fagus sylvatica*), fréquent dans les forêts naturelles du Morvan. Des feuilles sénescentes ont été récoltées à l'automne sur les arbres de la parcelle de l'expérience en sol et placées dans des sacs grillagés de maille 1,5 mm. Cette maille a été choisie comme compromis optimal permettant à la fois (1) la récupération de petits débris de feuilles, (2) la libre circulation des principaux composants de la pédofaune locale, les enchytréides (de petits annélides incolores), et (3) l'activité microbienne. Des expériences préliminaires ayant montré que les grillages de nylon et polypropylène généralement utilisés en sciences du sol étaient susceptibles de libérer des contaminants potentiellement extractibles avec les lipides, des sacs en aluminium ont été confectionnés pour l'expérience. Chaque sac contenait entre 10 et 15 feuilles, soit approximativement 1 g de MO. Afin de reproduire au mieux la dégradation suivant la chute des feuilles à l'automne, les sacs ont simplement été posés à la surface du sol et du sédiment à la fin de l'automne. Les sacs de l'expérience à l'interface eau-sédiment ont été lestés avec des baguettes en verre afin de les maintenir au fond de l'étang. L'expérience a duré 2,5 ans au cours desquels des sacs ont été régulièrement prélevés, en duplicat autant que possible (Fig. 24). Après rinçage à l'eau distillée et retrait d'éventuelles particules étrangères (racines, mousse, arthropodes, etc.) les feuilles ont été photographiées, pesées et broyées, puis les lipides ont été extraits aux solvants organiques (CH₂Cl₂/CH₃OH, 2/1, v/v) et analysés en chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. L'introduction en quantité connue de standards internes dans les extraits a permis la quantification des divers constituants lipidiques.

II.2.b. Perte en masse et en lipides totaux au cours de la dégradation

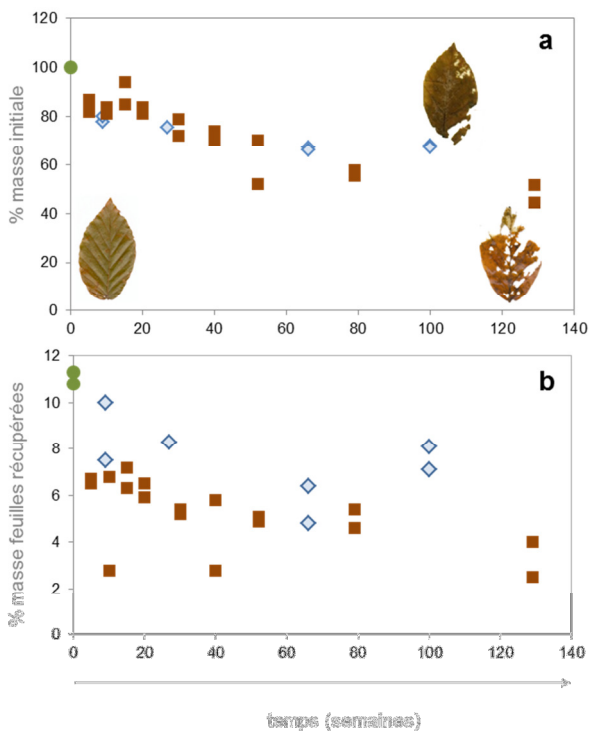


Figure 24. Changement des caractéristiques biogéochimiques des feuilles au cours de l'expérience. ● feuilles initiales ; ■ sol ; ◇ interface eau-sédiment ; a. perte en masse des feuilles ; b. teneur en lipides.

Après 100 semaines de dégradation à l'interface eau-sédiment et 129 semaines de dégradation dans la litière du sol, les feuilles des sacs de litière ont respectivement accusé une perte en masse de 33% et 52% (Fig. 24). Même si les deux types de sac n'ont pas pu être échantillonnés précisément à la même date, il semble que la dégradation ait été légèrement plus prononcée dans le sol, qu'à l'interface eau-sédiment, comme cela est généralement admis (Hedges & Oades, 1997). Outre des pertes en masse moins importantes, les feuilles se dégradant à l'interface eau-sédiment demeurent presque entières à l'issue de l'expérience et ont acquis une couleur brun-foncé, alors que les feuilles se dégradant sur le sol montrent de nombreuses lacunes dues à la consommation du limbe par la pédofaune, ainsi qu'une teinte brun-clair (Fig. 24). La perte en masse des feuilles se dégradant à l'interface eau-sédiment est similaire à celle obtenue précédemment au laboratoire pour les rondelles de bois se dégradant dans de l'eau de rivière (30%

après 73 semaines de dégradation). Cette similitude est inattendue dans la mesure où les caractéristiques biochimiques des bois leur confèrent a priori un potentiel de préservation supérieur à celui des feuilles : leur teneur en lignine est élevée et leur rapport C/N très faible (Melin, 1930 ; Witkamp, 1966 ; Taylor et al., 1989 ; Steart et al., 2009). Ces résultats vont dans le sens de récentes synthèses sur la dégradation de la MO dans l'environnement qui montrent que la qualité chimique de la MO n'est pas le seul déterminant de sa sensibilité à la dégradation/potentiel de préservation (Marschner et al., 2008 ; Kleber, 2010).

La dynamique de dégradation des feuilles dans les deux milieux suit un schéma commun : après une dégradation très rapide (-20%, pente -3,1) durant les premières semaines suivant la mise en place des sacs, les feuilles voient leur perte en masse ralentir (pente -0,11, Fig. 24). Du fait de pas d'échantillonnage assez longs, la toute première phase de dégradation très rapide des feuilles n'est pas toujours rapportée dans la littérature. Elle a toutefois été signalée par plusieurs auteurs et pourrait être attribuée à la respiration microbienne et au lessivage des composés hydrosolubles organique et inorganique des feuilles (Tietema & Wessel, 1994 ; Ibrahima et al., 1995). L'absence de cette première phase de dégradation durant l'incubation de bois au laboratoire (alors que le pas d'échantillonnage était adapté à sa mise en évidence) pourrait être due à la densité du bois (bien supérieure à celle des feuilles) ou encore à ses plus faibles teneurs en composés hydrosolubles que celles des feuilles.

La teneur en lipides des feuilles passe de 11% de la masse dans les feuilles sénescentes à 7,6% après 100 semaines de dégradation à l'interface eau-sédiment et 3,3% après 129 semaines de dégradation dans le sol, ce qui correspond à des pertes en lipides respectives de 31% et 70% dans l'étang et dans le sol (Fig. 24). Pour les lipides comme pour les feuilles totales, il semble que malgré les différences de dates d'échantillonnage, la dégradation soit plus prononcée dans le sol qu'à l'interface eau-sédiment. Dans le sol, les taux de dégradation des lipides (-70%) sont supérieurs à ceux des feuilles totales (-50%), suggérant que les lipides sont dégradés plus rapidement que les constituants non lipidiques des feuilles, ce qui n'est pas le cas à l'interface eau-sédiment. Ces résultats montrent que si le potentiel de préservation élevé des lipides se vérifie en milieu sédimentaire, il ne l'est pas pour les sols. Le suivi des teneurs en lipides des feuilles au cours de l'expérience montre, au moins pour le sol, une phase de dégradation intense au cours des premières semaines qui ont suivi la mise en place des sacs de litière sur le terrain (Fig. 24). Si le lessivage est peu vraisemblable pour expliquer cette première phase de perte en masse des lipides, une biodégradation microbienne initiale intense est plus réaliste, comme souvent proposé pour la MO totale des feuilles (Tietema & Wessel, 1994).

L'évolution de la teneur en lipides des feuilles s'est avérée beaucoup plus variable que celle de la masse des feuilles totales (Fig. 24), suggérant que la dégradation des lipides est beaucoup plus influencée par les variations micro-environnementales locales que les feuilles totales. Les sols, et particulièrement les sols de forêt, sont des milieux très hétérogènes (Hedges & Oades, 1997 ; Bélanger & Van Rees, 2008 ; Lehmann et al., 2008). De nombreuses caractéristiques biogéochimiques des sols varient sur quelques décimètres, de sorte que des profils de dégradation différents pour des sacs distants de quelques décimètres ne sont pas surprenants (Witkamp & Olson, 1963 ; Murphy et al., 1998 ; Suchewaboripont et al., 2011). De plus, les principaux agents de la décomposition des litières dans la forêt de Breuil-Chenuie sont des champignons saprophytes, qui présentent une distribution spatiale hétérogène (Zeller et al., 2007). Les conditions de dégradation au sein des sédiments sont considérées comme beaucoup moins variables spatialement que dans les sols, bien que la dégradation des feuilles à l'interface eau-sédiment ait rarement été étudiée sur le terrain, particulièrement sous une telle colonne d'eau. Toutefois, la décomposition des feuilles dans de l'eau de mer et dans des cours d'eau s'est avérée variable au sein de zones géographiques

limitées et/ou lors de suivis de quelques mois (Suberkropp et al., 1976 ; Rublee & Roman, 1982; Webster & Benfield, 1986 ; Boulton & Boon, 1991; Machás et al., 2006; Moretti et al., 2007;).

II.2.c. Effet de la dégradation sur les biomarqueurs lipidiques

La composition chimique des lipides de feuilles sénescentes a été décrite au chapitre précédent (I.1.b., Nguyen Tu et al., 2007). Les lipides sont dominés par des stérols, le plus abondant étant le β -sitostérol, et dans une moindre mesure par des isoprénoïdes acycliques tels que les phytadiènes et les phytyl-esters. Des triterpènes à squelette oléanolique, principalement de l'acide oléanolique, et des lipides à longue chaîne sont également abondants. Ces derniers incluent des séries avec des chaînes principalement paires (alcools primaires, aldéhydes et acides) et des chaînes principalement impaires (alcanes, alcools secondaires et cétones secondaires). En dépit de la diminution substantielle des lipides totaux, la signature lipidique des feuilles dégradées n'a pas révélé de changement qualitatif majeur au cours des deux ans de dégradation dans le sol, ni à l'interface eau-sédiment (Nguyen Tu et al., 2017). La fraction lipidique majoritaire présente des empreintes chromatographiques similaires quel que soit le stade de dégradation (Fig. 25) : le phytostérol et les phytadiènes demeurent les constituants dominants après plus de deux ans de dégradation. De plus, aucune accumulation de marqueur microbien ou de produit de dégradation des lipides végétaux originels n'est notée. Ces résultats suggèrent que les lipides sont rapidement minéralisés et/ou incorporés dans une matrice insoluble. Néanmoins, la quantification des principaux constituants de chaque classe de lipides a montré qu'ils étaient tous dégradés, bien qu'à des degrés différents (Fig. 26).

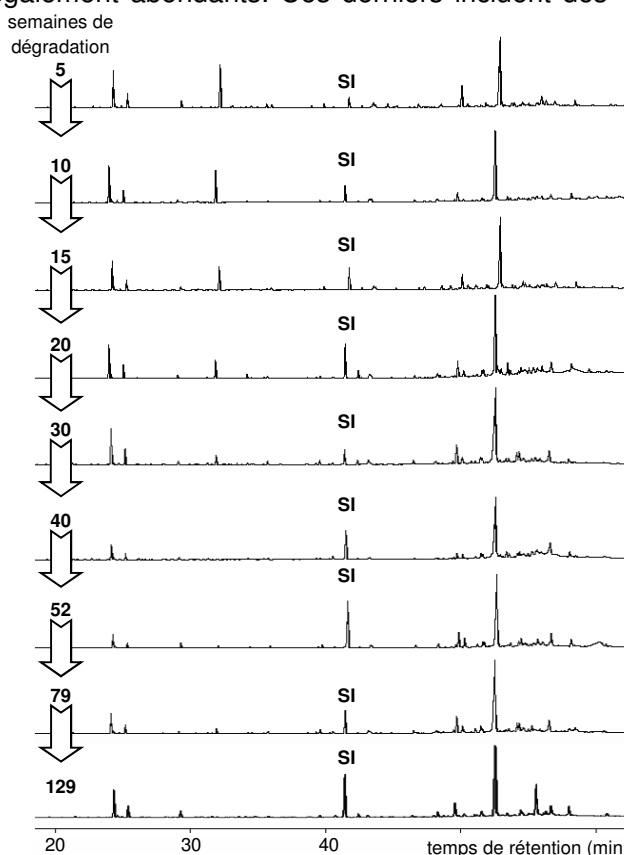


Figure 25. Evolution des lipides au cours de la dégradation des feuilles sur le sol : chromatogramme de la fraction principale (Fraction éluée au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ des lipides extraits au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$). SI : standard interne.

Dans cette expérience de deux ans, le contenu en biomarqueur des feuilles dégradées s'est avéré très variable entre les sacs de litière, même pour un pas de temps donné et un milieu donné (sol ou interface eau-sédiment, Fig. 26, Nguyen Tu et al., 2017). Cette variabilité est supérieure pour certains biomarqueurs à celle notée pour la teneur en lipides totaux des feuilles. La différence de contenu en biomarqueur entre des sacs répliqués est maximale dans le sol pour l'acide oléanolique et le phytyl-ester en C_{16} : respectivement 70% et 100%. En accord avec la plus faible variabilité des expérimentations in vitro par rapport aux études de terrain, la variabilité de la dégradation des lipides est ici supérieure, à celle rapportée pour des lipides foliaires de hêtre en laboratoire (Rieley et al., 1998). Des variabilités importantes du contenu en hydrocarbures et en acides gras ont également été rapportées au cours d'un suivi de 3 mois de feuilles décidues se dégradant dans un ruisseau (Mills et al., 2001). Une telle variabilité est probablement liée à : (1) la variabilité des conditions micro-environnementales de dégradation, comme évoqué ci-dessus, et/ou (2) la variabilité initiale du

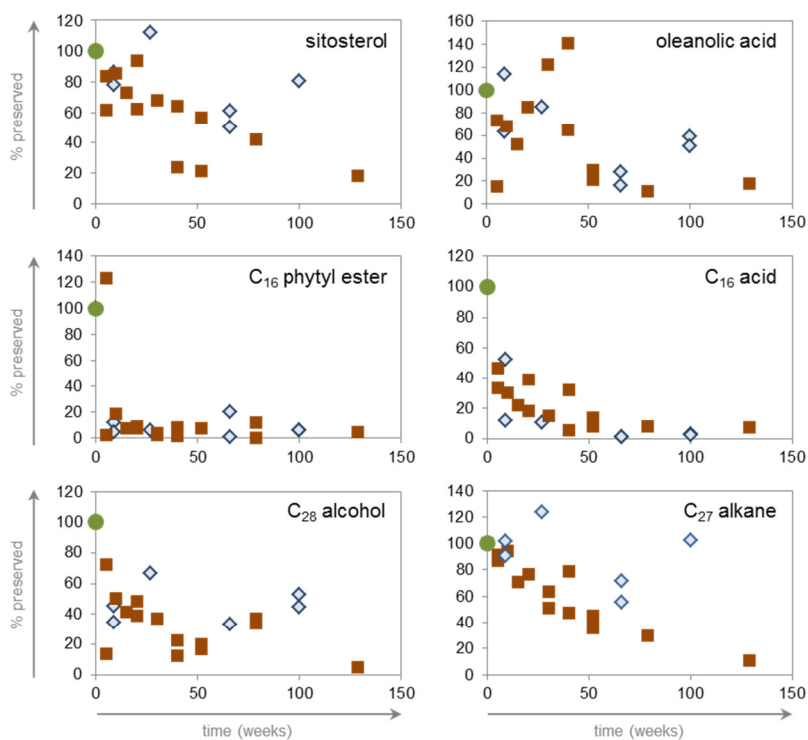


Figure 26. Profil de dégradation des principaux constituants des lipides foliaires (% de la concentration initiale) ● feuilles initiales ; ■ sol ; ◇ interface eau-sédiment ; a, perte en masse des feuilles ; b, teneur en lipides.

contenu en biomarqueurs lipidiques des feuilles. En effet, le contenu en constituants lipidiques des feuilles est connu pour varier entre espèces, entre individu et même au sein d'une feuille donnée (Herbin & Robins, 1969 ; Gülz et al., 1991 ; Gao et al., 2015). Bien que la dégradation à l'interface eau-sédiment soit généralement considérée comme moins intense que dans le sol, la forte variabilité détectée ici ne permet pas de conclure dans ce sens pour les biomarqueurs lipidiques étudiés. L'absence de différence marquée entre les deux environnements étudiés peut également être due, au moins en partie, aux conditions oxygénées régnant à l'interface eau-sédiment

de l'étang. De telles conditions sont en effet connues pour être plus favorables à la dégradation que les conditions anoxiques.

Les lipides montrent occasionnellement une abondance supérieure à celle des feuilles initiales dans les feuilles dégradées (Fig. 26). C'est le cas pour 4 des 6 classes de lipides étudiées : le β -sitostérol atteint 112% de son contenu initial dans les feuilles de l'étang après 27 semaines de dégradation, le contenu en acide oléanolique de certains sacs de litière du sol et de l'étang est compris entre 114% et 141% entre 9 et 40 semaines de dégradation, 123% du contenu initial en phytol-ester en C_{16} est détecté à 5 semaines dans un des sac du sol, et l'alcane en C_{27} atteint respectivement 124% et 103% de sa teneur initiale après 27 et 103 semaines de dégradation dans l'étang. Une incubation in vitro de feuilles de hêtre par une communauté microbienne estuarienne a précédemment montré une augmentation du contenu en stérols, qui avait été attribuée à la libération d'unités liées (Rieley et al., 1998). La dégradation d'herbacées en sacs de litière a également révélé des augmentations occasionnelles (jusqu'à 230 %) de leur teneur en alcanes au cours des 10 mois de l'expérience (Wang et al., 2014). De plus, des caractérisations isotopiques ($\delta^{13}C$ et δD) d'alcane de feuilles de litière ont suggéré qu'ils pouvaient contenir des contributions d'alcane microbiens (Nguyen Tu et al., 2004b; Chikaraishi & Naraoka, 2006; Zech et al., 2011). L'augmentation occasionnelle du contenu en certains biomarqueurs lipidiques détectée ici peut donc être due soit à une contribution externe, notamment pour les molécules ubiquistes telles que les lipides linéaires, et/ou à la libération de structures liées. Quelle qu'en soit la cause, ces augmentations occasionnelles du contenu des feuilles en certains biomarqueurs, a vraisemblablement joué un rôle sur la variabilité et l'augmentation apparente de la teneur en lipides totaux des feuilles à certains pas de temps (Fig. 24).

La variabilité des résultats appelle à la prudence lors de la comparaison des tendances de dégradation. Toutefois, les lipides quantifiés semblent se dégrader selon 3 principaux profils (Fig. 26, Nguyen Tu et al., 2017) :

- Les phytyl-esters sont rapidement intégralement dégradés, comme le montre la teneur en phytyl-ester en C₁₆ qui chute à moins de 10% dès 15 semaines de dégradation, dans le sol comme à l'interface eau-sédiment.
- Les lipides linéaires (alcanes, acides, alcools) subissent une décroissance exponentielle, jusqu'à environ 7% de leur contenu initial à la fin de l'expérience.
- Les triterpènes polycycliques montrent des tendances de dégradations variables et leur contenu demeure supérieur à 15% de leur valeur initiale après deux ans de dégradation, comme montré par les profils de l'acide oléanolique et du β-sitostérol.

Ces tendances sont, dans l'ensemble, comparables à celles obtenues lors de l'incubation in vitro de feuilles de hêtre, bien que cette dernière ait été plus favorable aux phytyl-esters et moins aux alcanes (Rieley et al., 1998). Les résultats obtenus ici diffèrent légèrement des échelles de stabilités généralement déduites de profils sédimentaires puisque les alcanes sont souvent considérés comme les composés les plus stables alors que les terpénoïdes polycycliques fonctionnalisés sont classés parmi les moins stables (Cranwell, 1981 ; Colombo et al., 1997). Comme pour l'expérience précédente de dégradation de bois, une telle différence est peut-être à relier à la forme de la matière organique : dispersée dans les sédiments et sous forme de feuilles entières, ici. La cuticule des feuilles entières offre certainement une protection accrue aux lipides contenus à l'intérieur des feuilles (e.g. terpénoïdes polycycliques) par rapport aux lipides externes des cires épicuticulaires, comme les alcanes, qui pourraient principalement se trouver à l'extérieur des feuilles chez le hêtre, à l'instar du ginkgo (cf. partie 1.1.c). Quoiqu'il en soit, ces résultats soulignent la complexité et la variabilité de la dégradation des lipides dans les environnements naturels.

Malgré la dégradation substantielle des lipides linéaires, leurs principales caractéristiques de distribution à la fin de l'expérience sont dans l'ensemble comparables à celles du début (Fig. 27 ; Nguyen Tu et al., 2017) : ils demeurent largement dominés par un seul homologue (C₂₈ pour les alcools et C₂₇ pour les alcanes), avec néanmoins une légère réduction de leur gamme de longueur de chaîne. Ces résultats sont en décalage avec plusieurs études antérieures montrant que, pour des distributions d'alcanes certes plus étendues, la diagenèse précoce conduit à la dégradation préférentielle des homologues les plus courts et/ou à l'amoinissement des prédominances paires ou impaires des longueurs de chaîne (Lajat et al., 1990; Meyers & Eadies, 1993; Bechtel et al., 2001; Nguyen Tu et al., 2003). Pourtant, les alcanes d'herbacées se dégradant dans des sacs de litière ont conservé leur caractéristiques de distribution (longueur de chaîne moyenne et indice de préférence du carbone) en dépit de profils de dégradation très variables (Wang et al., 2014). Ces résultats montrent donc que les caractéristiques de distribution des séries aliphatiques ne sont pas systématiquement dégradées au cours de la diagenèse précoce, et pourraient contribuer à valider leur utilisation pour reconstituer les sources de la MO et les paléoenvironnements.

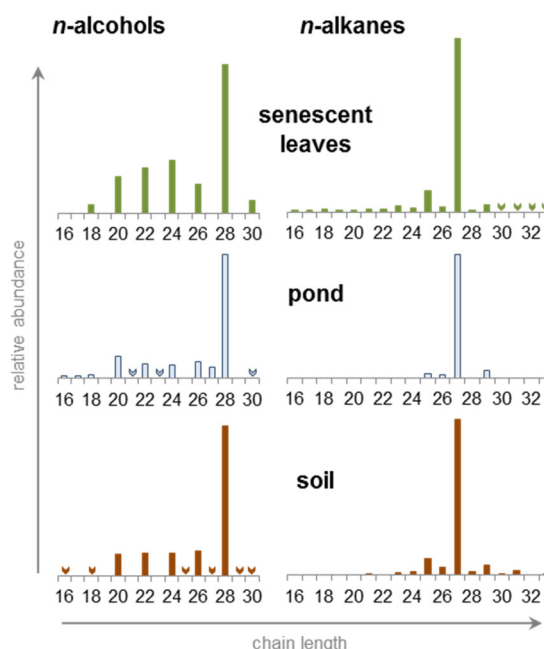


Figure 27. Distribution des alcanes et des alcools dans les feuilles sénescentes et après 2 ans de dégradation en sol et à l'interface eau-sédiment. Les flèches indiquent un homologue détecté mais sous le seuil de quantification.

II.2.d. Conclusions et implications

Cette expérimentation de terrain a confirmé que les feuilles, considérées dans leur intégralité ("bulk"), se dégradent plus vite dans la litière d'un sol qu'à l'interface eau-sédiment oxygénée d'un étang adjacent. Les lipides dans leur ensemble semblent également se dégrader légèrement plus vite dans le sol que dans l'étang. Toutefois, le contenu en lipides totaux des feuilles et celui en certains biomarqueurs s'est avéré très variable au cours des deux ans, illustrant la variabilité des conditions microenvironnementales de dégradation sur le terrain. Ces résultats soulignent l'importance des approches de terrain et de la multiplication des réplicats pour rendre compte du devenir de la MO dans l'environnement. Du fait de l'hétérogénéité du contenu en biomarqueurs spécifiques et des conditions oxygénées dans l'étang, il n'a pas été possible de dégager des tendances de dégradations différentes entre sol et interface eau-sédiment. Néanmoins, les biomarqueurs quantifiés montrent différents comportements au cours de la dégradation : augmentation occasionnelle, rapide dégradation extensive, décroissance exponentielle ou encore évolution variable. Toutefois, les principaux constituants lipidiques des feuilles sénescents sont encore détectés après plus de deux ans de dégradation dans les deux types d'environnement étudiés. Notons enfin qu'en dépit d'un taux de dégradation pouvant dépasser 90%, les lipides linéaires à longue chaîne ont conservé ici leurs principales caractéristiques de distribution (longueur de chaîne moyenne, prédominance paire ou impaire), ce qui tendrait à valider leur utilisation pour reconstituer sources de la MO et paléoenvironnements. Ces résultats suggèrent qu'à moyen terme, la dégradation en sol ou à l'interface eau-sédiment, n'affecte pas la signature en biomarqueurs des plantes de façon différente, du moins pour une approche qualitative, et dans les conditions environnementales étudiées (colonne d'eau intégralement oxygénée, milieu acide, faible capacité d'échange cationique, etc.).

II.3. Effet de la dégradation sur la signature isotopique des biomarqueurs : expérience en sac de litière avec feuilles marquées au ^{13}C

L'expérience précédente a montré que malgré une relative conservation de la signature moléculaire des lipides foliaires, il pouvait être difficile d'interpréter la modification du contenu en biomarqueurs des feuilles se dégradant dans un environnement naturel. L'augmentation occasionnelle des teneurs en certains biomarqueurs a notamment suggéré la possibilité de libération de constituants liés au complexe macromoléculaire de la MO ou de contribution microbienne externe. Bien que les lipides linéaires à longue chaîne soient souvent considérés comme caractéristiques des plantes terrestres, on en trouve également dans les (micro)organismes, notamment dans certaines espèces de champignons ou d'algues (Jones & Young, 1970; Rezanka & Sokolov, 1993; Volkman et al., 1998). Dans ce cas, il peut être difficile de distinguer les lipides végétaux des lipides microbiens, même en utilisant leur composition isotopique spécifique (Nguyen Tu et al., 2004b; Chikaraishi & Naraoka, 2006 ; Zech et al., 2011). Pourtant, les caractéristiques de distributions des lipides linéaires à longue chaîne et leur composition isotopique spécifique sont souvent utilisées pour reconstituer les paléoenvironnements, alors que de faibles variations de tels indices pourraient être dues à des (variations de) contributions microbiennes plutôt qu'à des variations paléoenvironnementales. L'étude présentée ci-après visait donc à préciser le devenir et l'origine de lipides linéaires à longue chaîne de feuilles en cours de dégradation. Pour tenter de distinguer les lipides végétaux originels des lipides externes/microbiens, cette expérience de dégradation en sac de litière a été effectuée avec des feuilles artificiellement marquées au ^{13}C dont les lipides ont fait l'objet d'un suivi isotopique individuel. Un tel suivi isotopique avait également pour objectif de tester la validité de la signature isotopique des lipides comme support fiable

d'informations (paléo)environnementales. Cette étude est focalisée sur les *n*-alcanes à longue chaîne qui sont réputés les plus stables des lipides linéaires, et qui sont également les plus faciles à analyser.

II.3.a. Principe et design expérimental

Comme pour l'étude décrite en section II.2., l'espèce modèle choisie ici est le hêtre commun, *Fagus sylvatica*. Des jeunes plants de hêtre (au stade cotylédon) ont été placés 5 mois dans une chambre climatisée dont l'atmosphère était artificiellement enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ (Fig. 28, collaboration T. Bariac & P. Biron, iEES). L'enrichissement en ^{13}C de la chambre a été limité à $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} \sim +40\text{‰}$ afin d'obtenir un marquage végétal permettant (1) la détection d'effets isotopiques faibles et (2) la caractérisation isotopique de molécules marquées et non marquées dans une même analyse. Les conditions dans la chambre ont été paramétrées pour favoriser une croissance optimale des plants et un marquage le plus homogène possible (Nguyen Tu et al., 2011)

:

- substrat de vermiculite et ventilation constante de la chambre pour limiter les effets isotopiques dus à la respiration du sol ;
- conditions climatiques stables et les plus proches possibles des conditions naturelles : $p\text{CO}_2 \sim 380$ ppmv, humidité relative $\sim 70\%$, 15h d'éclairage quotidien avec des lampes produisant $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de radiation photosynthétique active, température diurne $\sim 25^\circ\text{C}$;
- trois arrosages hebdomadaires avec une solution nutritive (Coïc & Lesaint, 1983).

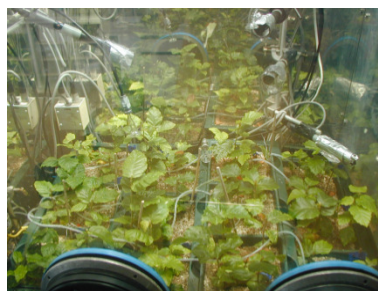


Figure 28. Jeunes plants de hêtre en cours de marquage au ^{13}C dans la chambre climatisée.

Trois semaines avant la fin du marquage, les conditions dans la chambre ont été modifiées afin d'amorcer la sénescence des feuilles : le nombre d'arrosages, la durée du jour et la température diurne ont été réduits (1/jour, 8h, 18°C). L'analyse isotopique des feuilles obtenues a révélé des compositions isotopiques très variables d'une feuille à l'autre, comprises entre -20‰ et $+40\text{‰}$ (Nguyen Tu et al., 2013). Cette large gamme de variation est principalement imputable aux feuilles qui se sont développées juste après le transfert des plants dans la chambre climatisée : elles sont peu marquées au ^{13}C du fait d'une forte contribution de carbone non marqué issu (1) des graines/cotylédons et (2) du CO_2 de la chambre dont le marquage est resté faible au début de l'expérience à cause de la faible consommation de CO_2 par les jeunes plants.

Quoi qu'il en soit, seules les feuilles de composition isotopique comprise entre $+16,3\text{‰}$ et $+35,3\text{‰}$ ont été sélectionnées pour la dégradation en sacs de litière. Des lots de 10 à 15 feuilles correspondant à environ un gramme de MO ont été constitués de façon à obtenir des variabilités isotopiques au sein d'un lot, similaires aux feuilles naturelles ($\sigma \leq 0,8\text{‰}$). Chaque lot de feuille a ensuite été placé dans un sac de litière puis mis à dégrader sur le sol d'une parcelle plantée de hêtres de la forêt expérimentale de Breuil-Chenuie (cf. section II.2.). En plus des feuilles marquées au ^{13}C , des feuilles sénescentes prélevées sur les arbres de la parcelle expérimentale (donc non marquées au ^{13}C) ont également été incubées comme référence, selon le même protocole que les feuilles marquées. Notons toutefois que les feuilles marquées et non marquées se sont développées dans des conditions différentes et présentent, de fait, des caractéristiques biochimiques légèrement différentes (e.g. C/N respectifs de 19,6 et 26,9 pour les feuilles marquées et non marquées). En conséquence, pour éviter les biais dus à ces différences de composition initiale, la discussion qui suit sera principalement basée sur la comparaison de tendances de dégradation (i.e. $\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{dégradé}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}}$). Des échantillons ont été prélevés après 5, 10, 15, 20, 30, 40, 52, 79, 129 et 207 semaines (4 ans) de dégradation. Pour chaque date, deux sacs de feuilles naturelles et deux

sacs de feuilles marquées ont été échantillonnés (les feuilles naturelles correspondent à celles de la section II.2). Les feuilles ont ensuite été rincées à l'eau distillée, séchées, pesées et observées à la loupe binoculaire avant d'être broyées pour analyse. La composition isotopique de leur MO totale a été déterminée par EA-IRMS, puis les lipides totaux ont été extraits aux solvants organiques (CH₂Cl₂/CH₃OH) avant d'être fractionnés sur colonne d'alumine afin d'isoler les *n*-alcanes dans la fraction apolaire éluée à l'heptane. Les alcanes ont ensuite été identifiés en GC-MS, quantifiés en GC-FID et leur composition isotopique déterminée par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse isotopique.

II.3.b. Caractéristiques globales de la dégradation

L'observation des feuilles à la loupe binoculaire a révélé la présence d'une microflore épiphyllée dès le stade initial : les feuilles sénescentes (Nguyen Tu et al., 2011). En effet, des fructifications fongiques (Fig. 29.a) et du mycélium (Fig. 29.b) ont été détectés sur plusieurs feuilles. Au fur et à mesure de la dégradation, divers symptômes de biodégradation apparaissent progressivement sur les feuilles. Après 5 semaines de décomposition sur le terrain, des traces de consommation des feuilles par la pédofaune sont mises en évidence : la cuticule inférieure de feuilles a souvent disparu entre les nervures tertiaires et quaternaires. La cuticule inférieure des

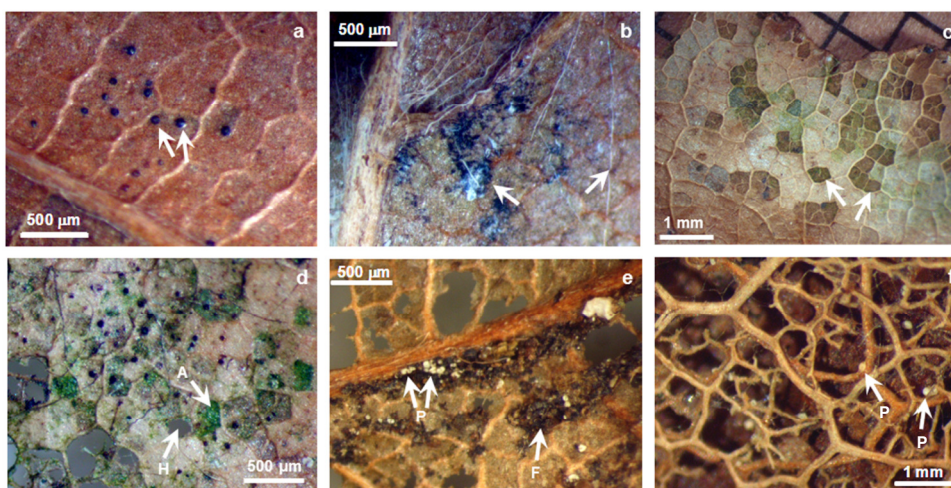


Figure 29. Caractéristiques morphologiques de la décomposition des feuilles de hêtre d'après observation à la loupe binoculaire. Champignons épiphytes sur les feuilles sénescentes : fructifications (a) et mycélium (b) ; traces d'herbivorie par la pédofaune après 1,5 an de dégradation (c) ; aspect des feuilles après 2,5 ans de dégradation : invasion par les champignons (d), les algues (d flèche A), fèces (e flèche F) et les grains de pollen (f et e flèche P).

feuilles est moins épaisse que la cuticule supérieure et les nervures. Ces traces d'herbivorie sont caractéristiques de la faune consommatrice de litière, notamment les enchytréides qui sont particulièrement abondants dans les moders (Ponge, 1999). Les marques d'herbivorie deviennent fréquentes après 10 semaines de

dégradation (Fig. 29.c). Après un an, la cuticule supérieure des feuilles montre également des traces de consommation par la pédofaune, conduisant à de grandes lacunes entre les nervures (Fig. 29.d (H) et e) voire à la disparition complète du limbe (Fig. 29.f). Après quatre ans de décomposition, le matériel végétal résiduel se résume à un réseau de fragments foliaires réduits aux nervures les moins fines (Fig. 29.f). Du matériel exogène s'accumule également sur les feuilles au cours de l'expérience :

- des champignons envahissent progressivement les surfaces foliaires (Fig. 29.d) ;
- sur les feuilles exposées à la lumière, des micro-algues colonisent les lacunes laissées par la consommation de la cuticule par la pédofaune (Fig. 29.d) ;
- du matériel fécal est déposé par la pédofaune (Fig. 29.e) ; et
- des grains de pollen de conifères, probablement issus des parcelles adjacentes, sont également déposés sur les feuilles (Fig. 29.e et f).

Les feuilles naturelles et marquées au ^{13}C présentent, à l'observation, les mêmes caractéristiques de dégradation.

Après quatre ans de décomposition sur le terrain, les feuilles ont perdu entre 50% et 90% de leur masse sèche initiale (Fig. 30.a). On retrouve la dynamique de dégradation décrite en section II.2, avec une dégradation plus intense pour les feuilles marquées au ^{13}C que pour les feuilles naturelles. La différence initiale de rapport C/N entre les deux types de feuilles est vraisemblablement responsable de la différence de vitesse de dégradation des deux litières les trois premières années (Melin, 1930; Taylor et al., 1989) et justifie de travailler principalement sur les tendances de dégradation (cf. section II.3.a). Néanmoins, les deux types de feuilles accusent finalement une perte en masse similaire à l'issue des quatre ans de l'expérience. Quel que soit le type de feuilles, ni la teneur en carbone ni le rapport C/N n'ont montré de tendance particulière au cours de la dégradation, avec des valeurs relativement stables respectivement centrées autour de $\sim 45\%$ et ~ 20 . Les feuilles marquées au ^{13}C contiennent proportionnellement plus de lipides que les feuilles naturelles ($\sim 16\%$ vs $\sim 11\%$), mais les lipides semblent s'y dégrader plus rapidement durant le premier mois de dégradation (Fig. 30.b). Là encore, la différence initiale de qualité des feuilles est probablement en cause, mais les deux types de feuilles suivent finalement la même dynamique de dégradation pour atteindre après 4 ans une perte en masse supérieure à 99%. Comme pour l'expérience précédente, une plus grande perte en masse des lipides par rapport aux feuilles totales montre que les lipides sont plus dégradés que les constituants non lipidiques des feuilles. La teneur des feuilles en alcanes décroît régulièrement à partir de la mise en place des sacs sur le terrain, sans phase initiale intense. A l'instar de l'alcane majoritaire (C_{27}), tous les homologues quantifiés sont réduits à moins de 2% de leur teneur initiale après 4 ans sur le terrain (Fig. 30.c).

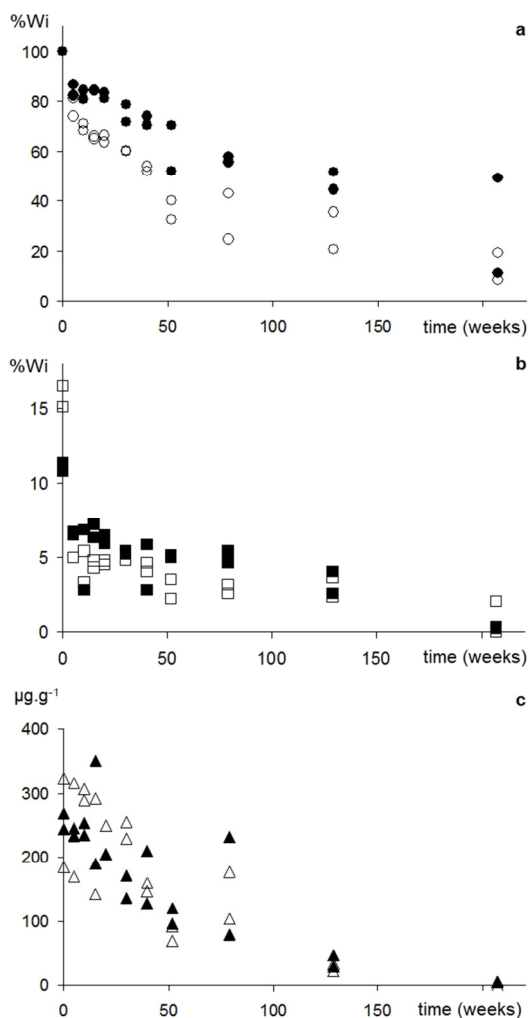


Figure 30. Changements des caractéristiques biogéochimiques globales des feuilles au cours du temps. Symboles pleins, feuilles naturelles ; symboles vides, feuilles marquées au ^{13}C ; a. Perte en masse (% masse initiale W_i) ; b. Teneur en lipides (% masse de feuilles récupérées W_i) ; c. Teneur en alcane C_{27} .

II.3.c. Caractéristiques isotopiques de la dégradation

A l'issue des 4 ans de dégradation, les feuilles totales non marquées se sont légèrement enrichies en ^{13}C ($+1,3\text{‰}$) alors que les feuilles marquées au ^{13}C ont montré un appauvrissement substantiel en ^{13}C (-12‰ , Fig. 31.a). En accord avec la littérature (Chikaraishi et al., 2004; Collister et al., 1994), les alcanes sont apparus appauvris en ^{13}C par rapport aux feuilles totales. La teneur en ^{13}C des alcanes montre les mêmes caractéristiques de dégradation que les feuilles totales. Par exemple, la teneur en ^{13}C de l'homologue en C_{27} (Fig. 31.b) augmente de $2,7\text{‰}$ dans les feuilles non marquées alors qu'elle diminue d'environ 20‰ dans les feuilles marquées au ^{13}C . A l'échelle de la

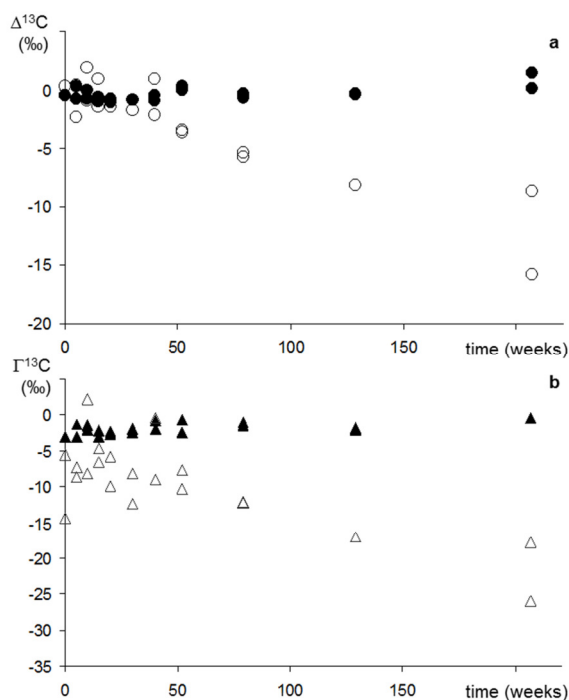


Figure 31. Changements de composition isotopique des feuilles au cours du temps. Symboles pleins, feuilles naturelles ; symboles vides, feuilles marquées au ^{13}C ; a. Teneur en ^{13}C des feuilles totales ($\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{dégradé}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}}$) ; b. Teneur en ^{13}C de l'alcane en C_{27} ($I^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_{27}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{feuilles totales non dégradées}}$)

feuille totale comme à l'échelle moléculaire, les précédentes études font généralement état d'augmentation du $\delta^{13}\text{C}$ ou de compositions isotopiques constantes durant la dégradation de MO (Balesdent et al., 1993; Connin et al., 2001). Ces études, portant sur du matériel non marqué, ont rapporté des augmentations du $\delta^{13}\text{C}$ de la MO allant jusqu'à +6‰. Quelques études suggèrent inversement une diminution du $\delta^{13}\text{C}$ avec la dégradation (Benner et al., 1987; Spiker & Hatcher, 1987). La diversité des tendances rapportées est probablement liée à la variété des environnements étudiés. Dans une expérience de dégradation avec des feuilles enrichies en ^{13}C (+160‰), un an de dégradation en litière a conduit à un appauvrissement en ^{13}C supérieur à 40‰ (Rubino et al., 2010).

Le comportement isotopique des feuilles étudiées au cours de la dégradation pourrait principalement s'expliquer par :

- Un fractionnement isotopique cinétique au cours du métabolisme des constituants foliaires par les microorganismes. Toutefois, un tel fractionnement devrait conduire aux mêmes tendances pour des mêmes feuilles dans un même environnement. Or, les feuilles marquées et non marquées présentent des tendances différentes, cette explication peut donc être écartée.
- Une dégradation préférentielle de constituants foliaires de composition isotopique différente de celle des feuilles totales. Les lipides ne comptent que pour 1 à 15% des constituants des feuilles étudiées (section II.3.b) et ils sont généralement appauvris en ^{13}C par rapport aux feuilles totales (Monson & Hayes, 1982; Park & Epstein, 1960). La dégradation préférentielle des lipides ne peut donc pas expliquer les tendances observées. Les carbohydrates sont enrichis en ^{13}C par rapport aux tissus végétaux totaux (jusqu'à 5‰ ; Ehleringer, 1991) et peuvent être préférentiellement dégradés par rapport aux autres constituants végétaux (Benner et al., 1987; Spiker & Hatcher, 1987). Dans la mesure où les feuilles marquées au ^{13}C se sont développées dans des conditions plus favorables que les feuilles non marquées, il est possible que leur teneur en carbohydrates soit supérieure à celles des feuilles naturelles. Par conséquent, une dégradation préférentielle des carbohydrates peut expliquer en partie les tendances observées. Néanmoins, l'appauvrissement des feuilles totales marquées atteint 12‰ après 4 ans de dégradation. Ce phénomène ne peut donc, à lui seul, expliquer les tendances observées, et d'autant moins pour les alcanes.
- Une contribution de matériel exogène de composition isotopique différente des feuilles étudiées. Une telle hypothèse est étayée par l'observation à la loupe binoculaire qui montre l'accumulation progressive de fèces, ainsi que l'invasion des feuilles par des algues et champignons au cours de la dégradation. Bien que la biomasse microbienne des sols soit généralement considérée comme dépourvue d'alcanes à longue chaîne, les champignons et les algues peuvent contenir des lipides à longue chaîne (Jones & Young, 1970 ; Rezanka & Sokolov, 1993 ; Volkman et al., 1998). La MO exogène susceptible de "contaminer" la MO foliaire au cours de la dégradation a vraisemblablement une composition isotopique similaire ou légèrement supérieure à celle des feuilles non marquées. En effet, la biomasse microbienne des sols est généralement enrichie en ^{13}C par rapport à la MO

totale des sols (Werth & Kuzyakov, 2010). Les champignons peuvent être légèrement enrichis ou appauvris en ^{13}C par rapport à leur substrat, selon les taxons et les substrats (Cowie et al., 2009; Gleixner et al., 1993; Hobbie et al., 2001). Les sporocarpes des champignons saprophytes du site expérimental sont appauvris en ^{13}C d'environ 4‰ par rapport à leur substrat (Zeller et al., 2007). Les lipides des micro-organismes hétérotrophes peuvent être enrichis ou appauvris en ^{13}C par rapport à leur biomasse totale (Teece et al., 1999 ; Abraham & Hesse, 2003; Cowie et al., 2009). La composition isotopique des fèces par rapport à l'alimentation varie selon les taxons pour les petits métazoaires (DeNiro & Epstein, 1978; Tamelander et al., 2006; Vidal et al., 2017) et les lipides de fèces de la pédofaune pourraient refléter la composition isotopique de leur alimentation comme montré sur les stérols de copépodes (Grice et al., 1998). En conclusion, la contribution exogène au matériel végétal original a vraisemblablement une composition isotopique similaire ou légèrement supérieure à celle des feuilles non marquées, ce qui expliquerait non seulement la légère tendance à l'enrichissement en ^{13}C des feuilles naturelles mais également, l'appauvrissement en ^{13}C des feuilles marquées.

II.3.d. Conclusions et implications

Une fois encore, le suivi des organismes dégradeurs (à la loupe binoculaire) au cours de l'expérience s'est révélé décisif quant à l'explication des tendances biogéochimiques observées. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence une contribution microbienne aux litières en décomposition, non seulement à l'échelle de la MO totale mais aussi, et surtout, à l'échelle des alcanes spécifiques. Des analyses isotopiques en cours suggèrent que les aldéhydes des feuilles de hêtre étudiées présentent le même comportement isotopique que les alcanes, au cours de la dégradation. L'ensemble de ces résultats permet d'expliquer les tendances isotopiques (δD et $\delta^{13}\text{C}$) observées pour les *n*-alcanes, les *n*-acides et les *n*-alcools de litières en décomposition (Chikaraishi & Naraoka, 2006 ; Zech et al., 2011). Ces résultats montrent donc, qu'en dépit de leur utilisation fréquente comme marqueurs de plantes terrestres, les lipides à longue chaîne incluent, au moins dans les sols, une composante microbienne non négligeable susceptible d'influencer leur composition isotopique spécifique. Si dans le cadre de cette expérience, la distribution des alcanes n'a pas été affectée par la dégradation, plusieurs études ont montré qu'elle pouvait l'être (Lajat et al., 1990 ; Meyers & Eadies, 1993 ; Bechtel et al., 2001 ; Nguyen Tu et al., 2003) et l'on peut encore évoquer une contribution microbienne pour expliquer le phénomène. Il semble donc que les lipides à longue chaîne ne constituent, ni par leur distribution ni par leur composition isotopique spécifique, des biomarqueurs totalement insensibles à la dégradation et à la diagenèse. Il serait donc préférable de baser les reconstitutions (paléo)environnementales sur les marqueurs plus spécifiques des plantes terrestres. La difficulté réside désormais dans le développement de biomarqueurs plus fiables, qui soient à la fois plus spécifiques des plantes terrestres, tout en étant présents dans un grand nombre de végétaux, et faciles à analyser ! Des analyses en cours (phytyl-esters, cétone isoprénique en C_{18}) et les travaux de Chikaraishi & Naraoka (2006 ; phytol) suggèrent que la composition isotopique des composés isopréniques acycliques pourrait être moins sensible à la dégradation que celle des lipides à chaîne non ramifiée. Il n'en reste pas moins que ces molécules ne se trouvent pas exclusivement dans les plantes terrestres, bien que souvent associées aux organismes photosynthétiques, puisque notamment dérivées de la chaîne phytyle de la chlorophylle.

III. Perspectives de recherche

Les résultats exposés précédemment témoignent de mon intérêt pour l'étude de la MO végétale actuelle et ancienne, non seulement car elle peut contribuer à reconstituer le passé, mais également car elle peut aider à mieux comprendre ses transformations à des échelles de temps variées. Les allers-retours réguliers entre sols et sédiments ne sont certes pas toujours évidents, mais ils permettent des mises en perspectives réciproques entre des transformations rapides de la MO se déroulant souvent en milieu oxygéné, et d'autres beaucoup plus lentes se produisant en conditions anoxiques le plus souvent. Malgré les différences entre sols et sédiments, la MO qui y est "préservée" présente des caractéristiques chimiques (association de molécules ou unités au potentiel de préservation varié) et des modes de préservation (préservation sélective, association avec des minéraux, encapsulation dans des macrostructures organiques ou minérales) communs. La comparaison de phénomènes actuels (environnements, climats, dégradation/préservation), récents (quelques centaines voire milliers d'années) ou très anciens (plusieurs millions voire milliards d'année) peut en outre aider à mieux comprendre comment sont modulées, en fonction de l'échelle de temps, les réponses de l'environnement et des êtres vivants, à un stress donné. Mieux caractériser la MO ancienne et ses modes de dégradation/préservation peut, par exemple, contribuer à prédire la réponse à long terme des sols au changement climatique actuel. Les projets de recherche développés ci-après visent donc à apporter des éléments de réponse à ces problématiques plus générales. Outre la poursuite de travaux engagés sur de la MO ancienne, mes perspectives de recherches incluent l'amélioration et le développement d'outils de reconstitution du passé, ainsi que des projets sur l'influence des éléments minéraux et des êtres vivants sur le devenir de la matière organique dans les sols (et les sédiments).

III.1. Poursuite des travaux engagés

III.1.a. Contributions de la biogéochimie aux reconstructions anciennes

Si mes travaux sur les fossiles se sont focalisés jusqu'à récemment sur les végétaux, la caractérisation biogéochimique des animaux fossiles n'en demeure pas moins excitante, surtout quand il s'agit de fossiles à la préservation morphologique exceptionnelle et/ou de taxons clef pour comprendre l'évolution des grands phyla actuels. Une collaboration avec des collègues de l'université de Namur (J. Yans, thèse A. Cincotta) m'a permis de travailler sur un fossile de dinosaure à plumes du Jurassique de Chine, *Anchiornis huxleyi* (Fig. 32.A). Outre les objectifs taphonomiques visant à évaluer l'état de préservation chimique associé à l'excellente préservation morphologique du spécimen, ces travaux s'inscrivent dans le champ plus vaste d'étude de l'origine du vol chez les oiseaux actuels. Des caractérisations chimiques de plumes fossiles, du sédiment encaissant et de plumes

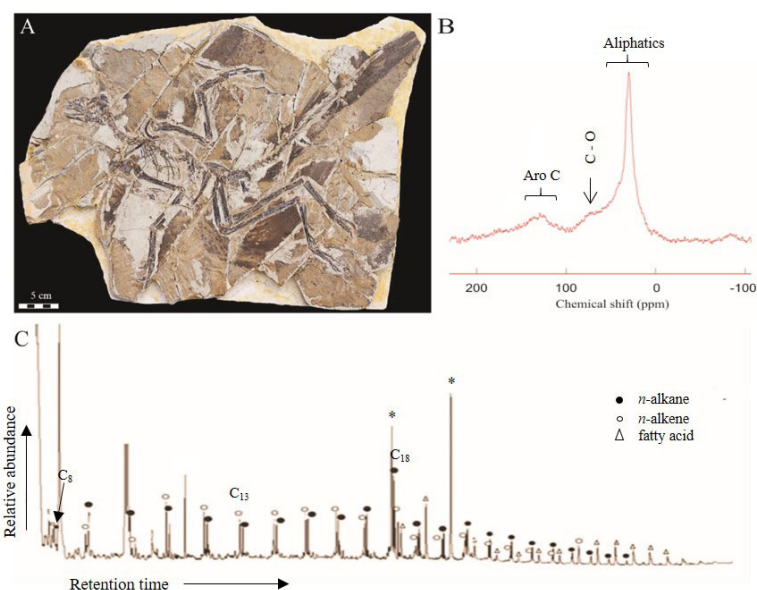


Figure 32. Etude de la MO d'un dinosaure à plumes. A. Vue d'ensemble du fossile avec des restes de plumes préservées autour du squelette, B. Spectre RMN et C. Pyrochromatogramme à 650°C des plumes fossiles.

actuelles ont donc été entreprises par résonance magnétique nucléaire (^{13}C -CP/MAS-NMR) et pyrolyse couplée à la GC-MS (TMAH Py-GC-MS) afin de tester la présence de molécules originelles du fossile voire de constituants caractéristiques de plume. Les premières analyses suggèrent que la MO des plumes fossiles a subi des transformations diagenétiques sévères avec un spectre NMR ne montrant que des fonctions aliphatiques, aromatiques et de type C-O (Fig. 30.B) et un pyrochromatogramme dominé par des doublets alcanes/alcènes et des acides à longue chaîne (Fig. 30.C). Le pyrochromatogramme du fossile présente également deux composés abondants qui ne sont pas présents dans le sédiment encaissant. La structure moléculaire de ces composés reste à

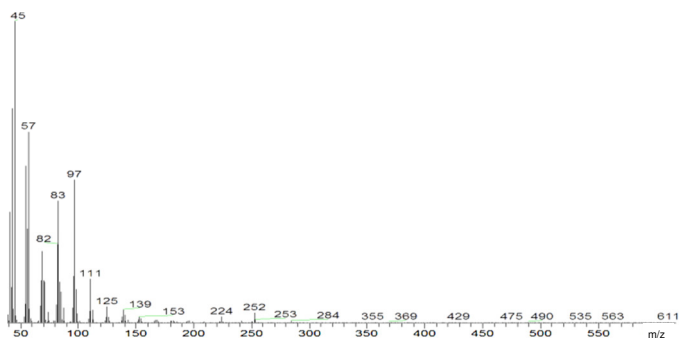


Figure 33. Spectre de masse d'un des composés non identifiés des plumes fossiles

identifier, mais leur spectre de masse suggère une partie aliphatique en C_{17} (Fig. 33). De plus, la distribution des doublets alcanes/alcènes et des acides semble différente entre le fossile et le sédiment encaissant. Ces résultats doivent être complétés, plusieurs spectres de masse restent notamment à élucider, mais ils pourraient indiquer une polymérisation de constituants originels des plumes du dinosaure (Gupta et al., 2007 ; Manning et al., 2009).

Outre les reconstitutions paléobiologiques de spécimens remontant à plusieurs millions voire millions d'années, l'étude de la MO ancienne peut également aider à documenter les activités humaines passées. Grâce à une collaboration avec des archéologues de l'INRAP (C. Cammas, J. Rodrigue & R. Clotuche), je me suis intéressée au tannage à l'époque gallo-romaine. Dans cette étude pluridisciplinaire (archéozoologie, géoarchéologie, micromorphologie), l'analyse des biomarqueurs lipidiques extraits des sédiments contenus dans d'anciennes fosses de tannage visait notamment à préciser la nature des matériaux utilisés pour le traitement des peaux. Les lipides d'une fosse de tannage avérée, d'époque médiévale à moderne (Saint-Denis, 93), ont permis de définir une signature moléculaire de référence pour le tannage : un mélange complexe de biomarqueurs animaux et végétaux. Tandis que les biomarqueurs végétaux (lipides à longue chaîne, phytostérols, triterpènes pentacycliques) pourraient témoigner de l'utilisation de végétaux (notamment de chêne) pour l'épilage et le tannage des peaux, les biomarqueurs animaux (stérols principalement) suggèreraient l'utilisation de déjections d'animaux herbivores lors des étapes de déchaulage. Une fosse énigmatique du quartier des bouchers de la ville gallo-romaine de Famars (59, Fig. 34.a) a livré un contenu en biomarqueurs lipidiques proche de celui de Saint-Denis, confirmant qu'elle pouvait avoir servi à des activités de tannerie, comme le proposent les archéologues. On note à Famars, la présence de molécules inhabituelles, dont la structure doit encore être élucidée, mais dont le spectre de masse (Fig. 34.b) pourrait indiquer un squelette de type (méthoxy)serratène. Dans la mesure où de telles molécules sont caractéristiques des pinacées (Le Milbeau et al., 2013), la confirmation de cette identification pourrait indiquer l'utilisation originale de conifères pour le tannage à l'époque

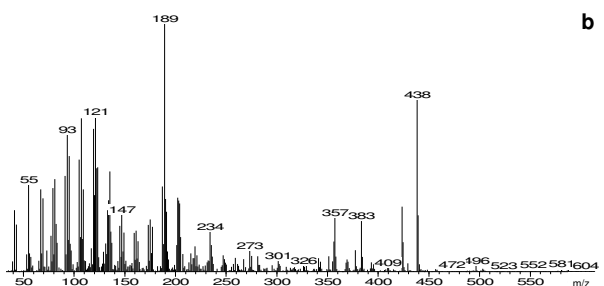


Figure 34. Fosse étudiée sur le site gallo-romain de Famars (a) et spectre de masse de la molécule non identifiée (b)

gallo-romaine dans le Nord. Là encore, cette étude doit être complétée, notamment par l'identification de composés encore indéterminés. L'étude des biomarqueurs de fosses de tannage actuelles, utilisant encore des protocoles basés exclusivement sur des produits naturels (e.g. Soudan) pourrait également permettre de tester la possibilité de distinguer les sédiments/fosses associé(e)s aux différentes étapes du traitement des peaux (épilage, déchaufrage, tannage sensu stricto, etc.).

III.1.b. Optimisation d'outils biogéochimiques de reconstitutions anciennes

Les reconstitutions paléoenvironnementales basées sur des approches biogéochimiques sont d'autant plus précises que les outils utilisés sont correctement calibrés, que les effets de la diagenèse sur les proxys sont bien contraints et que la variabilité de ces proxys est bien documentée.

La paléoclimatologie isotopique à partir des cernes de charbons de bois archéologiques constitue une approche prometteuse, mais elle est basée sur l'hypothèse d'une absence d'effet significatif du feu sur la composition isotopique du bois. Cette assertion est basée (1) sur quelques expériences montrant un effet inférieur à 1‰, surtout pour des températures de combustion inférieures à 400°C, et (2) sur l'hypothèse que ces charbons sont issus de foyers de température modérée (Ferrio et al., 2006 ; Ascough et al., 2008). Pourtant, les paramètres Raman obtenus sur les charbons du site de Chalain montrent qu'ils ont vraisemblablement subi des températures supérieures à 600°C, bien qu'ils semblent avoir conservé un signal paléoclimatique valide (Baton et al. accepté). De plus, la plupart des expériences de carbonisation visant à documenter les effets du feu sur le $\delta^{13}\text{C}$ du bois ont été effectuées dans des fours fermés avec des apports en oxygène limités voire nuls, c'est-à-dire dans des conditions assez peu représentatives des foyers archéologiques. Une compilation minutieuse de la littérature sur le sujet montre en outre que la carbonisation peut en fait conduire à des effets très variables allant de -2,5‰ à +0,5‰ (Leavitt et al., 1982 ; Turekian et al., 1998 ; Turney et al., 2006 ; Hall et al., 2008). Un suivi du $\delta^{13}\text{C}$ du bois lors de carbonisations en foyer oxygéné instrumenté a donc été entrepris dans le cadre de la thèse de F. Baton pour mieux contraindre les effets du feu sur la composition isotopique du bois dans des conditions les plus représentatives possibles des foyers archéologiques (Fig. 35.a).

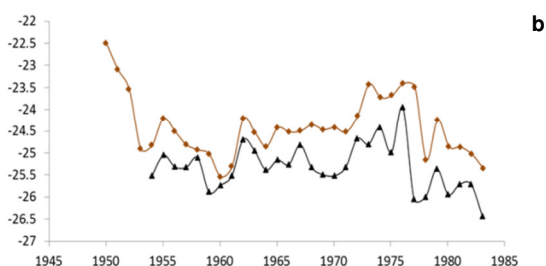


Figure 35. Foyer expérimental instrumenté (a) et $\delta^{13}\text{C}$ des cernes d'une rondelle avant (◆) et après (▲) 10 min. de carbonisation à 680 °C (b)

Les premiers résultats montrent, là encore, une forte variabilité de l'effet du feu sur le $\delta^{13}\text{C}$ du bois, même pour des conditions générales de combustion identiques (température, oxygénation, durée), et au sein d'un seul et même morceau de bois (Fig. 35.b). Ces résultats sont à compléter, notamment par l'analyse isotopique de charbons issus d'autres carbonisations expérimentales réalisées à des températures différentes et sur des durées différentes. La caractérisation de ces charbons expérimentaux par microspectrométrie Raman a également été entreprise afin de mettre au point un outil diagnostique de la validité du signal isotopique des charbons. Des études statistiques sur les charbons issus des foyers expérimentaux sont également envisagées afin de tester la représentativité climatique des charbons obtenus, et d'établir les

critères d'échantillonnage optimaux pour effectuer des reconstitutions paléoclimatiques fiables. Le développement de la dendroclimatologie isotopique sur charbons de bois requiert également une meilleure calibration dans l'actuel des proxies utilisés, notamment de la différence des compositions isotopiques du bois initial et du bois final d'un cerne donné. Une telle calibration devra passer par l'étude de plusieurs spécimens d'une espèce donnée qui se sont développés le long de gradients climatiques.

La biogéochimie de sols anciens peut également aider à reconstituer les activités humaines passées. Par exemple, la présence de stérols fécaux sur des sites anglais de l'Age de Bronze a suggéré l'usage de fumier pour les cultures de cette époque (Bull et al., 1999). Par ailleurs, les teneurs en éléments majeurs (Ca, Mg, K, etc.) de sols forestiers sont dépendantes du mode de gestion de la forêt et du stade de développement forestier (taillis, gaulis, etc. ; Šrámek et al., 2016). L'utilisation de ces indicateurs dans un cadre rationnel passe par leur (inter)calibration pour des types d'occupation des sols représentatifs des pratiques anciennes. Le projet Löväng (dir. A. Dufraisse, AASPE, MNHN) vise ainsi à établir un référentiel de caractéristiques botaniques (dendrologie & palynologie), zoologiques (malacologie & entomologie) et biogéochimiques de modes d'occupation des sols dans les systèmes agroforestiers (mode d'exploitation des terres agricoles associant des plantations d'arbres dans des cultures ou des pâturages). Ce projet tire parti du site exceptionnel de la réserve de Linné-Råshult (Suède) où les pratiques d'exploitation et de gestion des espaces agricoles et forestiers caractéristiques des fermes du 18^{ème} siècle ont été mises en place il y a plus de 20 ans. Ainsi, on peut raisonnablement considérer que les caractéristiques écologiques associées aux différents modes de gestion de l'espace sont à présent stabilisées. En charge de la partie biogéochimie du projet Löväng, je m'attache à caractériser les teneurs en éléments majeurs (P, Ca, Na, Mg, K, N, C ; collaboration M. Rouelle & E. Aubry, METIS), en biomarqueurs lipidiques (stérols fécaux, triterpènes végétaux) et les compositions isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) des sols, afin de tenter de mettre en évidence des indicateurs d'émondage des arbres (mode de taille consistant à supprimer les branches latérales pour favoriser la croissance de rejets ou de feuillage afin de produire fourrage, bois et cordage) ainsi que de pâture et de fumure des sols. Des résultats préliminaires suggèrent que les teneurs en potassium et le $\delta^{13}\text{C}$ des sols pourraient aider à diagnostiquer des pratiques d'émondage des arbres, tandis que la teneur en phosphore, $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ pourraient constituer des indicateurs de fumure des sols (Fig. 36). L'analyse de répliquats est nécessaire pour confirmer ces résultats, et la caractérisation des biomarqueurs lipidiques des sols pourrait permettre de mettre en évidence des marqueurs supplémentaires des modes de gestions de ces espaces agroforestiers.

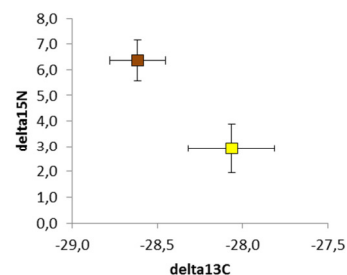


Figure 36. Teneurs en isotopes stables du carbone et de l'azote des sols "fumés" (■) ou non (■)

III.1.c. Devenir de la MO végétale dans l'environnement

Les transformations de la MO (végétale) dans l'environnement sont modulées par de nombreux paramètres biotiques et abiotiques. Concernant le lien entre devenir du carbone organique et éléments minéraux, je me suis engagée dans deux projets visant à documenter les interactions de la MO végétale avec deux éléments : le brome (collaboration A. Murat, U. Caen) et le radium (collaboration S. Rhis, U. Strasbourg). Ces deux projets partent du constat que le cycle de ces deux éléments semble étroitement lié au cycle de la MO. La quantité de brome dans les sédiments de surface estuariens est proportionnelle à leur teneur en MO (Murat et al., 2013). Le radium 226 est présent en excès dans les horizons de surface des sols où il semble particulièrement

abondant dans la fraction organique, probablement du fait d'un effet "concentrateur" de la végétation (Greeman et al., 1999). Des analyses de sédiments estuariens et de leurs sources potentielles de MO d'une part, et de sols et litières végétales sus-jacentes d'autre part, ont donc été entreprises dans le but d'identifier les fractions chimiques, voire les molécules, associées respectivement au brome et au radium. Ces projets ne sont pas encore suffisamment avancés pour pouvoir en présenter des ébauches de résultats. La principale difficulté de ces projets à l'interface entre géochimie organique et géochimie minérale réside dans la mise au point de protocoles de prélèvement et de préparation des échantillons qui permettent à la fois la quantification des éléments minéraux et la caractérisation de la MO, sur des mêmes sous-échantillons/fractions. Concernant l'influence des facteurs biotiques sur le devenir de la MO végétale dans l'environnement, j'ai focalisé dans un premier temps mon attention sur la macrofaune du sol.

Si la microflore et la microfaune du sol constituent, en masse, les plus importants agents biologiques de la transformation de la MO, la macrofaune peut également y jouer un rôle fondamental. C'est notamment le cas des vers de terre, souvent qualifiés d'ingénieurs du sol, pour leurs multiples effets en favorisant la fertilité (aération, structuration, transport horizontal et vertical d'éléments organiques et minéraux, etc.). Le projet *Suivi de l'incorporation de la MO dans les agrégats biogéniques* (dir. K. Quénéa, METIS) visait notamment à mieux comprendre l'effet des vers de terre sur le devenir de la MO végétale dans les sols. Pour ce faire, le devenir de résidus végétaux marqués au ^{13}C a été suivi pendant un an dans des mésocosmes avec ou sans vers de terre. Les mésocosmes contenaient soit des résidus de tige soit des résidus de racine afin d'étudier également l'effet de la qualité/composition chimique de la MO initiale sur son devenir, en présence de vers de terre. Cette expérience a montré que les vers accélèrent la décomposition de la MO végétale prise dans son ensemble ("bulk"), et qu'ils étaient capables de consommer les tiges comme les racines, mais que les tiges étaient dégradées plus vite que les racines, au moins pendant les premiers mois de l'expérimentation (Vidal et al. 2017). Dans ce projet, j'étais principalement en charge du suivi de la composition isotopique de lipides spécifiques (collaboration M. Mendez-Millan, ALYSES). L'analyse isotopique des *n*-alcanes individuels après un an d'expérimentation a montré que l'incorporation dans le sol, des alcanes issus des végétaux marqués, variait selon les mésocosmes, voire selon les homologues (Fig. 37). Le calcul du pourcentage de carbone dérivé de la litière marquée suggère que dans les mésocosmes sans vers de terre (\square), les alcanes issus des racines sont incorporés dans le sol en proportions similaires à celles de la MO racinaire totale ("bulk") tandis

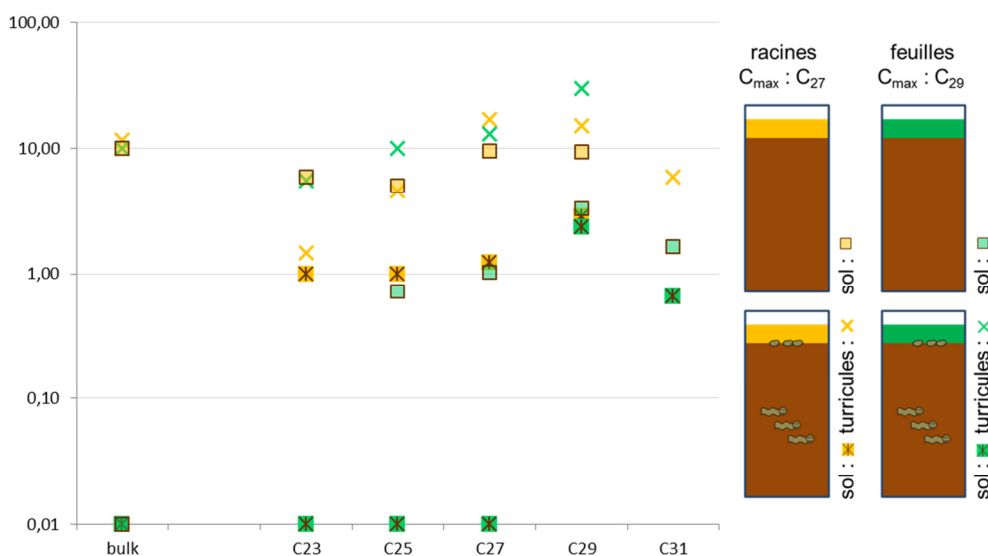


Figure 37. Pourcentage de carbone dérivé de la litière marquée (C_{mar}) pour la MO totale (bulk) et les principaux alcanes extraits du sol et des turricules.

$$C_{mar}(\%) = [(\delta^{13}\text{C}_{\text{échantillon}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{contrôle}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{litière}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{contrôle}})] \times 100$$

que ceux issus des feuilles sont plus incorporés/mieux préservés que ceux de la MO aérienne totale. Le taux d'incorporation/préservation des alcanes dans les turricules (x ; déjections des vers de terre) est comparable à celui de la MO totale, et ce, quel que soit le type de résidu végétal (tige ou racine). Dans le sol des mésocosmes avec racines (■), les vers de

terre semblent favoriser l'incorporation/préservation des alcanes par rapport à la MO totale, et ce, quel que soit l'homologue analysé (Fig. 37). Dans le sol des mésocosmes avec tiges (■), le devenir des alcanes varie selon leur longueur de chaîne : les vers de terre semblent favoriser la dégradation des alcanes en C₂₃, C₂₅ et C₂₇ par rapport à la MO totale, alors qu'ils n'ont aucun effet sur le devenir des alcanes en C₂₉ et C₃₁ par rapport à la MO totale (Fig. 37).

On retrouve donc à l'échelle des alcanes ce qui avait déjà été mis en évidence à l'échelle de la MO totale : les tiges sont dégradées plus rapidement que les racines. L'influence des vers de terre sur le devenir des alcanes, par rapport à la MO totale, semble également varier selon le type de litière étudiée (voire la longueur de chaîne des molécules). Cette étude apporte donc une preuve supplémentaire que la qualité des résidus végétaux dans les sols influence le devenir de la MO, au moins durant les premiers stades de leur dégradation/incorporation. En accord avec la littérature, les alcanes semblent donc mieux préservés que la MO totale dans le sol des mésocosmes (i) avec feuilles et sans vers, et (ii) avec racines et vers pour tous les homologues, ainsi qu' (iii) avec feuilles et vers pour les homologues en C₂₉ et C₃₁. La préservation similaire des alcanes et de la MO totale pourrait être due à (i) la faible concentration en alcanes des racines, dans le sol des mésocosmes avec racines et sans vers, et à (ii) une meilleure protection de la MO totale dans les turricules des mésocosmes avec feuilles ou avec racines, qui confère de facto une meilleure protection aux alcanes. Alors que l'on justifie souvent l'utilisation des alcanes comme proxy paléoenvironnemental, par leur relative résistance à la dégradation (comparativement à la MO totale), ce principe est donc bien à manipuler avec précaution. L'interprétation de la composition isotopique des alcanes individuels de cette expérience nécessite encore d'être approfondie avant de pouvoir être publiée mais elle pourrait confirmer que si la nature chimique des constituants moléculaires de la MO des sols joue un rôle sur leur devenir, celui-ci dépend également de facteurs biotiques tels que la présence de macrofaune.

III.2. Nouveau projet à engager :

Rôle des champignons sur les transformations de la MO végétale (dans les sols)

La mise en évidence (i) de l'activité lignolytique de champignons fossiles sur les rameaux de la coniférale crétacée *Frenelopsis alata* (Nguyen Tu et al., 2000), (ii) du rôle prépondérant des champignons dès les premiers stades de la dégradation du bois de *Sciadopitys verticillata* en milieu aquatique (Tramoy et al., 2017) et (iii) de contributions fongiques aux alcanes de feuilles de *Fagus sylvatica* se dégradant dans une litière forestière (Nguyen Tu et al., 2011), a piqué ma curiosité, et me conduisent à orienter une partie de mon travail de recherche sur le rôle des champignons dans la transformation de la MO végétale. Ce nouvel axe de recherche passera par la caractérisation de champignons et de plantes fossiles préservés en connexion dans des gisements fossilifères d'excellente préservation morphologique (e.g. flore dévonienne de Rhynie, collaboration F. Delarue, IMPMC, MNHN), mais aussi et surtout par la mise en place de nouvelles expériences de dégradation. Ce dernier projet est détaillé ci-après, dans le format de réponse à l'appel d'offre EC2CO de l'INSU, auquel il sera soumis à l'automne prochain.

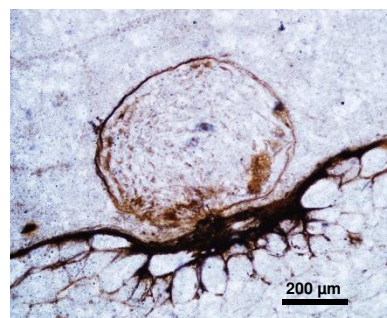


Figure 38. Structure énigmatique ancrée sur l'épiderme de la plante dévonienne *Rhynia gwynne-vaughanii*. Coupe transversale observée au microscope photonique.

III.2.a. Etat de l'art et contexte du projet de recherche

La matière organique (MO) est un élément déterminant du cycle biogéochimique du carbone. Alors que sa minéralisation conduit à la libération de CO₂ dans l'atmosphère, sa stabilisation dans les sols peut contribuer à la séquestration de carbone à long terme et donc à la réduction du taux de CO₂ atmosphérique (Jobbágy & Jackson, 2000 ; Walthall et al., 2012). Deux grands processus sont généralement évoqués pour expliquer la persistance/préservation de matière organique ancienne dans les sols :

- la récalcitrance chimique intrinsèque : du fait de leurs propriétés certaines molécules (dites plus labiles, par exemple riches en fonctions azotées ou oxygénées) sont préférentiellement consommées par les microorganismes dégradeurs alors que d'autres (aliphatiques, aromatiques) sont sélectivement préservées, car plus difficile à dégrader (Alexander, 1981).

- la protection physique de la MO : via des interactions organo-minérales (adsorption sur des argiles, des oxydes ou encore des oxyhydroxydes de fer ou d'aluminium) ou des inclusions dans la structure du sol (occlusion dans des micro- ou macro-agrégats, encapsulation dans des macromolécules), la MO devient inaccessible aux microorganismes dégradeurs (Oades, 1984 ; Six et al., 2000).

Toutefois, ces deux paradigmes ont été mis à mal ces dernières années. La mise en évidence de molécules considérées comme labiles (carbohydrates, peptides, etc.) dans des fractions stables de MO a montré que la récalcitrance chimique seule ne pouvait expliquer la séquestration de MO stable dans les sols (Amelung et al., 2008 ; Grandy & Neff, 2008 ; Marschner et al., 2008 ; Kleber, 2010). De même, des expériences de terrain sur le long terme, des incubations au laboratoire ou des méta-analyses de données agronomiques ont montré que la structure des sols ne contrôlait pas systématiquement la décomposition/stabilisation de la MO (Juarez et al., 2013 ; Dimassi et al., 2014 ; Ugarte et al., 2014). Car, ces caractéristiques/processus pris séparément ne peuvent expliquer seuls la présence de MO stable dans les sols. Il n'en reste pas moins que pour un environnement/une station donné(e), caractéristique chimique de la MO/qualité de la litière (C/N, teneur en lignine ; Sanderman & Amundson, 2005 ; Vidal et al., 2017) et nature des minéraux pouvant former des associations organo-minérales (Martin et al., 1982 ; Singh et al., 2016) jouent un rôle avéré sur la dégradation de la MO. Mais, ces processus jouent de concert : une MO plus labile se stabilise mieux en association avec les minéraux (Hatton et al., 2015). Les recherches actuelles visent donc non seulement à réconcilier/intégrer ces concepts mais également à mieux prendre en compte les paramètres environnementaux, abiotiques et surtout biotiques, qui président à la transformation de la MO dans les sols (Schmidt et al., 2011 ; Castellano et al., 2015).

Les végétaux constituent la source clef de MO dans les sols et y sont souvent considérés comme la « pompe de contrôle » du cycle du carbone (Kögel-Knabner, 2002 ; Paul, 2016). Si, dès 1925, Waksman affirmait qu'une partie de la MO des sols était d'origine microbienne, il est désormais établi que la part la plus importante de la MO persistant dans les sols provient des microorganismes (composés à 90% de bactéries et champignons), qu'elle soit elle-même issue du métabolisme de MO végétale ou microbienne (Schaeffer et al., 2015 ; Kögel-Knabner, 2017). En d'autres termes, si le carbone des sols dérive originellement de matière organique végétale, une grande partie transite par les micro-organismes qui le transforment. Non seulement les microorganismes contribuent pondéralement à la MO des sols par leur biomasse morte (nécromasse, enveloppes et lysats cellulaires ; Miltner et al., 2012) ou vivante, mais ils jouent également un rôle majeur sur sa transformation (dégradation de MO pré-existante par consommation hétérotrophe, synthèse de biomolécules microbiennes, formation de structures supramoléculaires par liaisons faibles, etc. ; Piccolo, 2002). Une grande proportion de la MO stable des sols correspond en fait à un mélange complexe de biopolymères végétaux et microbiens ainsi que de leurs produits de

dégradation, et n'appartient à aucune catégorie chimique distincte (Nelson & Baldock, 2005 ; Kelleher & Simpson, 2006). De plus, la répartition spatiale de ces différents types de MO jouent également un rôle sur leur capacité à former des associations organo-minérales susceptibles de les stabiliser. Par exemple, l'adsorption de MO microbienne (issue du métabolisme de MO végétale) sur les surfaces minérales, se fait en patches qui peuvent ensuite servir de substrat à une nouvelle génération de micro-organismes (e.g. Miltner et al., 2012 ; Rumpel et al., 2015). Toutefois, la structure moléculaire de ces résidus microbiens ainsi que les processus de synthèse et transformation de ces composés par les activités fongiques et bactériennes requièrent encore une étude approfondie (Schnitzer & Monreal, 2011 ; Kögel-Knabner, 2017), notamment à la lumière des avancées conceptuelles de ces dernières années sur la multiplicité des facteurs jouant sur la stabilisation de la MO.

III.2.b. Objectif général et questions de recherche traitées

Ce projet vise donc à mieux comprendre le rôle des micro-organismes sur la transformation de la MO végétale et la synthèse de MO dans les sols en général. Ce projet est focalisé sur **l'action des champignons sur la MO du sol** pour les raisons suivantes :

- Les champignons sont les principaux organismes capables de métaboliser efficacement la lignine (Dashtban et al., 2010 ; Cragg et al., 2015;) qui a longtemps été considérée comme un des constituants végétaux les plus stables.
- Les champignons jouent un rôle important sur le transport latéral de l'eau et de substances organiques et minérales dans les sols (Ritz, 2006).
- Les sols où les champignons dominent les communautés microbiennes seraient plus favorables à la stabilisation de MO que ceux où les bactéries sont dominantes (Six et al., 2006), du fait de :
 - . constituants fongiques plus résistants à la dégradation que les constituants bactériens (Martin & Haider, 1969),
 - . débris fongiques mieux protégés de la décomposition par les interactions organo-minérales que débris bactériens (Simpson et al., 2004),
 - . meilleure efficacité d'utilisation de la MO par les champignons que par les bactéries (partition du carbone assimilé entre le CO₂ respiré et le carbone biosynthétisé ; Six et al., 2006)
- L'importance des champignons dans les communautés microbiennes du sol pourrait augmenter significativement en réponse au réchauffement climatique (Feng et al., 2008).

Dans les années 60-70, les travaux de Martin et Haider en laboratoire sur des composés modèles, ont montré que les champignons pouvaient (1) transformer des constituants aromatiques en composés aliphatiques via "rupture du noyau benzénique" et, (2) synthétiser des hétéropolymères de structure proche de la MO stable des sols (Haider & Martin, 1967, 1970, 1975; Martin & Haider, 1969). Si plusieurs voies de transformation de phénols représentatifs des briques élémentaires de la lignine ont été élucidées, les mécanismes de transformation conjointe des molécules complexes composant la MO restent à préciser, notamment en contexte naturel (Schaeffer et al., 2015).

Pourtant, la contribution des champignons à la MO des sols a été quasiment négligée depuis les travaux de Martin et Haider. Afin de mieux comprendre **le rôle des champignons sur la transformation de la MO végétale et son intégration à la MO du sol, en tenant compte des propriétés chimiques de ses différents constituants**, ce projet vise à déterminer quelles molécules végétales sources sont utilisées par les champignons pour synthétiser quels constituants fongiques ? Il s'agira notamment d'évaluer la part de molécules considérées plus labiles, telles que

les sucres, et la part de molécules considérées comme plus résistantes à la dégradation, telle que la lignine ou les lipides, dans la biosynthèse de constituants fongiques. Dans un effort de mieux intégrer facteurs microbiologiques, chimiques et physiques contrôlant le devenir de la MO dans les sols, ce projet inclut également un volet microscopique exploratoire/secondaire. **Outre la répartition du carbone d'origine végétale dans les différents compartiments chimiques de la MO fongique, ce projet, s'intéresse donc à suivre sa (re)localisation spatiale dans le sol et les champignons.** Il s'agira notamment de suivre le carbone d'origine végétale à l'extérieur des cellules fongiques (en association avec des débris végétaux, fongiques ou des particules minérales), à l'intérieur des cellules, dans les parois, dans les hyphes végétatives ou encore dans les structures reproductrices. En effet, les études microscopiques de la MO des sols montrent l'importance de la co-localisation des constituants organiques et minéraux des sols, sur leurs (multiples) interactions. L'importance de l'étude conjointe de la composition chimique de la MO et de sa localisation à l'échelle micro- voire nano-métrique a été donc soulignée comme perspective indispensable à une meilleure compréhension de son devenir dans les sols, dans la plupart des essais sur le sujet (Schmidt et al., 2011 ; Schaeffer et al., 2015).

Pour répondre à ces questions, ce projet est basé sur le suivi microscopique, moléculaire et isotopique (à l'échelle de la MO totale, de fractions chimiques isolées et de molécules spécifiques) de microcosmes de sol minéral et de MO végétale incubés en présence exclusive de champignons. La MO végétale aura préalablement fait l'objet d'un marquage différentiel au ^{13}C afin de marquer différemment les molécules souvent considérées comme labiles (e.g. sucres métaboliques) et les molécules considérées plus stables (e.g. ligno-cellulose).

III.2.c. Caractère innovant et prise de risque

L'originalité de l'approche proposée réside dans la combinaison d'un **marquage différentiel au ^{13}C** des végétaux qui seront mis à incuber et d'un **suivi à l'échelle moléculaire** du carbone marqué. Ceci permettra de distinguer les grandes familles moléculaires constitutives des végétaux tout en étudiant **le devenir de débris organiques** pris dans leur totalité. Il est en effet indispensable de suivre des échantillons les plus représentatifs possibles des échantillons naturels dans la mesure où il est établi que les molécules modèles sont métabolisées plus vite que la MO totale (e.g. Haider & Martin, 1981), vraisemblablement car ces molécules modèles sont souvent mises à incuber seules, qu'elles constituent donc la source exclusive de carbone pour les micro-organismes et ne peuvent « interagir » avec d'autres molécules constitutives de la MO.

En (éco-)physiologie végétale, le marquage par pulse de $^{13}\text{CO}_2$ des composés dits labiles, tels que les carbohydrates métaboliques, a été beaucoup utilisé pour suivre in situ l'allocation du carbone dans les différents organes végétaux (Nogués et al., 2006 ; Endrulat et al., 2010), voire leur transfert dans la rhizosphère ou à la pédofaune (e.g. Leake et al., 2006 ; Horowitz et al., 2009). En sciences du sol, c'est généralement un marquage au ^{13}C de l'intégralité de la MO végétale mise à dégrader qui est utilisé (Angers et al., 1997 ; Moore-Kucera & Dick, 2008 ; Nguyen Tu et al., 2011 ; Vidal et al., 2017). Le marquage spécifique des carbohydrates métaboliques des végétaux pour suivre ce réservoir de carbone labile dans les sols est décrit depuis quelques années (Girardin et al., 2009). Pourtant, le marquage différentiel des constituants labiles et structuraux des végétaux n'a que rarement été utilisé dans des expériences de dégradation (sacs de litière), et jamais pour un suivi à l'échelle moléculaire (Fahey et al., 2011 ; Haddix et al., 2016). Outre le CO_2 respiré, seules quelques familles de molécules ont fait l'objet de suivis au cours de l'incubation de débris végétaux intégralement marqués au ^{13}C : *n*-alcanes (Nguyen Tu et al., 2011), sucres aminés (Griepentrog et al., 2014), acides nucléiques (Bernard et al., 2007) et surtout les acides gras des phospholipides

(PLFA) qui permettent la distinction des principaux phyla microbiens (Treonis et al., 2004 ; Moore-Kucera & Dick, 2008 ; Churchland et al., 2012).

L'incubation de MO intégralement marquée au ^{13}C par des communautés microbiennes mixtes est devenue assez courante dans les études sur le devenir de la MO (Blaud et al., 2012 ; Steffens et al., 2015 ; Jiang et al., 2016). Mais ces études, ne permettent pas la **caractérisation du rôle spécifique des champignons** qui sont pourtant parmi les principaux organismes capables de dégrader la lignine. L'incubation par des champignons de débris végétaux, d'une part (Vane et al., 2001 ; Robertson et al., 2008), ou de molécules modèles marquées (au ^{13}C ou au ^{14}C) ou non d'autre part (Haider & Martin, 1981; Kim & Rhee, 2003), a déjà été réalisé en laboratoire, mais le suivi de débris végétaux marqués au ^{13}C et de leur intégration dans la MO fongique n'a pas encore été entrepris à notre connaissance, et certainement pas avec de la MO marquée différemment au ^{13}C .

Enfin, si la **combinaison d'approches analytiques (chimiques et microscopiques)** envisagée pour suivre le devenir de la MO au cours des incubations commence à se généraliser, elle sera appliquée pour la première fois à ce type de matière organique marquée différemment et à l'étude du rôle des champignons sur le devenir de la MO.

Les risques associés à ce projet sont liés (1) à l'expérimentation avec du matériel biologique, (2) au nécessaire développement de nouveaux protocoles de préparation et de caractérisation des échantillons. La gestion/maîtrise de ces risques est résumée dans le tableau 2

Tableau 2. Principaux risques associés au projet proposé.

étape		gestion des risques principaux		autres risques				
biologique	culture végétaux en serre marquage au ^{13}C différentiel	déjà effectuée par plusieurs membres équipe	Nguyen Tu et al. 2011, 2013 Girardin et al. 2009					
	culture champignons sur litière végétale transfert ^{13}C à la MO fongique	déjà largement réussie et documentée	Vane et al. 2001, Robertson et al. 2008 Churchland et al. 2012 Griepentrog et al. 2014	pas de fructification des champignons ⇒ abandon de ce volet				
analytique	activité enzymatique		documentée et déjà réalisée par membre équipe (Collin & Cochet, 2013)					
	analyse isotopique de molécules individuelles	lipides apolaires	analyse GC-C-IRMS déjà effectuée Nguyen Tu et al. 2004b, 2011		trop cher & chronophage ⇒ sélection d'échantillons et de pas de temps clefs			
		lipides polaires	développement protocole séparation par chromatographie préparative & analyse IRMS pour éviter biais de dérivation				échec développement ⇒ GC-C-IRMS sur molé- cules dérivées ou IRMS sur fractions totales	
		sucre labiles						
		constituants structuraux						
observations μ scopiques identification « μ morphes »		déjà effectué à la loupe binoculaire et au MEB Nguyen Tu et al. 2011						
μ localisation & quantification marquage		MEB + (nano)SIMS déjà documenté	Sangély et al., 2005; Hatton et al. 2012	forte hétéro- généité marquage ⇒ Ø quantificat°				

III.2.d. Actions proposées, méthodologies et calendrier

Ce projet se décline en trois volets : (1) marquage différentiel de végétaux au ^{13}C , (2) incubation des végétaux marqués par des champignons et (3) caractérisation microscopique et chimique de la MO incubée (Fig. 39).

Marquage différentiel de végétaux au ^{13}C

La plante modèle choisie est le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) pour sa croissance rapide, sa forte productivité en feuilles et sa bonne réponse au marquage au ^{13}C (Nguyen Tu et al. 2013). Le marquage différentiel repose sur le principe que les constituants structuraux des plantes (ligno-cellulose, cutine, etc.) sont synthétisés au début de la vie de la plante/d'un organe alors que les constituants labiles comme les carbohydrates métaboliques sont sans cesse renouvelés/bio-synthétisés (Girardin et al., 2009 ; Fahey et al., 2011 ; Haddix et al., 2016). **Deux lots équivalents de graines de ray-grass seront mis à germer** dans deux chambres de cultures aux conditions strictement identiques, à l'exception que **l'un se développera sous atmosphère naturelle alors que l'autre sera sous atmosphère enrichie en ^{13}C** . Le taux de $^{13}\text{CO}_2$ de la chambre de marquage sera maintenu rigoureusement constant dès le début de la germination et tout au long de la croissance des plantes (environ 3 mois) afin de garantir un marquage le plus homogène possible des tissus structuraux (Nguyen Tu et al., 2013). Pour cette expérience, un marquage assez élevé des végétaux est visé ($\pm 1200\text{‰}$) afin d'assurer le transfert du marquage aux champignons et la détection du ^{13}C dans le CO_2 respiré lors de l'incubation, dans les différentes molécules issues du métabolisme des tissus végétaux et dans les micromorphes examinés en (nano)SIMS. **Trois semaines avant la fin de l'expérience les deux lots de plantes seront intervertis de façon à ce que les plantes dont les constituants structuraux sont marqués au ^{13}C synthétisent des métabolites labiles peu ou pas marqués, et inversement**. Dans la mesure où les parties racinaires du ray-grass enregistrent le marquage au ^{13}C de façon bien plus hétérogène que ses parties aériennes (Vidal et al., 2016), seules ces dernières seront utilisées pour l'incubation à suivre.

Incubation des végétaux marqués par les champignons

Les parties aériennes du ray-grass marqué au ^{13}C seront récoltées à la sortie des chambres, séchées à 45°C , broyées et combinées par lot (tissus structuraux marqués au ^{13}C vs métabolites labiles marqués au ^{13}C) afin d'obtenir un broyat le plus homogène possible. Les végétaux broyés seront ensuite mélangés à un **sol minéral artificiel reconstitué**. Ce sol sera constitué à partir de quartz commercial de différentes granulométries (sableuse, silteuse et argileuse) et d'illite commerciale de façon à obtenir un sol artificiel de texture limoneuse-fine qui a été montré comme favorable au développement rapide de micro-organismes et d'agrégats organo-minéraux dans une incubation d'un type similaire (Pronk et al., 2012). Ce type de sol artificiel offre l'avantage d'être totalement **dépourvu de MO**, de sorte que les champignons mis à incuber ne disposeront d'autre source de carbone organique que les végétaux marqués au ^{13}C (et dépourvu de carbonates qui compliquent les analyses élémentaires et isotopiques). Le sol artificiel et les végétaux marqués seront ensuite mélangés en proportions massiques 90/10 et le mélange sera stérilisé (autoclavé) pour éviter tout développement microbien autre que les champignons étudiés. Le mélange sera ensuite réparti dans des **flacons/bocaux dédiés munis d'une membrane permettant l'analyse des gaz issus de la respiration**. Les bocaux seront ensuite **ensemencés avec des spores de *Phanerochaete chrysosporium***. Cette espèce de basidiomycètes a été choisie car c'est un agent commun de la pourriture blanche des bois, doté des trois principales familles d'enzymes permettant de dégrader le matériel ligno-cellulosique (manganèse peroxydase, lignine peroxydase et laccase), elle est fréquente sur les sols tempérés et est facile à cultiver au laboratoire (Rihani et al., 1995 ; Accinelli et al., 2010;). Un lot de microcosmes de référence ne sera pas ensemencé. Les microcosmes seront ensuite humidifiés pour atteindre environ 60% d'humidité et incubés dans le noir à 20°C pendant 6 mois. La teneur en CO_2 et le $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ de l'atmosphère des microcosmes seront régulièrement mesurés par spectroscopie d'absorption laser (CRDS). Le pas d'échantillonnage des microcosmes (3 microcosmes « sacrifiés » par modalité et par date) sera plus

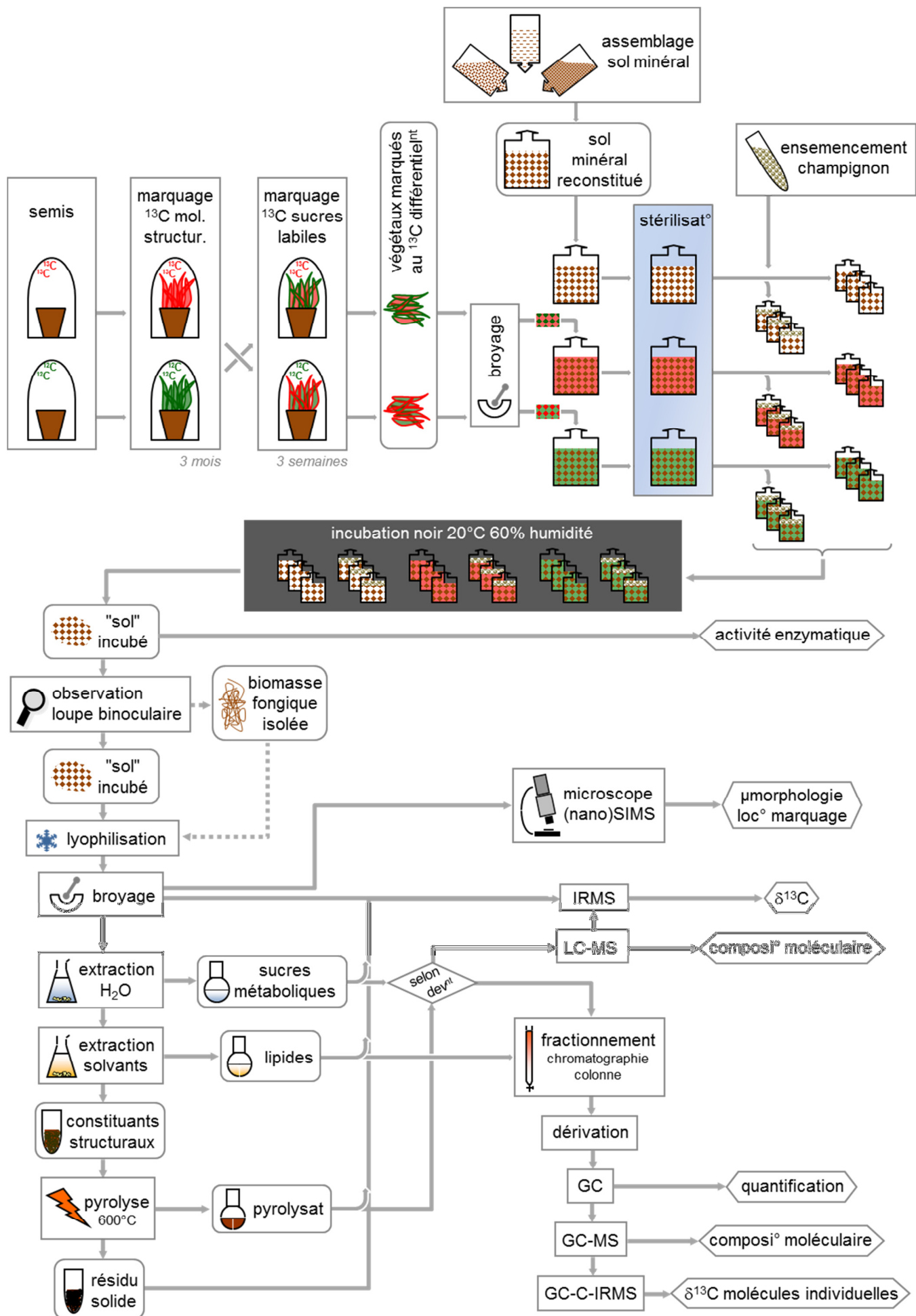


Figure 39. Protocole expérimental proposé

resserré durant les 2 premiers mois et adapté en fonction de l'activité enzymatique et d'une éventuelle fructification des champignons. Quelques microcosmes seront laissés à l'incubateur après l'arrêt de l'activité biologique, pour un suivi ultérieur de la nécromasse fongique.

Caractérisation microscopique et chimique de la MO incubée

Une aliquote des microcosmes sera analysée immédiatement pour déterminer l'activité des trois principales enzymes de dégradation du matériel ligno-cellulosique. Le reste des échantillons sera tout d'abord observé à la loupe binoculaire. Si le développement des champignons le permet, du mycélium et/ou des fructifications seront isolés manuellement pour analyse séparée de l'ensemble des microcosmes. Les échantillons seront ensuite lyophilisés pour stockage avant analyse.

Les échantillons seront successivement observés à la loupe binoculaire et au MEB (microscope électronique à balayage) afin de décrire et d'identifier les constituants microscopiques (« micromorphes ») des microcosmes ainsi que leur agencement, et déterminer les zones à analyser en (nano)SIMS. Pour éviter les imprécisions isotopiques en (nano)SIMS (spectrométrie de masse à ionisation secondaire) liées à l'inclusion dans de la résine, les échantillons seront préparés par simple dépôt sur une feuille d'or propre (Hatton et al., 2012). Les analyses en (nano)SIMS seront focalisées sur les isotopes stables du carbone afin d'identifier les micromorphes marqués au ^{13}C , et éventuellement de déterminer leur $\delta^{13}\text{C}$. Quelques analyses exploratoires viseront toutefois à évaluer les teneurs en :

- azote pour aider à l'identification des micromorphes fongiques car la paroi des champignons (principalement chitineuse) est plus riche en azote que celle des végétaux (principalement ligno-cellulosique) ;
- manganèse pour tenter de mettre en évidence des zones d'actions privilégiées de la manganèse peroxidase.

Une aliquote des échantillons sera analysée pour son contenu en carbone et $\delta^{13}\text{C}$ total (bulk ; analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse isotopique, IRMS). Les échantillons seront ensuite soumis à deux extractions successives. Les métabolites labiles seront extraits à l'eau chaude (Nkhili et al., 2012), puis les lipides aux solvants organiques tandis que les composés structuraux seront récupérés avec le résidu d'extraction. Chacune de ces fractions sera analysée en IRMS avant analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour identification de leurs constituants moléculaires. Les principaux constituants moléculaires de ces fractions seront ensuite isolés par chromatographie préparatrice pour permettre leur analyse isotopique individuelle. Les lipides seront fractionnés par chromatographie sur colonne avant analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique (GC-C-IRMS). Le fractionnement des carbohydrates métaboliques et des composés structuraux fera l'objet d'un développement sur couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) avec colonne semi-préparatrice (collaboration A. Huguet et C. Anquetil, METIS). Les composés structuraux seront au préalable craqués en éléments de plus petite taille par pyrolyse off-line. L'isolement des principaux constituants de ces fractions par LC-MS préparatrice devrait permettre de les isoler en quantité suffisante pour analyse directe en IRMS sans dérivation susceptible de biaiser leur $\delta^{13}\text{C}$.

Tableau 3. Calendrier prévisionnel.

Quoi ?	Quand ?							
	année 1				année 2			
Marquage différentiel des végétaux au ¹³ C	■	■						
Incubation des végétaux par les champignons			■	■	■	■	■	■
Développement LC-MS préparatrice sucres et lignine	■	■						
Activité enzymatique des microcosmes			■	■	■	■		
Observations microscopiques & analyses SIMS				■	■	■	■	
Analyses isotopiques MO & fractions totales			■	■	■	■	■	
Extraction & analyse métabolites labiles			■	■	■	■	■	■
Extraction & analyse lipides			■	■	■	■	■	■
Pyrolyse & analyse constituants structuraux			■	■	■	■	■	■
Analyses isotopiques molécules individuelles					■	■	■	■
Présentations congrès & rédaction articles				■			■	■

III.2.e. Résultats attendus

Au final ce projet vise à caractériser et/ou préciser les dynamiques biologiques, chimiques et physiques associées au métabolisme de la MO végétale par les champignons, et à mettre en évidence les (dé)couplages qui peuvent exister entre ces différentes dynamiques qui sont souvent étudiées indépendamment.

- Dynamique du développement des champignons (activités enzymatiques, observations microscopiques, teneur en biomarqueurs microbiens).
- Dynamique spatiale de l'incorporation du carbone d'origine végétale dans les « micromorphes » du sol (observations microscopiques & analyses SIMS) : Dans quelle structure fongique le carbone végétal est-il incorporé et à quel stade de développement ? Le développement de champignons saprophytes conduit-il à la formation de microstructures végéto-fongiques et/ou organo-minérales particulières dans le sol ?
- Dynamique de décomposition des constituants végétaux et de « synthèse » des MO du sol (analyses isotopiques et moléculaires) : Quelle famille de constituants (labiles vs structuraux) utilisent les champignons, pour synthétiser quels composés fongiques ? Quels constituants végétaux sont utilisés / quels constituants fongiques sont synthétisés à quel stade de développement des champignons (végétatif vs reproducteur, maximum d'activité de quelle enzyme) ?

Ce projet pourrait en outre permettre certains progrès méthodologiques : développement au laboratoire de la LC-MS semi-préparatrice, précision du temps de résidence des lipides libres dans les végétaux (constituants labiles ou structuraux ?), précision de la nature/structure moléculaire des MO d'origine fongique dans les sols, intercalibration des différents marqueurs d'activité fongique, etc.

Synthèse et conclusion

Poussés par ma fascination pour la paléobotanique et le potentiel de reconstitution paléoenvironnementale de la géochimie, mes premiers travaux de recherche avaient pour objectifs de tester l'utilisation des outils de la géochimie pour reconstituer la paléobiologie des végétaux fossiles. Mes premières études ont porté sur des fossiles d'excellente préservation morphologique issus de contextes paléoenvironnementaux bien documentés, avant d'appliquer de tels outils à des fossiles moins bien préservés et/ou issus d'environnements moins connus. Les caractérisations chimiques et isotopiques des plantes du Cénomaniens basal d'Anjou et de Bohême ont montré que les lipides pouvaient recéler des informations taxonomiques intéressantes, et les teneurs en isotopes stables du carbone renseigner sur l'écologie des plantes fossiles, notamment en terme de stress hydrique. Si les conclusions de ces premières études permettent d'envisager l'application de la géochimie à des fossiles moins connus, elles soulignent également la pertinence de combiner les résultats de la géochimie avec d'autres proxies et la nécessité de bien contraindre les effets de la dégradation et de la diagenèse sur la signature géochimique des fossiles.

J'ai donc orienté une partie de mes activités de recherche sur le suivi des transformations chimiques et isotopiques subies par la matière organique végétale au cours de la dégradation. Cette problématique a été abordée par des expérimentations, sur le terrain ou en laboratoire, focalisées sur les effets des stades initiaux de la dégradation sur la biogéochimie des débris végétaux. L'utilisation de matériel végétal marqué au ^{13}C et/ou la combinaison d'analyses biogéochimiques et d'observations microscopiques, ont permis de confirmer l'importante variabilité spatiale de la dégradation dans les environnements continentaux, ainsi que la contribution des micro-organismes dégradeurs (bactéries et champignons) à la matière organique résiduelle, même concernant des biomarqueurs spécifiques de plantes tels, que les *n*-alcanes à longue chaîne. Corroborant les synthèses publiées ces dix dernières années sur le devenir de la matière organique des sols, les résultats obtenus dans le cadre de ces expérimentations ont montré que la qualité chimique de la matière organique et les conditions (micro-)environnementales, biotiques comme abiotiques, présidant à sa transformation, se doivent d'être considérés de concert pour mieux appréhender son devenir.

Le carbone préservé dans les sols (voire les sédiments) correspond vraisemblablement à l'intégration de molécules labiles et plus résistantes à la dégradation, d'une part, et d'origine végétale et microbienne, d'autre part. J'aimerais donc désormais focaliser mes recherches sur les processus conduisant à l'intégration de ces différents réservoirs de carbone dans la matière organique stable des sols et des sédiments. Parmi les micro-organismes capables de dégrader la matière organique végétale, l'accent sera mis sur les champignons qui sont les plus importants dégradeurs de matériel ligno-cellulosique. Ces recherches s'appuieront notamment sur des incubations de matière organique marquée au ^{13}C afin d'essayer de suivre à l'échelle moléculaire, le devenir de certaines familles de constituants au potentiel de préservation varié. Outre le développement de nouvelles méthodes d'accès à la composition isotopique de molécules spécifiques, j'aimerais ajouter aux méthodes microscopiques, isotopiques et chimiques que j'ai l'habitude d'utiliser, des approches spatialisées de la signature biogéochimique de la matière organique. De telles approches passent notamment par des caractérisations à la sonde ionique (spectrométrie de masse à ionisation secondaire) qui devraient permettre de mieux relier l'aspect physique de la matière organique à ce que l'on peut étudier de sa composition chimique. Préciser les mécanismes de stabilisation de la matière organique dans les sols et les sédiments, s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension du cycle biogéochimique du carbone, et de ses réponses à court et long terme au changement global.

Références bibliographiques

- Abraham, W.-R., Hesse, C., 2003. Isotope fractionations in the biosynthesis of cell components by different fungi: a basis for environmental carbon flux studies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 121–128.
- Accinelli, C., Saccà, M.L., Batisson, I., Fick, J., Mencarelli, M., Grabic, R., 2010. Removal of oseltamivir (Tamiflu) and other selected pharmaceuticals from wastewater using a granular bioplastic formulation entrapping propagules of *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 81, 436–443.
- Aguilera, M., Espinar, C., Ferrio, J.P., Pérez, G., Voltas, J., 2009. A map of autumn precipitation for the third millennium BP in the Eastern Iberian Peninsula from charcoal carbon isotopes. *J. Geochem. Explor.* 102, 157–165.
- Alexander, M., 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211, 132–138.
- Amelung, W., Brodowski, S., Sandhage-Hofmann, A., Bol, R., 2008. Combining Biomarker with Stable Isotope Analyses for Assessing the Transformation and Turnover of Soil Organic Matter, in: Donald L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 155–250.
- Angers, D.A., Recous, S., Aita, C., 1997. Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -labelled wheat straw *in situ*. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 295–300.
- Asada, T., Warner, B., Aravena, R., 2005. Effects of the early stage of decomposition on change in carbon and nitrogen isotopes in *Sphagnum* litter. *J. Plant Interact.* 1, 229–237.
- Ascough, P.L., Bird, M.I., Wormald, P., Snape, C.E., Apperley, D., 2008. Influence of production variables and starting material on charcoal stable isotopic and molecular characteristics. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 6090–6102.
- Baker, E.A., 1980. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes, in: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E. (Eds.), *The Plant Cuticle*, Linnean Society Symposium Series. Academic Press, London, 98–99.
- Balesdent, J., Girardin, C., Mariotti, A., 1993. Site related $\delta^{13}\text{C}$ of tree leaves and soil organic matter in a temperate forest. *Ecology* 74, 1713–1721.
- Barral, A., Lécuyer, C., Gomez, B., Fourel, F., Daviero-Gomez, V., 2015. Effects of chemical preparation protocols on $\delta^{13}\text{C}$ values of plant fossil samples. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 438, 267–276.
- Baton, F., Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Delorme, A., Delarue, F., Dufraisie, A., accepté. Tree-ring $\delta^{13}\text{C}$ of archeological charcoals as indicator of past climatic variability. A case study from the Neolithic settlements of Lake Chalain (Jura, France). *Quart. Int.*
- Bebber, D.P., Watkinson, S.C., Boddy, L., Darrah, P.R., 2011. Simulated nitrogen deposition affects wood decomposition by cord-forming fungi. *Oecologia* 167, 1177–1184.
- Bechtel, A., Gruber, W., Sachsenhofer, R.F., Gratzer, R., Püttmann, W., 2001. Organic geochemical and stable carbon isotope investigation of coals formed in low-lying and raised mires within the Eastern Alps (Austria). *Org. Geochem.* 32, 1289–1310.
- Bélanger, N., Van Rees, K.C.J., 2008. Sampling forest soil, in: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Carter M.R. & Gregorich E.G., pp. 15–24.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., 1991. Diagenesis of belowground biomass of *Spartina alterniflora* in salt-marsh sediments. *Limnol. oceanogr.* 36, 1355–1374.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Berg, B., Lakowski, R., 2005. Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover, *Advances in Ecological Research*. Elsevier, Amsterdam.
- Bernard, L., Mougel, C., Maron, P.-A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F. el Z., Berge, O., Marol, C., Balesdent, J., Gibiat, F., Lemanceau, P., Ranjard, L., 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ^{13}C -labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environ. Microbiol.* 9, 752–764.
- Bertini, A., 2002. Palynological evidence of Upper Neogene environments in Italy. *Acta Univ. Carol. Geol.* 46, 15–25.
- Bertini, A., Roiron, P., 1997. Evolution de la végétation et du climat pendant le Pliocène moyen en Italie centrale : apport de la palynologie et de la macroflore à l'étude du bassin du Valdarno supérieur (coupe de Santa Barbara). *C. r. Acad. sci., Sér. 2, Sci. terre planètes* 324, 763–771.
- Bianchi, G., 1995. Plant waxes, in: Hamilton, R.J. (Ed.), *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. The Oily Press, Dundee, pp. 175–222.
- Bird, M.I., Ascough, P.L., 2012. Isotopes in pyrogenic carbon: A review. *Org. Geochem.* 42, 1529–1539.
- Blaud, A., Lerch, T.Z., Chevallier, T., Nunan, N., Chenu, C., Brauman, A., 2012. Dynamics of bacterial communities in relation to soil aggregate formation during the decomposition of ^{13}C -labelled rice straw. *Appl. Soil Ecol.* 53, 1–9.
- Bocherens, H., Friis, E.M., Mariotti, A., Pedersen, K.R., 1993. Carbon isotopic abundances in Mesozoic and Cenozoic fossil plants: Palaeoecological implications. *Lethaia* 26, 347–358.
- Borella, S., Leuenberger, M., Saurer, M., Siegwolf, R., 1998. Reducing uncertainties in ^{13}C analysis of tree rings: Pooling, milling, and cellulose extraction. *J. Geophys. Res.* 103, 19519–19526.
- Boulton, A.J., Boon, P.I., 1991. A review of methodology used to measure leaf litter decomposition in lotic environments: Time to turn over an old leaf? *Mar. Freshw. Res.* 42, 1–43.
- Broutin, J., Pons, D., 1975. Nouvelles précisions sur la morphologie et la phytodermologie de quelques rameaux du genre *Frenelopsis* Schenk. Présenté au 100e Congrès national des Sociétés savantes, pp. 29–46.
- Buchmann, N., Guehl, J.M., Barigah, T.S., Ehleringer, J.R., 1997. Interseasonal comparison of CO_2 concentrations, isotopic composition, and carbon dynamics in an Amazonian rainforest (French Guiana). *Oecologia* 110, 120–131.
- Bull, I.D., Simpson, I.A., Dockrill, S.J., Evershed, R.P., 1999. Organic geochemical evidence for the origin of ancient anthropogenic soil deposits at Tofts Ness, Sanday, Orkney. *Org. Geochem.* 30, 535–556.
- Castellano, M.J., Mueller, K.E., Olk, D.C., Sawyer, J.E., Six, J., 2015. Integrating plant litter quality, soil organic matter stabilization, and the carbon saturation concept. *Glob. Change Biol.* 21, 3200–3209.
- Cech, S., Klein, K., Kriz, J., Valecka, J., 1980. Revision of the Upper Cretaceous stratigraphy of the Bohemian Cretaceous Basin. *Bull. Czech Geol. Surv.* 55, 277–296.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., 2006. Carbon and hydrogen isotope variation of plant biomarkers in a plant-soil system. *Chem. Geol.* 231, 190–202.

- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Poulson, S.R., 2004. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* 65, 1369–1381.
- Churchland, C., Weatherall, A., Briones, M.J.I., Grayston, S.J., 2012. Stable-isotope labeling and probing of recent photosynthates into respired CO₂, soil microbes and soil mesofauna using a xylem and phloem stem-injection technique on Sitka spruce (*Picea sitchensis*): A stable-isotope stem-injection method to trace C-flow *in situ*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 2493–2501.
- Coïc, Y., Lesaint, C., 1983. Cultures hydroponiques. Flammarion, Paris.
- Collin, S., Cochet, F., 2013. Phosphatidylinositol Synthase Activity from Plant Membrane Fractions and from E. coli- Expressed Recombinant Peptides, in: Munnik, T., Heilmann, I. (Eds.), *Plant Lipid Signaling Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 145–161.
- Collister, J.W., Rieley, G., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific δ¹³C analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Org. Geochem.* 21, 619–627.
- Colombo, J.C., Silverberg, N., Gearing, J.N., 1997. Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough-II. Changes in composition of fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons during early diagenesis. *Org. Geochem.* 26, 257–274.
- Connin, S.L., Feng, X., Virginia, R.A., 2001. Isotopic discrimination during long-term decomposition in an arid land ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 33, 41–51.
- Cowie, B.R., Slater, G.F., Bernier, L., Warren, L.A., 2009. Carbon isotope fractionation in phospholipid fatty acid biomarkers of bacteria and fungi native to an acid mine drainage lake. *Org. Geochem.* 40, 956–962.
- Craig, H., 1953. The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 3, 53–92.
- Cragg, S.M., Beckham, G.T., Bruce, N.C., Bugg, T.D., Distel, D.L., Dupree, P., Etxabe, A.G., Goodell, B.S., Jellison, J., McGeehan, J.E., McQueen-Mason, S.J., Schnorr, K., Walton, P.H., Watts, J.E., Zimmer, M., 2015. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29, 108–119.
- Cranwell, P.A., 1981. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Org. Geochem.* 3, 79–89.
- Czimczik, C.I., Preston, C.M., Schmitz, M.W.I., Werner, R.A., Schulze, E.D., 2002. Effects of charring on mass, organic carbon, and stable carbon isotope composition of wood. *Org. Geochem.* 33, 1207–1223.
- Damon, P.E., Cheng, S., Linick, T.W., 1989. Fine and hyperfine structure in the spectrum of secular variations of atmospheric ¹⁴C. *Radiocarbon* 31, 704–718.
- Danis, P.A., Masson-Delmotte, V., Stievenard, M., Guillemin, M.T., Daux, V., Naveau, P., von Grafenstein, U., 2006. Reconstruction of past precipitation δ¹⁸O using tree-ring cellulose δ¹⁸O and δ¹³C: A calibration study near Lac d'Annecy, France. *Earth Planet. Sci. Lett.* 243, 439–448.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W., 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol* 1, 36–50.
- Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P., 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 33, 507–559.
- Degens, E.T., 1969. Biogeochemistry of stable carbon isotope, in *Organic geochemistry: Methods and research*. Eglinton G. & Murphy M.T., pp. 305–329.
- Deldicque, D., Rouzaud, J.-N., Velde, B., 2016. A Raman – HRTEM study of the carbonization of wood: A new Raman-based paleothermometer dedicated to archaeometry. *Carbon* 102, 319–329.
- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42, 495–506.
- Dercourt, J., Gaetani, M., Vrielinck, B., 2000. Atlas Peri-Tethys: Paleogeographical maps. Commission de la carte géologique du monde, Paris.
- Diefendorf, A.F., Freeman, K.H., Wing, S.L., 2014. A comparison of terpenoid and leaf fossil vegetation proxies in Paleocene and Eocene Bighorn Basin sediments. *Org. Geochem.* 71, 30–42.
- Dimassi, B., Mary, B., Wylleman, R., Labreuche, J., Couture, D., Piraux, F., Cohan, J.-P., 2014. Long-term effect of contrasted tillage and crop management on soil carbon dynamics during 41 years. *Agric. Ecosyst. Environ.* 188, 134–146.
- Dufraisse, A., Coubray, S., Girardclos, O., Dupain, A., Lemoine, M., accepté. Contribution of tyloses quantification in earlywood oak vessels to archaeological charcoal analyses : estimation of a minimum age and influences of physiological and environmental factors. *Quat. Int.*
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322–1335.
- Ehleringer, J.R., 1991. ¹³C/¹²C fractionation and its utility in terrestrial plant studies, in: Coleman, D.C., Fry, B. (Eds.), *Carbon Isotope Techniques*. Academic Press, San Diego, pp. 187–201.
- Ehleringer, J.R., Cooper, T.A., 1988. Correlations between carbon isotope ratio and microhabitat in desert plants. *Oecologia* 76, 562–566.
- El-Otmani, M., Coggins, C.W., 1985. Fruit development and growth regulator effects on normal alkanes of “Washington” navel orange fruit epicuticular wax. *J. Agric. Food Chem.* 33, 656–663.
- Endrulat, T., Saurer, M., Buchmann, N., Brunner, I., 2010. Incorporation and remobilization of ¹³C within the fine-root systems of individual *Abies alba* trees in a temperate coniferous stand. *Tree Physiol.* 30, 1515–1527.
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P., 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, Berlin.
- Evans, C.S., 1987. Lignin degradation. *Process Biochem.* 22, 102–105.
- Fahey, T.J., Yavitt, J.B., Sherman, R.E., Groffman, P.M., Fisk, M.C., Maerz, J.C., 2011. Transport of Carbon and Nitrogen Between Litter and Soil Organic Matter in a Northern Hardwood Forest. *Ecosystems* 14, 326–340.
- Farquhar, G.D., O'Leary, M.H., Berry, J.A., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 121–137.
- Farquhar, G.D., Richards, R.A., 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11, 539–552.
- Feng, X., Cui, H., Tang, K., Conkey, L.E., 1999. Tree-Ring δD as an Indicator of Asian Monsoon Intensity. *Quat. Res.* 51, 262–266.

- Feng, X., Simpson, A.J., Wilson, K.P., Williams, D.D., Simpson, M.J., 2008. Increased cuticular carbon sequestration and lignin oxidation in response to soil warming. *Nat. Geosci.* 1, 836–839.
- Fengel, D., 1991. Aging and fossilization of wood and its components. *Wood Sci. Technol.* 25, 153–177.
- Ferrio, J.P., Alonso, N., Lopez, J.B., Araus, J.L., Voltas, J., 2006. Carbon isotope composition of fossil charcoal reveals aridity changes in the NW Mediterranean Basin. *Glob. Change Biol.* 12, 1253–1266.
- Figueiral, I., 1999. Lignified and charcoalfied fossil wood, in: *Fossil Plants and Spores: Modern Techniques*. Jones T.P & Rowe N.P., London, pp. 92–96.
- Finch, P., Freeman, G., 2001. Simulated diagenesis of plant cuticles - implications for organic fossilisation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58–59, 229–235.
- Fogel, M.L., Tuross, N., 1999. Transformation of plant biochemicals to geological macromolecules during early diagenesis. *Oecologia* 120, 336–346.
- Gao, L., Guimond, J., Thomas, E., Huang, Y., 2015. Major trends in leaf wax abundance, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values along leaf venation in five species of C3 plants: Physiological and geochemical implications. *Org. Geochem.* 78, 144–152.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source-utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Girardin, C., Rasse, D.P., Biron, P., Ghashghaie, J., Chenu, C., 2009. A method for ^{13}C -labeling of metabolic carbohydrates within French bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) for decomposition studies in soils. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1792–1800.
- Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A., Schnmidt, H.L., 1993. Correlation between the ^{13}C content of primary and secondary products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiol.* 102, 1287–1290.
- Grandy, A.S., Neff, J.C., 2008. Molecular C dynamics downstream: The biochemical decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and function. *Sci. Total Environ.* 404, 297–307.
- Greeman, D.J., Rose, A.W., Washington, J.W., Dobos, R.R., Ciolkosz, E.J., 1999. Geochemistry of radium in soils of the Eastern United States. *Appl. Geochem.* 14, 365–385.
- Grice, K., Klein Breteler, W.C.M., Schouten, S., Grossi, V., de Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S., 1998. Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography* 13, 686–693.
- Griepentrog, M., Bodé, S., Boeckx, P., Hagedorn, F., Heim, A., Schmidt, M.W., 2014. Nitrogen deposition promotes the production of new fungal residues but retards the decomposition of old residues in forest soil fractions. *Glob. Change Biol.* 20, 327–340.
- Gröcke, D.R., 1998. Carbon isotope analyses of fossil plants as a chemostratigraphic and palaeoenvironmental tool. *Lethaia* 31, 1–13.
- Gülz, P.G., Müller, E., Prasad, R.B.N., 1989. Organ-specific composition of epicuticular waxes of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves and seeds. *Z. Naturforsch.* 44c, 731–734.
- Gülz, P.G., Müller, E., Prasad, R.B.N., 1991. Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves. *Phytochemistry* 30, 769–773.
- Gülz, P.G., Prasad, R.B.N., Müller, E., 1992. Surface structure and chemical composition of epicuticular waxes during leaf development of *Fagus sylvatica* L. *Z. Naturforsch.* 47c, 190–196.
- Gupta, N.S., Briggs, D.E.G., Collinson, M.E., Evershed, R.P., Michels, R., Jack, K.S., Pancost, R.D., 2007. Evidence for the in situ polymerisation of labile aliphatic organic compounds during the preservation of fossil leaves: Implications for organic matter preservation. *Org. Geochem.* 38, 499–522.
- Haddix, M.L., Paul, E.A., Cotrufo, M.F., 2016. Dual, differential isotope labeling shows the preferential movement of labile plant constituents into mineral-bonded soil organic matter. *Glob. Change Biol.* 22, 2301–2312.
- Haider, K., Martin, J.P., 1967. Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation 1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 31, 766–772.
- Haider, K., Martin, J.P., 1970. Humic acid-type phenolic polymers from *Aspergillus sydowi* culture medium, *Stachybotrys* spp. cells and autoxidized phenol mixtures. *Soil Biol. Biochem.* 2, 145–156.
- Haider, K., Martin, J.P., 1975. Decomposition of specifically carbon-14 labeled benzoic and cinnamic acid derivatives in soil 1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 39, 657–662.
- Haider, K., Martin, J.P., 1981. Decomposition in soil of specifically ^{14}C -labeled model and cornstalk lignins and coniferyl alcohol over two years as influenced by drying, rewetting, and additions of an available C substrate. *Soil Biol. Biochem.* 13, 447–450.
- Hall, G., Woodborne, S., Scholes, M., 2008. Stable carbon isotope ratios from archaeological charcoal as palaeoenvironmental indicators. *Chem. Geol.* 247, 384–400.
- Hanba, Y.T., Mori, S., Lei, T.T., Koike, T., Wada, E., 1997. Variations in leaf $\delta^{13}\text{C}$ along a vertical profile of irradiance in a temperate Japanese forest. *Oecologia* 110, 253–261.
- Haq, B.U., Harednol, J., Vail, P.R., 1988. Mesozoic and Cenozoic chronostratigraphy and cycles of sea level-change, in: *Sea-Level Changes: An Integrated Approach*. Wilgus, C.K., Posamentiers, H., Ross, C.K., Kendall, C.G.S.C., pp. 71–108.
- Hatton, P.-J., Castanha, C., Torn, M.S., Bird, J.A., 2015. Litter type control on soil C and N stabilization dynamics in a temperate forest. *Glob. Change Biol.* 21, 1358–1367.
- Hatton, P.-J., Remusat, L., Zeller, B., Derrien, D., 2012. A multi-scale approach to determine accurate elemental and isotopic ratios by nano-scale secondary ion mass spectrometry imaging: Accurate elemental and isotopic ratios by NanoSIMS imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1363–1371.
- Hedges, J.I., Oades, J.M., 1997. Comparative organic geochemistry of soils and marine sediments. *Org. Geochem.* 27, 319–361.
- Helle, G., Schleser, G.H., 2004. Beyond CO_2 -fixation by Rubisco—an interpretation of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. *Plant Cell Environ.* 27, 367–380.
- Herbin, G.A., Robins, P.A., 1969. Patterns of leaf variation and development in leaf wax alkanes. *Phytochemistry* 8, 1985–1998.
- Hillis, W.E., 1987. Heartwood and tree exudates. Springer-Verlag, Berlin.
- Hlustik, A., 1986. Eretmophyllous Ginkgoales from the Cenomanian. *Acta Musei Natl. Pragae Ser. B Hist. Nat.* 42, 99–115.
- Hobbie, E.A., Weber, N.S., Trappe, J.M., 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: The isotopic evidence. *New Phytol.* 150, 601–610.

- Högberg, M.N., 2006. Discrepancies between ergosterol and the phospholipid fatty acid 18:2 ω 6 as biomarker for fungi in boreal forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3231–3235.
- Horowitz, M.E., Fahey, T.J., Yavitt, J.B., Feldpausch, T.R., Sherman, R.E., 2009. Patterns of late-season photosynthate movement in sugar maple saplings. *Can. J. For. Res.* 39, 2294–2298.
- Ibrahima, A., Joffre, R., Gillon, D., 1995. Changes in litter during the initial leaching phase: An experiment on the leaf litter of Mediterranean species. *Soil Biol. Biochem.* 27, 931–939.
- Jiang, X., Haddix, M.L., Cotrufo, M.F., 2016. Interactions between biochar and soil organic carbon decomposition: Effects of nitrogen and low molecular weight carbon compound addition. *Soil Biol. Biochem.* 100, 92–101.
- Jobbágy, E.G., Jackson, R.B., 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecol. Appl.* 10, 423–436.
- Jones, J.G., Young, B.V., 1970. Major paraffin constituents of microbial cells with particular references to *Chromatium* sp., *Arch. Microbiol.* 70, 82–88.
- Juarez, S., Nunan, N., Duday, A.-C., Pouteau, V., Schmidt, S., Hapca, S., Falconer, R., Otten, W., Chenu, C., 2013. Effects of different soil structures on the decomposition of native and added organic carbon. *Eur. J. Soil Biol.* 58, 81–90.
- Kelleher, B.P., Simpson, A.J., 2006. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? *Environ. Sci. Technol.* 40, 4605–4611.
- Kim, D.Y., Rhee, Y.H., 2003. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 300–308.
- Kleber, M., 2010. What is recalcitrant soil organic matter? *Environ. Chem.* 7, 320–332.
- Knoche, H., Ourisson, G., 1967. Organic compounds in fossil plants (*Equisetum*: Horsetail). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6, 1085.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 34, 139–162.
- Kögel-Knabner, I., 2017. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter: Fourteen years on. *Soil Biol. Biochem.* 105, A3–A8.
- Körner, C., Farquhar, G.D., Roskandic, Z., 1988. A global survey of carbon isotope discrimination in plant from high altitude. *Oecologia* 74, 623–632.
- Krull, E.S., Skjemstad, J.O., Graetz, D., Grice, K., Dunning, W., Cook, G., Parr, J.F., 2003. ¹³C-depleted charcoal from C₄ grasses and the role of occluded carbon in phytoliths. *Org. Geochem.* 34, 1337–1352.
- Kvacek, J., 1998. Cuticles analysis of the Gymnosperms of the Bohemian Cenomanian. Thèse, National Muzeum of Praha.
- Laiho, R., Prescott, C.E., 2004. Decay and nutrient dynamics of coarse woody debris in northern coniferous forests: a synthesis. *Can. J. For. Res.* 34, 763–777.
- Lajat, M., Saliot, A., Schimmelmann, A., 1990. Free and bound lipids in recent (1835–1987) sediments from Santa Barbara Basin. *Org. Geochem.* 16, 793–803.
- Last, F.T., Deighton, F.C., 1965. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48, 83–99.
- Le Milbeau, C., Lavrieux, M., Jacob, J., Bréheret, J.-G., Zocatelli, R., Disnar, J.-R., 2013. Methoxy-serratenes in a soil under conifers and their potential use as biomarkers of Pinaceae. *Org. Geochem.* 55, 45–54.
- Leake, J.R., Ostle, N.J., Rangel-Castro, J.I., Johnson, D., 2006. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field ¹³CO₂ pulse-labelling in an upland grassland. *Appl. Soil Ecol.* 33, 152–175.
- Leavitt, S.W., Donahue, D.J., Long, A., 1982. Charcoal production from wood and cellulose: implications to radiocarbon dates and accelerator target production. *Radiocarbon* 24, 27–35.
- Leavitt, S.W., Long, A., 1991. Seasonal stable-carbon isotope variability in tree rings: possible paleoenvironmental signals. *Chem. Geol.* 87, 59–70.
- Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Dathe, L., Wirrick, S., Jacobsen, C., 2008. Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nat. Geosci.* 1, 238–242.
- Lerch, T.Z., Nunan, N., Dignac, M.-F., Chenu, C., Mariotti, A., 2011. Variations in microbial isotopic fractionation during soil organic matter decomposition. *Biogeochemistry* 106, 5–21.
- Li, S.-G., Tsujimura, M., Sugimoto, A., Davaa, G., Oyunbaatar, D., Sugita, M., 2007. Temporal variation of $\delta^{13}C$ of larch leaves from a montane boreal forest in Mongolia. *Trees* 21, 479–490.
- Livingston, N.J., Spittlehouse, D.L., 1996. Carbon isotope fractionation in tree ring early and late wood in relation to intra-growing season water balance. *Plant Cell Environ.* 19, 768–774.
- Lockheart, M.J., van Bergen, P.F., Evershed, R.P., 1997. Variations in the stable carbon isotope composition of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher plant-derived sedimentary organic matter. *Org. Geochem.* 26, 137–153.
- Logan, G.A., Smiley, C.J., Eglinton, G., 1995. Preservation of leaf waxes in association with their source tissues, Clarkia, northern Idaho, USA. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 751–763.
- Machás, R., Santos, R., Peterson, B., 2006. Elemental and stable isotope composition of *Zostera noltii* (Horneman) leaves during the early phases of decay in a temperate mesotidal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 66, 21–29.
- Macko, S.A., Fogel, M.L., Hare, P.E., Hoering, T.C., 1987. Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids. *Chem. Geol. Isot. Geosci. Sect.* 65, 79–92.
- Magny, M., 1993. Un cadre climatique pour les habitats lacustres préhistoriques ? *C. r. Acad. sci., Sér. 2 Méc. phys. chim. sci. univers sci. Terre* 316, 1619–1625.
- Manning, P.L., Morris, P.M., McMahon, A., Jones, E., Gize, A., Macquaker, J.H.S., Wolff, G., Thompson, A., Marshall, J., Taylor, K.G., Lyson, T., Gaskell, S., Reamtong, O., Sellers, W.I., van Dongen, B.E., Buckley, M., Wogelius, R.A., 2009. Mineralized soft-tissue structure and chemistry in a mummified hadrosaur from the Hell Creek Formation, North Dakota (USA). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 3429–3437.
- Marschner, B., Brodowski, S., Dreves, A., Gleixner, G., Gude, A., Grootes, P.M., Hamer, U., Heim, A., Jandl, G., Ji, R., Kaiser, K., Kalbitz, K., Kramer, C., Leinweber, P., Rethemeyer, J., Schäffer, A., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., Wiesenberger, G.L.B., 2008. How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171, 91–110.
- Martin, J.P., Haider, K., 1969. Phenolic polymers of *Stachybotrys atra*, *Stachybotrys chartarum* and *Epicoccus nigrum* relation to humic acid formation. *Soil Sci.* 107, 260–270.

- Martin, J.P., Zunino, H., Peirano, P., Cajozzi, M., Haider, K., 1982. Decomposition of ^{14}C -labeled lignin, model humic acid polymer, and fungal melanins in allophanic soils. *Soil Biol. Biochem.* 14, 289–293.
- Martinelli, L.A., Almeida, S., Brown, L.F., Moreira, M.Z., Victoria, R.I., Sternberg, L.S.L., Ferreira, C.A.C., Thomas, W.W., 1998. Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles, and fine litter in a tropical forest in Rondônia, Brazil. *Oecologia* 114, 170–179.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Guillén, F., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195–204.
- Masi, A., Sadori, L., Zanchetta, G., Baneschi, I., Giardini, M., 2013. Climatic interpretation of carbon isotope content of mid-Holocene archaeological charcoals from eastern Anatolia. *Quat. Int.* 303, 64–72.
- Medina, E., Minchin, P., 1980. Stratification of $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves in Amazonian rain forests. *Oecologia* 45, 377–378.
- Melillo, J.M., Aber, J.D., Linkins, A.E., Ricca, A., Fry, B., Nadelhoffer, K.J., 1989. Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: plant litter to soil organic matter, in: *Ecology of Arable Land-Perspectives and Challenges*. Springer, pp. 53–62.
- Melin, E., 1930. Biological decomposition of some types of litter from north american forests. *Ecology* 11, 72–101
- Meyers, P.A., Eadies, B.J., 1993. Sources, degradation and recycling of organic matter associated with sinking particles in Lake Michigan. *Org. Geochem.* 20, 47–56.
- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry—an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Org. Geochem.* 20, 867–900.
- Michelot, A., 2011. Croissance et $\delta^{13}\text{C}$ des cernes de trois essences forestières tempérées (*Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* et *Pinus sylvestris*) face aux variations climatiques à l'échelle interannuelle et saisonnière. Thèse Université Paris Sud-Orsay.
- Mills, G.L., McArthur, J.V., Wolfe, C., Aho, J.M., Rader, R.B., 2001. Changes in fatty acid and hydrocarbon composition of leaves during decomposition in a southeastern blackwater stream. *Arch. Hydrobiol.* 152, 315–328.
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B., Kästner, M., 2012. SOM genesis: microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry* 111, 41–55.
- Monson, K.D., Hayes, J.M., 1982. Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. Ozonolysis of unsaturated fatty acids as a means of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46, 139–149.
- Moore-Kucera, J., Dick, R.P., 2008. Application of ^{13}C -labeled litter and root materials for in situ decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2485–2493.
- Moretti, M., Gonçalves, J.F., Callisto, M., 2007. Leaf breakdown in two tropical streams: Differences between single and mixed species packs. *Limnol. Ecol. Manag. Inland Waters* 37, 250–258.
- Mouthon, J., 1997. Paléoenvironnement du lac de Chalain vu par la malacologie (de l'Atlantique ancien au Subboréal). Sites Littoraux Néolithiques Clairvaux-Lacs Chalain Jura 3200-2900 Av J-C 87.
- Murat, A., Baudin, F., Mear, Y., Marion, C., Chaibi, M., Beryouni, K., Baltzer, A., Thiebot, J., Bernasconi, S., Ducassou, E., Poizot, E., 2013. Le brome dans les sédiments, un nouveau marqueur de la quantité de matière organique et de son origine : méthode et exemples d'applications, in: *Livre Des Résumés*. Presented at the 14ème Congrès Français de Sédimentologie, Paris, p. 295.
- Murphy, K.L., Klopatek, J.M., Coe-Klopatek, C., 1998. The effects of litter quality and climate on decomposition along an elevational gradient. *Ecol. Appl.* 8, 1061–1071.
- Nelson, P.N., Baldock, J.A., 2005. Estimating the molecular composition of a diverse range of natural organic materials from solid-state ^{13}C NMR and elemental analyses. *Biogeochemistry* 72, 1–34. doi:10.1007/s10533-004-0076-3
- Nguyen Tu, T.T., Bocherens, H., Mariotti, A., Baudin, F., Pons, D., Broutin, J., Derenne, S., Largeau, C., 1999. Ecological distribution of Cenomanian terrestrial plants based on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 145, 79–93.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., Pons, D., 2000. Effects of fungal infection on lipid extract composition of higher plant remains: comparison of shoots of a Cenomanian conifer, uninfected and infected by extinct fungi. *Org. Geochem.* 31, 1743–1754.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., 2001. Evolution of the chemical composition of *Ginkgo biloba* external and internal leaf lipids through senescence and litter formation. *Org. Geochem.* 32, 45–55.
- Nguyen Tu, T.T., Kvacek, J., Ulicny, D., Bocherens, H., Mariotti, A., Broutin, J., 2002. Isotope reconstruction of plant palaeoecology. Case study of Cenomanian floras from Bohemia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 183, 43–70.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., 2003. Comparison of leaf lipids from a fossil ginkgoalean plant and its extant counterpart at two degradation stages: diagenetic and chemotaxonomic implications. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 124, 63–78.
- Nguyen Tu, T.T., Kürschner, W.M., Schouten, S., Van Bergen, P.F., 2004a. Leaf carbon isotope composition of fossil and extant oaks grown under differing atmospheric CO_2 levels. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 212, 199–213.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Bardoux, G., Mariotti, A., 2004b. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant n-alkanes. *Org. Geochem.* 35, 317–329.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Derenne, S., 2007. Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *C. r. Palévol* 6, 451–461.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Bardoux, G., Biron, P., Ponge, J.-F., David, B., Derenne, S., 2011. Early degradation of plant alkanes in soils: A litterbag experiment using ^{13}C -labelled leaves. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2222–2228.
- Nguyen Tu, T.T., Biron, P., Maseyk, K., Richard, P., Zeller, B., Quénéa, K., Alexis, M., Bardoux, G., Vaury, V., Girardin, C., Pouteau, V., Billiou, D., Bariac, T., 2013. Variability of ^{13}C -labeling in plant leaves: Variability of ^{13}C -labeling in plant leaves. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 1961–1968.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Anquetil, C., Zanetti, F., Zeller, B., Huon, S., Derenne, S., 2017. Leaf lipid degradation in soils and surface sediments: A litterbag experiment. *Org. Geochem.* 104, 35–41.
- Niklas, K.J., Brown, R.M., 1981. Ultrastructural and paleobiochemical correlations among fossil leaf tissues from the St. Maries River (Clarkia) area, northern Idaho, USA. *Am. J. Bot.* 68, 332–341.
- Nkhili, E., Guyot, G., Vassal, N., Richard, C., 2012. Extractability of water-soluble soil organic matter as monitored by spectroscopic and chromatographic analyses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2400–2407.

- Nogués, S., Damesin, C., Tcherkez, G., Maunoury, F., Cornic, G., Ghashghaie, J., 2006. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope labelling to study leaf carbon respiration and allocation in twigs of field-grown beech trees. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 219–226.
- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil* 76, 319–337.
- Odier, E., Rouau, X., 1985. Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine, in: Mauranche, A., Costes, C. (Eds.), *Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt Industriel*. Gauthiers-Villars, Bordas, Paris, 199–237.
- O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20, 553–567.
- Osborne, C.P., Beerling, D.J., 2006. Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 173–194.
- Otto, A., Wilde, V., 2001. Sesqui-, Di-, and Triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers - A review. *Bot. Rev.* 67, 141–238.
- Pacltova, B., 1990. Marginal facies of the Bohemian Upper Cretaceous (Palynological study), in: *Proceedings of the Symposium on the Palaeofloristic Changes in the Cretaceous and Tertiary*. Prague, pp. 47–52.
- Park, R., Epstein, S., 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 21, 110–126.
- Paul, E.A., 2016. The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biol. Biochem.* 98, 109–126.
- Peñuelas, J., Estiarte, M., 1997. Trends in plant carbon concentration and plant demand for N throughout this century. *Oecologia* 109, 69–73.
- Peters, K.E., Walters, J.M., Moldovan, J.M., 2005. *The Biomarker Guide*, 2nd ed, Cambridge University Press, Cambridge.
- Pétrequin, P., 2012. Réflexions sur dix années de recherche sur le Néolithique dans la Région Franche-Comté (1995-2005), in: *IX Ans D'archéologie En Franche-Comté. Bilan Scientifique Hors-Série*. Direction Régionale des Affaires Culturelles, Besançon, pp. 102–112.
- Pétrequin, P., Arbogast, R.M., Bouruin-Mignot, C., Duplax, A., Martineau, R., Pétrequin, A.-M., 2002. Le mythe de la stabilité : Déséquilibres et réajustements d'une communauté agricole néolithique dans le Jura français, du 32^{ème} au 30^{ème} siècle av. J.-C., in : *Equilibre et ruptures dans les écosystèmes depuis 20000 ans en Europe de l'Ouest*. Actes du colloque international de Besançon 18-22 septembre 2000, pp. 175-190.
- Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75, 57–134.
- Ponge, J.-F., 1999. Horizons and humus forms in beech forests of the Belgian Ardennes. *Soil Sci Soc Am J* 63, 1888–1901.
- Pons, D., 1979. Les organes reproducteurs de *Frenelopsis alata* (K. Feistm) Knobloch, Cheirolepidiaceae du Cénomanien de l'Anjou, France. Présenté au 104e Congrès national des Société savantes, pp. 209–231.
- Pons, D., Boureau, E., 1977. Les champignons épiphyllés d'un *Frenelopsis* du cénomanien moyen de l'Anjou (France). *Rev. Mycol.* 41, 349–361.
- Pons, D., Boureau, E., Broutin, J., 1976. Nouvelles études paléobotanique des environs d'Angers. I. *Eretmophyllum andegavense* nov. sp. Ginkgoale fossile du Cénomanien de l'Anjou. Présenté au 97e Congrès national des Société savantes, pp. 357–369.
- Pons, D., Lauvergeat, J., Broutin, J., 1980. Paléoclimatologie comparée de deux gisements du Crétacé supérieur d'Europe occidentale. *Mém. Soc. géol. Fr.* 139, 151–158.
- Pons, D., Vozenin-Serra, C., 1992. Un nouveau bois de Ginkgoales du cénomanien de l'Anjou, France. *Cour Forsch-Inst Senckenberg* 147, 199–213.
- Pronk, G.J., Heister, K., Ding, G.-C., Smalla, K., Kögel-Knabner, I., 2012. Development of biogeochemical interfaces in an artificial soil incubation experiment; aggregation and formation of organo-mineral associations. *Geoderma* 189–190, 585–594.
- Rezanka, T., Sokolov, M.Y., 1993. Rapid method for the enrichment of very long-chain fatty acids from microorganisms. *J. Chromatogr. A* 636, 249–254.
- Richard, H., 1997. Analyse pollinique d'un sondage de 7,5 m, in: *Les Sites Littoraux Néolithiques de Clairvaux-Les-Lacs et de Chalais (Jura)*. III, Chalais Station 3, 3200-2900 Av. J.-C. Pétrequin P., Paris, pp. 101-112.
- Rieley, G., Raven, A.M., Lawson, A., Evershed, R.P., Parkes, R.J., Maxwell, J.R., 1998. Laboratory studies on sedimentary lipids preservation: different preservation potential inferred for leaf and algal lipids. *Anc. Biomol.* 2, 177–183.
- Rigby, D., Batts, B.D., Smith, J.W., 1981. The effect of maturation on the isotopic composition of fossil fuels. *Org. Geochem.* 3, 29–36.
- Rihani, M., Kiffer, E., Botton, B., 1995. Decomposition of beech litter by microflora and mesofauna. I. In vitro action of white-rot fungi on beech leaves and foliar components. *Eur. J. Soil Biol.* 31, 57–66.
- Ritz, K., 2006. Fungal roles in transport processes in soils, in: *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Gadd G.M., pp. 51–73.
- Robertson, S.A., Mason, S.L., Hack, E., Abbott, G.D., 2008. A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. *Org. Geochem.* 39, 945–951.
- Rubino, M., Dungait, J.A.J., Evershed, R.P., Bertolini, T., De Angelis, P., D'Onofrio, A., Lagomarsino, A., Lubritto, C., Merola, A., Terrasi, F., Cotrufo, M.F., 2010. Carbon input belowground is the major C flux contributing to leaf litter mass loss: Evidences from a ^{13}C labelled-leaf litter experiment. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1009–1016.
- Rublee, P.A., Roman, M.R., 1982. Decomposition of turtlegrass (*Thalassia testudinum* Konig) in flowing sea-water tanks and litterbags: Compositional changes and comparison with natural particulate matter. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 58, 47–58.
- Rumpel, C., Baumann, K., Remusat, L., Dignac, M.-F., Barré, P., Deldicque, D., Glasser, G., Lieberwirth, I., Chabbi, A., 2015. Nanoscale evidence of contrasted processes for root-derived organic matter stabilization by mineral interactions depending on soil depth. *Soil Biol. Biochem.* 85, 82–88.
- Salasoo, I., 1983. Effect of leaf age on epicuticular wax alkanes in *Rhododendron*. *Phytochemistry* 22, 461–463.
- Sanderman, J., Amundson, R., 2005. *Biogeochemistry of decomposition and detrital processing*. Elsevier, Amsterdam.
- Sangély, L., Chaussidon, M., Michels, R., Huault, V., 2005. Microanalysis of carbon isotope composition in organic matter by secondary ion mass spectrometry. *Chem. Geol.* 223, 179–195.
- Schaeffer, A., Nannipieri, P., Kästner, M., Schmidt, B., Botterweck, J., 2015. From humic substances to soil organic matter—microbial contributions. In honour of Konrad Haider and James P. Martin for their outstanding research contribution to soil science. *J. Soils Sediments* 15, 1865–1881.

- Schleser, G.H., Frielingsdorf, J., 1999. Carbon isotope behaviour in wood and cellulose during artificial aging. *Chem. Geol.* 158, 121–130.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kogel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56.
- Schnitzer, M., Monreal, J.A., 2011. Quo Vadis soil organic matter research? a biological link to the chemistry of humification. *Adv. Agron.* 113, 139–213.
- Sebilo, M., Billen, G., Grably, M., Mariotti, A., 2003. Isotopic composition of nitrate-nitrogen as a marker of riparian and benthic denitrification at the scale of the whole Seine River system. *Biogeochemistry* 63, 35–51.
- Shepherd, T., Wynne Griffiths, D., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes: Tansley review. *New Phytol.* 171, 469–499.
- Simpson, R.T., Frey, S.D., Six, J., Thiet, R.K., 2004. Preferential accumulation of microbial carbon in aggregate structures of no-tillage soils. *Soil Sci. Society Am. J.* 68, 1249–1255.
- Singh, M., Sarkar, B., Biswas, B., Churchman, J., Bolan, N.S., 2016. Adsorption-desorption behavior of dissolved organic carbon by soil clay fractions of varying mineralogy. *Geoderma* 280, 47–56.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099–2103.
- Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K., Batten, K.M., 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 555–569.
- Smith, M.S., 1976. *The chemotaxonomy of plants*. Arnold, Londres.
- Spicakova, L., 1999. Fluvial deposits of the southwestern margin of the Bohemian Cretaceous Basin (Cenomanian, Czech republic), their spatial and temporal deviation. Thèse de Charles University, Prague.
- Spiker, E.C., Hatcher, P.G., 1987. The effects of early diagenesis on the chemical and stable carbon isotopic composition of wood. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 1385–1391.
- Sramek, M., Volarik, D., Ertas, A., Matula, R., 2015. The effect of coppice on the structure, tree growth and soil nutrients in temperate Turkey. *J. Forest Sc.* 61, 27–34.
- Stear, D.C., Greenwood, D.R., Boon, P.I., 2009. The chemical constraints upon leaf decay rates: Taphonomic implications among leaf species in Australian terrestrial and aquatic environments. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 157, 358–374.
- Steffens, C., Helfrich, M., Joergensen, R.G., Eissfeller, V., Flessa, H., 2015. Translocation of ¹³C-labeled leaf or root litter carbon of beech (*Fagus sylvatica* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.) during decomposition – A laboratory incubation experiment. *Soil Biol. Biochem.* 83, 125–137.
- Stewart, W.N., Rothwell, G.W., 1993. *Paleobotany and the evolution of plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Storme, J.-Y., Dupuis, C., Schnyder, J., Quesnel, F., Garel, S., Iakovleva, A.I., Iacumin, P., Di Matteo, A., Sebilo, M., Yans, J., 2012. Cycles of humid-dry climate conditions around the P/E boundary: new stable isotope data from terrestrial organic matter in Vasterival section (NW France): Carbon nitrogen isotopes Palaeocene-Eocene boundary. *Terra Nova* 24, 114–122.
- Suberkropp, K., Godshalk, G.L., Klug, M.J., 1976. Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology* 57, 720–727.
- Suchewaboripont, V., Pongpan, S., Patanaponpaiboon, P., 2011. Zonal variation in leaf-litter decomposition in a secondary mangrove forest. *Tropics* 20, 1–10.
- Tameler, T., Soreide, J.E., Hop, H., Carroll, M.L., 2006. Fractionation of stable isotopes in the Arctic marine copepod *Calanus glacialis*: Effects on the isotopic composition of marine particulate organic matter. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 333, 231–240.
- Taylor, B.R., Parkinson, D., Parsons, W.F.J., 1989. Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: A microcosm test. *Ecology* 70, 97–104.
- Taylor, T.N., 1981. *Palaeobotany*. McGraw-Hill, New-York.
- Teece, M.A., Fogel, M.L., Dollhopf, M.E., Neelson, K.H., 1999. Isotopic fractionation associated with biosynthesis of fatty acids by a marine bacterium under oxic and anoxic conditions. *Org. Geochem.* 30, 1571–1579.
- Tietema, A., Wessel, W.W., 1994. Microbial activity and leaching during initial oak leaf litter decomposition. *Biol. Fertil. Soils* 18, 49–54.
- Tramoy, R., Salpin, M., Schnyder, J., Person, A., Sebilo, M., Yans, J., Vaury, V., Fozzani, J., Bauer, H., 2016. Stepwise palaeoclimate change across the Eocene-Oligocene transition recorded in continental NW Europe by mineralogical assemblages and $\delta^{15}\text{N}_{\text{org}}$ (Rennes Basin, France). *Terra Nova* 28, 212–220.
- Tramoy, R., Sebilo, M., Nguyen Tu, T.T., Schnyder, J., 2017. Carbon and nitrogen dynamics in decaying wood: paleoenvironmental implications. *Environ. Chem.* 14, 9–18.
- Treonis, A.M., Ostle, N.J., Stott, A.W., Primrose, R., Grayston, S.J., Ineson, P., 2004. Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biol. Biochem.* 36, 533–537.
- Treydte, K., Schleser, G.H., Schweingruber, F.H., Winiger, M., 2001. The climatic significance of $\delta^{13}\text{C}$ in subalpine spruces (Lötschental, Swiss Alps). *Tellus B* 53, 593–611.
- Turekian, V.C., Macko, S., Ballentine, D., Swap, R.J., Gartsang, M., 1998. Causes of bulk carbon and nitrogen isotopic fractionations in the products of vegetation burns: laboratory studies. *Chem. Geol.* 152, 181–192.
- Turney, C.S.M., Wheeler, D., Chivas, A.R., 2006. Carbon isotope fractionation in wood during carbonization. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 960–964.
- Ugarte, C.M., Kwon, H., Andrews, S.S., Wander, M.M., 2014. A meta-analysis of soil organic matter response to soil management practices: An approach to evaluate conservation indicators. *J. Soil Water Conserv.* 69, 422–430.
- Ulicny, D., Hladikova, J., Attrep, M.J.J., Cech, S., Hradecka, L., Svobodova, M., 1997. Sea-level changes and geochemical anomalies across the Cenomanian-Turonian boundary; Pecinov quarry, Bohemia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 132, 265–285.
- Ulicny, D., Spicakova, L., 1996. Response to high frequency sea-level change in a fluvial to estuarine succession: cenomanian palaeovalley fill, Bohemian Cretaceous Basin, in: Howell, J.A., Aitken, J.F. (Eds.), *High Resolution Sequence Stratigraphy: Innovation and Applications, Special Publications*. Geological Society, London, pp. 248–268.

- Vaiglova, P., Bogaard, A., Collins, M., Cavanagh, W., Mee, C., Renard, J., Lamb, A., Gardeisen, A., Fraser, R., 2014. An integrated stable isotope study of plants and animals from Kouphovouno, southern Greece: a new look at Neolithic farming. *J. Archaeol. Sci.* 42, 201–215.
- Vane, C.H., Abbott, G.D., Head, I.M., 2001. The effect of fungal decay (*Agaricus bisporus*) on wheat straw lignin using pyrolysis–GC–MS in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 60, 69–78.
- Velenovsky, J., Viniklar, L., 1926. *Flora Cretacea Bohemiae*. Státní geologický ústav Československé republiky, Prague.
- Versteegh, G.J., Bosch, H.J., de Leeuw, J.W., 1997. Potential palaeoenvironmental information of C₂₄ to C₃₆ mid-chain diols, ketols and mid-chain hydroxy fatty acids; a critical review. *Org. Geochem.* 27, 1–13.
- Vidal, A., Quenea, K., Alexis, M., Nguyen Tu, T.T., Mathieu, J., Vaury, V., Derenne, S., 2017. Fate of ¹³C labelled root and shoot residues in soil and anecic earthworm casts: A mesocosm experiment. *Geoderma* 285, 9–18.
- Vidal, A., Remusat, L., Watteau, F., Derenne, S., Quenea, K., 2016. Incorporation of ¹³C labelled shoot residues in *Lumbricus terrestris* casts: A combination of transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Soil Biol. Biochem.* 93, 8–16.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.J., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: A review of recent research development. *Org. Geochem.* 29, 1163–1179.
- Waksman, S.A., 1925. What is humus? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 11, 463–468.
- Walthall, C.L., Hatfield, J., Backlund, P., 2012. *Climate change and agriculture in the United States: Effects and adaptation*, USDA Technical Bulletin 1935. Washington DC.
- Wang, G., Zhang, L., Zhang, X., Wang, Y., Xu, Y., 2014. Chemical and carbon isotopic dynamics of grass organic matter during litter decompositions: A litterbag experiment. *Org. Geochem.* 69, 106–113.
- Watkinson, S., Bebb, D., Darrah, P., Fricker, M., Tlaka, M., Boddy, L., 2006. The role of wood decay fungi in the carbon and nitrogen dynamics of the forest floor, in: *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Cambridge University Press, New-York, pp. 151–158.
- Webster, J.R., Benfield, E.F., 1986. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17, 567–594.
- Weete, J.D., Leek, G.L., Peterson, C.M., Currie, H.E., Branch, W.D., 1978. Lipid and surface wax synthesis in water-stressed cotton leaves. *Plant Physiol.* 62, 675–677.
- Werth, M., Kuzyakov, Y., 2010. ¹³C fractionation at the root-microorganisms-soil interface: A review and outlook for partitioning studies. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1372–1384.
- Whelan, R.J., 1995. *The ecology of fire*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Witkamp, M., 1966. Decomposition of leaf litter in relation to environment, microflora, and microbial respiration. *Ecology* 47, 194–201.
- Witkamp, M., Olson, J.S., 1963. Breakdown of confined and non confined oak litter. *Oikos* 14, 138–147.
- Youn, H.D., Chil Hah, Y., Kang, S.O., 1995. Role of laccase in lignin degradation by white rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 183–188.
- Young, G.H.F., Bale, R.J., Loader, N.J., Mccarroll, D., Nayling, N., Vousden, N., 2012. Central England temperature since AD 1850: the potential of stable carbon isotopes in British oak trees to reconstruct past summer temperatures. *J. Quat. Sci.* 27, 606–614.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101–1108.
- Zanetti, F., Nguyen Tu, T.T., Bertini, A., Egasse, C., Derenne, S., Broutin, J., 2007. Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. II. Leaf lipids of Pliocene *Fagus* from the Upper Valdarno Basin, central Italy. *C. r. Palévol* 6, 515–525.
- Zech, M., Pedentchouk, N., Buggle, B., Leiber, K., Kalbitz, K., Marković, S.B., Glaser, B., 2011. Effect of leaf litter degradation and seasonality on D/H isotope ratios of n-alkane biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 4917–4928.
- Zeller, B., Brechet, C., Maurice, J.-P., Le Tacon, F., 2007. ¹³C and ¹⁵N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Ann. for. sci.* 64, 419–429.
- Zhao, D., Li, F., Yang, Q., Wang, R., Song, Y., Tao, Y., 2013. The influence of different types of urban land use on soil microbial biomass and functional diversity in Beijing, China. *Soil Use Manag.* 29, 230–239.

Annexes

UMR 7619 METIS *Milieux Environnementaux : Transferts et Interactions dans les hydrosystèmes et les Sols*
Université Pierre & Marie Curie, CC105, 4 place Jussieu, 75 252 Paris cedex 05
Thanh-thuy.Nguyen_tu@upmc.fr / 01 44 27 51 72

Carrière (à 80% de 2009 à 2014)

2014-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maître de Conférences 67^{ème} section <i>Université Pierre & Marie Curie</i> ▪ UMR 7619 METIS (JM Mouchel) - Département Biogéochimie <i>la création de METIS en janvier 2014 s'est faite, entre autres, à partir de l'équipe GOME de BioEMCo</i>
2012-2013	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UMR 7618 BioEMCo Biogéochimie & Ecologie des Milieux Continentaux (L Abbadie) - Equipe GOME
2007-2011	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UMR 7207 CR2P Paléobiodiversité & les Paléoenvironnements (P Janvier & S Sen) <i>la création du CR2P en janvier 2007 s'est faite, entre autres, à partir du LPP</i>
2000-2006	<ul style="list-style-type: none"> ▪ EA 3496 LPP Laboratoire de Paléobotanique & Paléoécologie (J Broutin)
2000	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Post-doctorante Marie Curie de l'Union Européenne <i>Université d'Utrecht (NL)</i> ▪ Département de Géochimie (P van Cappellen) - Groupe de Géochimie Organique

Formation

2013-2015	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formation continue <i>Université Pierre & Marie Curie</i> ▪ Bibliographie : Truc & Astuces de Georef, Pubmed, ISI Web of Science, Bibiométrie, Zotero
2014	<ul style="list-style-type: none"> ▪ S.I.G. : Initiation à ArcGis
2013-2014	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apprendre à apprendre : L'évaluation des étudiants, L'éthique en enseignement supérieur, Favoriser la réussite des étudiants & diminuer l'échec
2008	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Encadrement du projet doctoral
2004-2006	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hygiène & sécurité : Formation ACMO, Utilisation des gaz, Utilisation des solvants
2005	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chimie analytique (<i>Validation de l'UE MC403 du Master de Chimie</i>)
2003-2004	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anglais
2003-2011	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formation pour formateurs à l'insertion professionnelle <i>APEC</i> Le marché de l'emploi, L'entretien de motivation, Les outils de recherche d'emploi (CV & lettre), Le stage première expérience professionnelle
1996-1999	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Doctorat <i>Géochimie & Paléontologie Université Pierre & Marie Curie</i> <i>Etude isotopique et moléculaire de plantes terrestres cénomaniennes : contribution à la reconstitution de l'écologie, de la phylogénie et de la diagenèse de plantes fossiles</i> Directeurs de thèse : A Mariotti, C Largeau & J Broutin
1996	<ul style="list-style-type: none"> ▪ D.E.A. <i>Paléontologie Université Montpellier 2</i> <i>Etude isotopique et moléculaire de plantes terrestres cénomaniennes</i> Directeurs de DEA : A Mariotti, C Largeau & J Broutin
1995	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maîtrise <i>Géodynamique externe Université Paris Sud Orsay</i>
1994	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Licence <i>Sciences de la terre Université Paris Sud Orsay</i>
1991-1993	<ul style="list-style-type: none"> ▪ D.E.U.G. B <i>Sciences de la nature et de la vie Université Paris Sud Orsay</i>

Enseignement (± 206 h/an)

Apparaissent en gris, les enseignements assurés par le passé mais plus actuellement, principalement du fait de leur disparition des maquettes.

L1	▫ Orientation et Insertion Professionnelle 1	TD	<i>Bilan personnel, orientation</i>
	▫ Géosciences 1 : Le système Terre	TD TP	<i>Sédimentologie, minéralogie, etc.</i>
	▫ Enseignante référente	RDV	<i>Entretiens & conseils aux étudiants</i>
	▫ Diversité du vivant	TD TP	<i>Biologie végétale, évolution</i>
	⇒ Mise au point de nouvelles séances : TD Grandes étapes de la vie, TP Eumycètes <u>Co-responsable de l'UE</u> (2004-2005, 2008-2010 / 850 étudiants - 6 ECTS) : actualisation régulière du contenu pédagogique, gestion des plannings enseignants, organisation des examens, sites internet, ...		
L2	▫ Origines de la vie	TD	<i>Méthodologie</i>
	⇒ Mise au point d'un nouveau TD : Analyse critique de documents <u>Co-responsable de l'UE</u> (2002-2005 / 45 étudiants – 3 ECTS) : organisation, planning des enseignants ...		
	▫ Orientation & Insertion Professionnelle 2	TD	<i>Techniques de recherche d'emploi</i>
	<u>Responsable de l'UE</u> (depuis sa création en 2014) : Mise au point des TD, formation des enseignants (2 sessions de 8h), rédaction des fascicules supports de TD pour les enseignants (42 p.), gestion des plannings enseignants, organisation des jurys de soutenances, développement de sites SAKAI pour les enseignants et les étudiants, développement de l'évaluation de l'UE par les étudiants (coll G Piequet)		
	▫ Structures & fonctions des plantes	TD TP	<i>Biologie & physiologie végétale</i>
L3	⇒ Mise au point d'un nouveau TD : Tissus conducteurs & conduction des sèves		
	▫ Biodiversité & Evolution	TD	<i>Biologie végétale, évolution</i>
	⇒ Mise au point de nouveaux TD : Origines de la vie, Diversité des algues, Origine des angiospermes		
	▫ Ecologie & Biogéographie	TD	<i>Ecologie, évolution, biogéographie</i>
	⇒ Mise au point d'un nouveau TD : Phylogénie		
M1	▫ Le projet professionnel	TD	<i>Techniques de recherche d'emploi</i>
	<u>Responsable de l'UE</u> (depuis 2012) : Rédaction des fascicules supports de TD pour les enseignants, gestion des plannings enseignants, organisation des jurys de soutenance, développement de sites SAKAI (ens. & étu.), développement de l'évaluation de l'UE par les étudiants (en collaboration avec G Piequet)		
	▫ Bases scientifiques avancées (LP AGePur)	CM TD TP	<i>Sciences du sol</i>
	⇒ Mise au point de nouveaux CM & TP : Introduction à la pédologie		
	▫ Géologie sédimentaire & Paléobiosphère	CM TD TP	<i>Paléobotanique</i>
M2	⇒ Mise au point de nouveaux CM, TD & TP sur les premières flores continentales		
	▫ Arbres & bois	CM TD TP	<i>Télé-détection, cartographie</i>
	⇒ Mise au point de nouveaux enseignements : Cartographie des formations végétales par télé-détection		
	▫ Orientation et Insertion Professionnelle 3	TD	<i>Techniques de recherche d'emploi</i>
	⇒ Mise au point de nouveaux TD : Les métiers de la recherche publique, Argumentation des qualités <u>Co-responsable de l'UE</u> (2010-2011) : Mise au point des TD, Veille sur le marché de l'emploi		
M2	▫ Isotopie appliquée à l'environnement	CM TD	<i>Géochimie isotopique</i>
	⇒ Mise au point de nouveaux CM & TD : Cycle du carbone & $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique végétale		
M2	▫ Paléoécologie, Paléomagnétisme, Paléo...	CM	<i>Géochimie isotopique</i>
	⇒ Mise au point d'un nouveau cours : Paléoenvironnements & $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique		

Responsabilités scientifiques, administratives et collectives

- Insertion professionnelle**
 - depuis 2012
 - Responsable insertion professionnelle (IP) de la Licence Sciences de la Vie (SDV)
 - ⇒ Participation à l'équipe de mise au point des programmes d'IP (dir. D Piccinini), animation d'un groupe pour la coordination et le développement des enseignements d'IP en licence SDV, chimie et géosciences (avec M Rouelle & C Maître), rendez-vous individuels étudiants pour conseil à l'IP, participation à 2 projets Collèges des Licences SUPER (Edugame ZOOM et Coaching Pour l'International)
 - depuis 2014
 - Responsable de l'UE OIP2 (2VOI1) en L2 SDV
Orientation et Insertion professionnelle 2 (630 étudiants/36 enseignants)
 - ⇒ Mise au point des TD, formation des enseignants (2 sessions de 8h), rédaction des fascicules supports de TD pour les enseignants (48 p.), gestion des plannings enseignants, organisation des jurys de soutenances, développement de sites SAKAI pour les enseignants et les étudiants, développement de l'évaluation de l'UE par les étudiants (en collaboration avec G Piequet)
 - 2012-2015
 - Responsable de l'UE LXIP1 en L3 SDV
Le projet professionnel (420 étudiants/8 enseignants)
 - ⇒ Rédaction des fascicules de TD pour les enseignants, gestion des plannings enseignants, organisation des soutenances, développement de sites SAKAI, évaluation de l'UE (coll. G Piequet)
 - 2010-2012
 - Co-responsable de l'UE MU522 en M1 SDUEE SEP & EBE
Préparer son avenir après un master en écologie et biodiversité (16 étudiants)
- Autres responsabilités en enseignement**
 - 2008-2010
2004-2005
 - Co-responsable de l'UE LV102 en L1 SDV
Diversité du vivant (850 étudiants/50 enseignants)
 - ⇒ Gestion des plannings enseignants, organisation des TD, TP, contrôles, examens...
 - 2002-2004
 - Co-responsable d'une UE de méthodologie en 1^{ère} année de DEUG SDV
Origines de la vie (45 étudiants/6 enseignants)
 - ⇒ Gestion des plannings enseignants, sélections des articles, organisation des soutenances etc.
- Conseils de l'UFR 927 / Faculté de Biologie**
 - 2012-2014
 - Nommée au conseil des enseignements
 - 2012-2014
 - Responsable de la division des enseignements en insertion professionnelle
 - 2009-2013
 - Elue au conseil d'administration et conseil des enseignements
- depuis 2005
 - **Elue aux comités de sélection / commissions de spécialistes** (67^{ème} section)
9 concours MCF + 11 concours ATER
- Elue au conseil d'administration de la Société Française des Isotopes**
 - depuis 2012
 - Secrétaire adjointe
 - 2005-2008
 - Administratrice du site internet
- Expertise scientifique**
 - Revues : *Organic Geochemistry, Palaios, Soil Biology and Biochemistry*
 - Organismes de recherche : *American Chemical Society, National Science Foundation, INSU*
 - Thèse : examinatrice d'Abel BARRAL CUESTA (2016, U Lyon)

Activités de Recherche

▪ Thématique principale :

Devenir de la matière organique végétale dans l'environnement

Reconstitution des sources, des environnements de formation et des processus de transformation de la matière organique dans les environnements continentaux actuels et passés, par les outils de la biogéochimie isotopique et moléculaire

2016

▪ **Marqueurs biogéochimiques de l'occupation des sols**

Mise au point d'un référentiel sur la réserve culturelle de Linné-Råshult (Suède)

→ projet PEPS paysages CNRS-INEE dirigé par A Dufraisse

De l'arbre à la forêt domestiquée : pratiques de gestion et systèmes agroforestiers.

⇒ Etude en cours visant à tester la pertinence des teneurs en P, Ca, Mg, N, C, ¹⁵N, ¹³C et stéroïdes fécaux pour diagnostiquer les types d'occupation des sols anciens (prairies, champs, pâturages, potagers, etc.)

2015-2016

▪ **Rôle de la matière organique sur le transfert du radium à l'interface sol-plante**

→ projet NEEDS Défis Interdisciplinaires CNRS dirigé par S Rihs

Cycle biogéochimique du radium

⇒ Mise au point d'un protocole d'analyse séquentielle des sols permettant la caractérisation conjointe de la matière organique et du radium présents dans les différentes fractions chimiques des sols

▪ **Effets de la carbonisation sur les rapports ¹³C/¹²C (¹⁸O/¹⁶O et ¹⁵N/¹⁴N) du bois :**

Test de l'utilisation des rapports isotopiques en anthracologie (expérimentation & applications archéo.)

2016

→ projet INTERRVIE INSU co-dirigé par TT Nguyen Tu & A Dufraisse

Dendroclimatologie isotopique sur charbons de bois (fossiles) : Cadrage méthodologique

2015-2016

→ projet CARESE Sorbonne-SU co-dirigé par TT Nguyen Tu & A Dufraisse

Gestion forestière et climats au Néolithique : Approche dendro-isotopique sur charbons de bois

2015-2017

→ accompagnement doctoral MATISSE co-dirigé par TT Nguyen Tu & A Dufraisse

Composition isotopique des charbons de bois anciens :

Cadrage méthodologique pour application paléoclimatique

2011-2015

→ projet ANR JC DENDRAC dirigé par A Dufraisse

Développement d'outils dendrométriques appliqués à l'anthracologie :

étude des relations homme-ressources-environnement

⇒ **AC19**,
OI11, PI25, PI29, ON5

⇒ Mise en évidence d'un effet significatif du feu sur la composition isotopique du bois

⇒ Développement d'un nouvel outil de caractérisation des paléoclimats basé sur la différence de composition isotopique du bois de printemps et du bois d'été dans les charbons archéologiques

2015-2016

▪ **Interactions brome-matière organique dans l'estuaire de la Seine**

→ collaboration A Murat

⇒ Identification de composés organo-bromés et biomarqueurs végétaux associés dans les sédiments

2013-2016

▪ **Biomarqueurs lipidiques du tannage artisanal :**

Contribution à la reconstitution des processus de tannage à l'époque romaine

→ projet PAS INRAP MiGéMOS dirigé par C Cammas

Micromorphologie & Géochimie des Matières Organiques des Sols archéologiques

⇒ Identification d'un cortège de biomolécules caractéristiques du tannage

⇒ Diagnostic d'une fosse romaine énigmatique comme fosse de tannage grâce aux biomarqueurs

⇒ **AP2**,
PI22, PI20, ON4, PN6,
PN4

2014-2015

⇒ AP1,
PI30

▪ **Taphonomie organique de gisements jurassiques à dinosaures à plumes**

→ projet Institut royal des Sciences naturelles de Bruxelles dirigé par J Yans

Taphonomie intégrée de gisements fossilifères exceptionnels

⇒ L'exceptionnelle préservation morphologique des fossiles étudiés n'est pas associée à une bonne préservation de leur composition chimique

2013-2015

⇒ AC17,
OI12, PI27, PI28

▪ **Effet des vers de terre sur le devenir des lipides des sols :**

Incubations contrôlées d'herbacées marquées au ¹³C, avec ou sans lombrics

→ projet EC2CO BIOHEFECT dirigé par K Quénéa

*Suivi de l'incorporation de la matière organique dans les agrégats biogéniques :
Implication dans la protection du carbone des sols*

⇒ Les lombrics favorisent l'intégration de carbone issu de matière organique fraîche dans les lipides microbiens, à l'instar de ce qui est observé sur le sol total

2012-2014

⇒ AC15, AC16,
OI10, PI31, PI26, PI24,
PN5

▪ **Effets de la dégradation sur les rapports ¹³C/¹²C et ¹⁵N/¹⁴N du bois :**

Comparaisons de données fossiles et expérimentales (incubations contrôlées en laboratoire)

→ projet Emergence UPMC PALÉONITROGEN dirigée par J Schnyder

Test de l'utilisation des rapports ¹⁵N/¹⁴N comme marqueur paléoclimatique dans les matières organiques sédimentaires terrestres pré-quatennaires

⇒ Contrairement au ¹³C/¹²C, la signature ¹⁵N/¹⁴N des macrorestes végétaux intègre également une composante microbienne significative

2007-2011

⇒ AC13,
OI8, OI9, PI18, PI16,
PI15, PN3

▪ **Caractérisation isotopique et moléculaire des lipides de sols tempérés & tropicaux de 2 chronoséquences C₃/C₄**

→ projet ANR blanche DynaMOS dirigée par C Hatté

Dynamique Moléculaire du carbone Organique dans les Sols

⇒ La plantation d'eucalyptus sur des sols de savane (Congo) conduit à des modifications significatives de la dynamique des lipides dans les sols

2003-2007

⇒ AC18, AC12, AC11,
AC9, AC8,
OI7, OI6, OI10, PI21,
PI19, PI13, PI26, PI24,
PN2

▪ **Dégradation de feuilles enrichies en ¹³C en milieu naturel contrôlé :**

Validation de biomarqueurs par suivi de la composition chimique et isotopique de débris végétaux

→ projet ACI Jeune Chercheur dirigée par TT Nguyen Tu

→ Délégation CNRS 2005-2006

⇒ Les lipides à longue chaîne, considérés comme typiques des végétaux, intègrent dans les sols une contribution fongique significative

⇒ Attention : le marquage des végétaux au ¹³C peut conduire à une forte hétérogénéité du signal isotopique dans les tissus végétaux

▪ **Collaborations scientifiques :**

▫ **Internationales :**

Johan Yans

Université Namur

Dinosaures fossiles

Adele Bertini

Université Florence

Hêtres fossiles

▫ **Nationales :**

Bernd Zeller & Marie-Pierre Turpault

INRA Nancy

Sacs de litière

Sophie Rihs & François Chabaux

Université Strasbourg

Radio-isotopes

Thierry Bariac & Philippe Biron

AgroParisTech

Marquage au ¹³C

Mercedes Mendez-Millan

IRD Bondy

Analyses ¹³C alcanes

Cecilia Cammas & Raphaël Clotuche

INRAP Paris

Tannage archéologique

Alexa Dufraisse

MNHN

Dendro-anthracologie

Johann Schnyder

UPMC

Sédimentologie

- 2012-2015
 - **Missions de terrain :**
 - **Echantillonnage de sédiments archéologiques**
Chantiers archéologiques de Chateaubleau (77), Saint-Denis (93) et de Famars (59)
- 2004-2016
 - **Mise en place et suivi d'expériences de dégradation en sacs de litière**
Site atelier de la forêt de Breuil-Chenue (89)
Observatoire Pérenne de l'Environnement (55)
- 1999-2006
 - **Echantillonnage de plantes fossiles**
Sites fossilifères d'Anjou (49), du Valdarno (Italie) et de Bohême (République Tchèque)

AP : article en préparation
 AC : article dans revue indexée
 OI : oral en congrès international
 PI : poster en congrès international
 ON : oral en congrès national
 PN : poster en congrès national

(co-) Encadrement de travaux de recherche

- 2015-2018
 - **Doctorat** (% d'encadrement des doctorants)
 - Eric Lascar (10%) → bourse de thèse IRNS & ANDRA / ED 413 (STE) U Strasbourg
Comportement du radium et ses ascendants radioactifs dans les sols et les plantes
- 2014-2017
 ⇒ AC19, OI11, PI25, PI29, ON5
 - Franck Baton (50%) → bourse de thèse MESRT / ED 398 (GRNE) UPMC
Dendroclimatologie isotopique sur charbons de bois archéologiques : Cadrage méthodologique
- 2014-2017
 ⇒ AP1, P30
 - Aude Cincotta (10%) → bourse Institut royal des Sciences Naturelles de Bruxelles
Taphonomie intégrée de gisements fossilifères exceptionnels
- 2012-2015
 ⇒ AC15, AC17, OI10, PI31, PI24, PI 26, PN5
 - Romain Tramoy (25%) → bourse de thèse Emergence / ED 398 (GRNE) UPMC
Tester les isotopes stables de l'azote des matières organiques fossiles terrestres comme marqueur paléoclimatique sur des séries pré-quatennaires
- 2006-2009
 ⇒ AC18, AC8, OI6, PI14, PN2
 - Florent Zanetti (80%) → bourse de thèse MESRT / thèse non soutenue
Taphonomie moléculaire expérimentale : devenir de lipides végétaux en milieu aquatique
- 2003
 - Jakub Sakala (10%) → financement PAI Barrande (MAE) pour les déplacements
Formations végétales du Tertiaire de Bohême : Etude géochimique et paléobotanique intégrée
- 2002
 ⇒ PI7, PI11
 - Martine Berthelin (10%) → financement IFR101 et ECLIPSE pour les analyses
Chimiotaxonomie de végétaux fossiles énigmatiques : les Gigantonomiales
- 2014-2015
 - **Master**
 - Elise Canolle → M1 SDUEE UPMC : Environnements Continentaux & Hydrosphère
Devenir de la matière organique aérienne et racinaire dans un sol sous influence de vers de terre
- 2013-2014
 ⇒ AC19, OI11, PI25, PI29, ON5
 - Alexandre Delorme → M2 SDUEE UPMC : Géosciences
Reconstitutions paléoclimatiques basées sur la composition isotopique des charbons de bois archéologiques
- 2007-2008
 - Azdine Ravin → M2 SDUEE UPMC : Géosciences
Pétrographie et géochimie organique d'un gisement fossilifère crétacé
- 2006-2007
 - Sébastien Bégé → M2 SDUEE UPMC : Environnements Continentaux & Hydrosphère
Effets de la dégradation sur la composition macromoléculaire de litières végétales

- 2005-2006
⇒ AC8
- Florent Zanetti → M2 SDUEE UPMC : Systématique, Evolution & Paléontologie
Diagenèse et chimiotaxonomie des hydrocarbures de hêtres actuels et fossiles
- 2004-2005
- Thomas Silberfeld → M1 SDUEE UPMC : Systématique, Evolution & Paléontologie
Géochimie organique d'un gisement fossilifère oligocène : Applications paléoenvironnementales
- 2003-2004
- Aurélie Kriloff → M1 SDUEE UPMC : Systématique, Evolution & Paléontologie
Dendroclimatologie isotopique d'un bois de Taxodiacee du Miocène de l'Ardèche
- Licence & BTS**
- 2016
- Nadège Grisat → DU Archéologie Université d'Amiens
Biomarqueurs moléculaires de fosses énigmatiques du site gallo-romain de Chateaubleau
- 2012-2013
⇒ AP2, PI22
- Thomas Rebaud → L3 Licence chimie UPMC (Stage volontaire)
Reconstitution du tannage à l'époque romaine : approche intégrée
- 2012-2013
- Marine Lubin → BTS Chimie Gennevilliers (Stage professionnel)
Analyses isotopiques et chimiques des plantes marquées au carbone 13
- 2012-2013
- Blandine Broquet → L2 Licence Biologie Université Paris Sud
Analyses isotopiques et chimiques des plantes marquées au carbone 13
- 2012-2013
⇒ PI22, ON4
- Katia Grira → L3 Licence chimie UPMC (UE équivalente à 3C025 actuel)
Caractérisation des lipides contenus dans des échantillons archéologiques
- 2012-2013
⇒ ON4, PI20
- Marion Plessis → L3 Licence pro. Biotechnologie UPMC (Projet tutoré)
Extraction & caractérisation des lipides contenus dans des échantillons archéologiques
- 2011-2012
⇒ PI21, PI19
- Katia Grira → L3 Licence chimie UPMC (Stage volontaire)
Analyses chimiques et isotopiques de sols et de plantes issus d'une expérience de marquage au ¹³C
- Personnel titulaire & contractuel**
- depuis 2015
- Amélie Guittet → Technicienne UPMC OSU affectée à temps partiel à METIS
Broyage & tamisage d'échantillons sédimentaires, extraction et fractionnement des lipides
- 2009-2010
- Céline Egasse → IE CDD 14 mois projet ANR *DynaMOS*
Préparation d'échantillons végétaux & pédologiques, extraction et analyses des lipides
- 2007-2010
- Brigitte David → Technicienne CNRS affectée au CR2P
Broyage & tamisage d'échantillons végétaux, extraction et fractionnement des lipides
- 2007
- Stéphane Lemettre → AI CDD 3 mois projet ACI *Dégradation de feuilles ...*
Préparation d'échantillons végétaux, extraction et analyses des lipides
- 2005-2006
- Céline Egasse → AI CDD 15 mois projet ACI *Dégradation de feuilles ...*
Préparation d'échantillons végétaux, extraction et analyses des lipides

Publications

(IF 2015)
 code publication

en préparation
 (2,255)
 AP2

en préparation
 (2,959)
 AP1

accepté
 (2,067)
 AC19

2017
 (2,990)
 AC18

2017
 (2,855)
 AC17

2017
 (2,455)
 AC16

2016
 (2,525)
 AC15

2014
 (1,610)
 AC14

2014
 (3,407)
 AC13

2013
 (2,226)
 AC12

2011
 (4,152)
 AC11

2009
 (2,339)
 AC10

2007
 (1,047)
 AC9

2007
 (1,047)
 AC8

2004
 (2,525)
 AC7

▪ Articles dans revues indexées : 19 + 2

Cammas C, **Nguyen Tu TT**, Clotuche R, *Rebaud T*, Goret JF & Derenne S. Organic matter from archeological tanning pits : First insights from combined micromorphology and lipid biomarkers. *Journal of Archaeological Sciences*.

Cincotta A, **Nguyen Tu TT**, Colaux JL, Terwagne G, Derenne S, Godefroit P, Anquetil C & Yans J. Chemical taphonomy of morphologically preserved feathers from a maniraptoran dinosaur : a multi-technique approach. *Paleobiology*.

Baton F, **Nguyen Tu TT**, Derenne S, *Delorme A*, Delarue F & Dufraisse A. Tree-ring $\delta^{13}\text{C}$ of archeological charcoals as indicator of past climatic seasonality. A case study from the Neolithic settlements of Lake Chalain (Jura, France). *Quaternary International*.

Nguyen Tu TT, Egasse C, Anquetil C, *Zanetti F*, Zeller B, Huon S & Derenne S. Leaf lipid degradation in soils and surface sediments : A litterbag experiment. *Organic Geochemistry* **104** : 35-41.

Vidal A, Quénéa K, Alexis M, **Nguyen Tu TT**, Mathieu J, Vaury V & Derenne S. Fate of ^{13}C labelled root and shoot residues in soil and anecic earthworm casts: a mesocosm experiment. *Geoderma* **285** : 9-18.

Tramoy R, Sebilo M, **Nguyen Tu TT** & Schnyder J. Carbon and Nitrogen dynamics in decaying wood: paleoenvironmental implications. *Environmental Chemistry* **14** : 9-18.

Tramoy R, Schnyder J, **Nguyen Tu TT**, Yans J, Jacob J, Sebilo M, Derenne S, Philippe M, Pons D, Ensebaiev T & Baudin F. The Pliensbachian-Toarcian paleoclimate transition: New insights from organic geochemistry and C, H, N isotopes in a continental section from central Asia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **461** : 310-327.

Derenne S & **Nguyen Tu TT**. Characterizing the molecular structure of organic matter from natural environments : An analytical challenge. *Comptes Rendus Geoscience* **346** : 53-63.

Mendez-Millan M, **Nguyen Tu TT**, Balesdent J, Derenne S, Derrien D, Egasse C, Thongo A, Zeller B & Hatté C. Compound-specific ^{13}C and ^{14}C measurements improve the understanding of soil organic matter dynamics. *Biogeochemistry* **118** : 205-223.

Nguyen Tu TT, Biron P, Maseyk K, Richard P, Zeller B, Quénéa K, Alexis M, Bardoux G, Vaury V, Girardin C, Pouteau V, Billiou D & Bariac T. Variability of ^{13}C -labeling in plant leaves. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **27** : 1961-1968.

Nguyen Tu TT, Egasse C, Zeller B, Bardoux G, Biron P, David B & Derenne S. Early degradation of plant alkanes in soils: a field experiment using ^{13}C -labelled leaves. *Soil Biology and Biochemistry* **43** : 2222-2228.

Schnyder J, Dejax J, Keppens E, **Nguyen Tu TT**, Spagna P, Boulila S, Galbrun B, Riboulleau A, Tshibangu JP & Yans J. An Early Cretaceous lacustrine record: Organic matter and organic carbon isotopes at Bernissart (Mons Basin, Belgium). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **281** : 79-91.

Nguyen Tu TT, Egasse C, Zeller B & Derenne S. Chemotaxonomical investigation of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *Comptes Rendus Palevol* **6** : 451-461.

Zanetti F, **Nguyen Tu TT**, Bertini A, Egasse C, Derenne S & Broutin J. Chemotaxonomical investigation of fossil and extant beeches. II. Leaf lipids of Pliocene *Fagus* from the Upper Valdarno Basin, central Italy. *Comptes Rendus Palevol* **6** : 515-525.

Nguyen Tu TT, Kürschner WM, Schouten S, van Bergen P. Leaf carbon isotope composition of fossil and extant oaks grown under differing atmospheric CO_2 levels. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **212** : 199-213.

- 2004
(2,990)
AC6
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Bardoux G & Mariotti A. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes.
Organic Geochemistry **35** : 317-329.
- 2003
(2,158)
AC5
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Mariotti A & Bocherens H. Comparison of leaf lipids from a fossil ginkgoalean plant and its extant counterpart at two degradation stages: diagenetic and chemotaxonomic implications.
Review of Palaeobotany and Palynology **124** : 63-78.
- 2002
(2,525)
AC4
Nguyen Tu TT, Kvaček J, Uličný D, Bocherens H, Mariotti A & Broutin J. Isotope reconstruction of plant palaeoecology : Case study of Cenomanian floras from Bohemia.
Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology **183** : 43-70.
- 2001
(2,990)
AC3
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Mariotti A & Bocherens H. Evolution of the chemical composition of *Ginkgo biloba* internal and external leaf lipids through the early stages of degradation. *Organic Geochemistry* **32** : 45-55.
- 2000
(2,990)
AC2
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Bocherens H, Mariotti A & Pons D. Effect of fungal infection on extract composition of higher plant remains. Analysis of shoots of a Cenomanian conifer invaded by extinct fungi.
Organic Geochemistry **31** : 1743-1754.
- 1999
(2,525)
AC1
Nguyen Tu TT, Bocherens H, Mariotti A, Baudin F, Pons D, Broutin J, Derenne S & Largeau C. Ecological distribution of Cenomanian terrestrial plants based on ¹³C/¹²C ratios. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **145** : 79-93.
- **Articles dans revues françaises spécialisées : 3**
- 2015
Nguyen Tu TT. Biogéochimie des plantes fossiles.
Géochronique **134** : 25-28.
- 2007
Nguyen Tu TT. La MO à la recherche de ses origines.
Géochronique **104** : 31-32.
- 2000
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Pons D, Broutin J, Mariotti A & Bocherens H. Les lipides des plantes fossiles dans leur rapport avec les plantes actuelles : Exemples des paléoflores cénomaniennes d'Anjou et de Bohême.
Journal de la Société de Biologie **194** : 57-64.
- **Vulgarisation : 1 article + 3 chapitres de livre**
- 2001
Nguyen Tu TT & Peigné S.
L'invasion verte, La saga des enfants d'*Elkinsia*, Quand la planète fleurit.
3 chapitres du livre *La fabuleuse histoire de la terre*
Coordinateur ; JM Mazin, Editions du Reader Digest
- 1999
Nguyen Tu TT & Bocherens H. La résistance des Ginkgos.
Pour la Science **259** : 23-24.

Communications en congrès internationaux

- **Conférences invitées : 2**
- 2015
Nguyen Tu TT. Can ¹³C signal in ancient waxes document past environments ?
Insights from soil experiments and fossil plants.
Plant waxes 2015 (16-20 Juin, Ascona, Suisse)
- 2005
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Bardoux C & Mariotti A. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes.
15th Annual V.M. Goldschmidt Conference (20-25 Mai, Moscow, Idaho, U.S.A.)
Geochimica et Cosmochimica Acta **69** (10S), A344

▪ **Communications orales : 12**

- 2015
OI12 Vidal A, Quénéa K, Alexis M, **Nguyen Tu TT**, Vaury V, Anquetil C & Derenne S. Incorporation of ^{13}C labelled root-shoot residues in soil in the presence of *Lumbricus terrestris* - An isotopic and molecular approach. 5th *International Symposium on soil organic matter* (20-24 septembre, Göttingen, Allemagne) O2.1.02
- 2015
OI11 Baton F, Dufraisse A, Lemoine M, Vaury V, Derenne S, Delorme A & **Nguyen Tu TT**. Effects of oxygenated carbonization on the isotope signal in tree rings. Implication for ancient charcoals. 6th *International Anthracology Meeting* (30 août-6 septembre, Freiburg, Allemagne).
- 2015
OI10 Tramoy R, Schnyder J, **Nguyen Tu TT**, Yans J, Jacob J, Sebilo M, Derenne S & Baudin F. Paleoclimatic changes at the Pliensbachien-Toarcien transition recorded by δD of *n*-alkanes and $\delta^{15}\text{N}_{\text{org}}$ in a continental section of central Asia. *European Geosciences Union General Assembly 2015* (12-17 Avril, Vienne, Autriche) EGU2015-11718-2
- 2012
OI9 Elegbede CF, Derrien D, **Nguyen Tu TT**, Mendez-Millan M, Hatté C & Balesdent J. Scaling down to molecules to model soil organic matter dynamics : Application to carbohydrates and lipids. *Eurosoil 2012* (2-6 Juillet, Bari, Italie), S07.03a-1
- 2012
OI8 Mendez-Millan M, **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Derenne S, Derrien D, Zeller B, Balesdent J & Hatté C. Compound-specific ^{13}C & ^{14}C analysis of soil lipids along a savanna (*C₄*)/eucalyptus (*C₃*) chronosequence (Pointe-Noire, Congo) : New insights to resolve soil organic carbon dynamics (DynaMOS ANR-project). *Eurosoil 2012* (2-6 Juillet, Bari, Italie), S07.03a-2
- 2008
OI7 **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Zeller B, Bardoux G, Biron P, Richard P, Lemettre S, Bariac T & Derenne S. Early degradation of plant lipids in soil : A field experiment using ^{13}C -labelled leaves. *European Geosciences Union General Assembly 2008* (13-18 Avril, Vienne, Autriche) EGU2008-A-01863
- 2007
OI6 **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Zeller B, Bardoux G, Biron P, Richard P, Lemettre S, Zanetti F, Bariac T & Derenne S. Early degradation of plant lipids in soil : A field experiment using ^{13}C -labelled leaves. 23rd *International Meeting on Organic Geochemistry* (9-14 Septembre, Torquay, Royaume-Uni), O72, Book of abstracts 1061-1062
- 2001
OI5 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Bocherens H, Mariotti A & Pons D. Effect of fungal infection on extract composition of higher plant remains. 21st *American Chemical Society National Meeting* (1-5 Avril, San Diego, U.S.A.), paper 74
- 2000
OI4 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Mariotti A & Bocherens H. Early and late diagenesis of the isotopic signal of individual *n*-alkanes in higher plant remains *British Organic Geochemical Society* (5-7 Juillet, Bristol, Royaume- Uni), abstract 16
- 1999
OI3 **Nguyen Tu TT**, Mariotti A, Bocherens H, Derenne S, Largeau C, Pons D & Broutin J. Isotopic analysis of individual compounds: a reliable tool to investigate fossil plant isotopic signal. 19th *International Meeting on Organic Geochemistry* (6-10 Septembre 1999, Istanbul, Turquie), Abstracts Part I, 95-96
- 1999
OI2 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Bocherens H, Mariotti A & Pons D. Effect of fungal infection on extract composition of higher plant remains. 19th *International Meeting on Organic Geochemistry* (6-10 Septembre 1999, Istanbul, Turquie), Abstracts Part II, 555-556
- 1997
OI1 **Nguyen Tu TT**, Bocherens H, Mariotti A, Derenne S, Largeau C, Pons D & Broutin J. Bulk and molecular preservation of the isotopic signal in Cenomanian terrestrial plants. 8th *Plant Taphonomy Meeting* (15-16 Novembre 1997, Cardiff, Royaume-Uni)

▪ **Affiches : 29**

- soumis
PI31 *Tramoy R*, Nguyen Tu TT, Vaury V, Sebilo M, Millot Cornette L, Roose-Amsaleg C, Schnyder J. Effects of early diagenesis on the isotopic signature of wood. Incubations in aquatic microcosm. *28th International Meeting on Organic Geochemistry* (17-22 Septembre, Florence, Italie).
- soumis
PI30 *Cincotta A*, **Nguyen Tu TT**, Colaux J, Terwagne G, Derenne S, Godefroit P, Anquetil C & Yans J. Chemical taphonomy of a well-preserved fossil of feathered dinosaur: A multi-technique approach. *28th International Meeting on Organic Geochemistry* (17-22 Septembre, Florence, Italie).
- 2016
PI29 *Baton F*, Dufraisse A, Lemoine M, Vaury V, Derenne S, *Delorme A* & **Nguyen Tu TT**. Effects of oxygenated carbonization on the isotope signal in tree rings. Implication for ancient charcoals. *Joint European Stable Isotopes Users Meeting 2016* (4-9 Septembre, Ghent, Belgique), Book of abstracts, 242.
- 2016
PI28 *Vidal A*, Alexis M, **Nguyen Tu TT**, Anquetil C, Vaury V, Derenne S & Quénéa Q. Incorporation of ¹³C labelled root-shoot residues in soil in the presence of *Lumbricus terrestris*: An isotopic and molecular approach. *European Geosciences Union General Assembly 2016* (17-22 Avril, Vienne, Autriche), EGU2016-2659.
- 2015
PI27 Vidal A, Quénéa K, Alexis M, **Nguyen Tu TT**, Vaury V, Anquetil C & Derenne S. Incorporation of ¹³C labelled litter in the soil in the presence of earthworms : An isotopic and molecular approach. *27th International Meeting on Organic Geochemistry* (13-18 Septembre, Prague, République Tchèque), E1034.
- 2015
PI26 *Tramoy R*, Schnyder J, **Nguyen Tu TT**, Yans J, Jacob J, Sebilo M, Derenne S & Baudin F. Paleoclimatic changes recorded by δD of *n*-alkanes and δ¹⁵Norg in a continental section of central Asia (Early Jurassic). *27th International Meeting on Organic Geochemistry* (13-18 Septembre, Prague, République Tchèque), E1180.
- 2015
PI25 *Baton F*, Dufraisse A, Lemoine M, Vaury V, Derenne S, *Delorme A* & **Nguyen Tu TT**. Effects of oxygenated carbonization on the isotope signal in tree rings. Implication for ancient charcoals. *27th International Meeting on Organic Geochemistry* (13-18 Septembre, Prague, République Tchèque), E1124.
- 2014
PI24 *Tramoy R*, Schnyder J, **Nguyen Tu TT**, Yans J, Storme JY, Sebilo M, Derenne S, Jacob J & Baudin F. Nitrogen isotopes from terrestrial organic matter as new paleoclimatic proxy for pre-Quaternary time. *European Geosciences Union General Assembly 2014* (27 Avril-2 Mai, Vienne, Autriche), EGU2014-15283.
- 2013
PI23 Alexis MA, Quénéa K, **Nguyen Tu TT**, Vaury V, Biron P, Richard P & Bariac T. Consideration of dissolved organic matter in assessment of soil organic matter dynamics through labeling experiment. *26th International Meeting on Organic Geochemistry* (15-20 Septembre, Tenerife, Espagne), Book of abstracts, 497-498.
- 2013
PI22 **Nguyen Tu TT**, Cammas C, *Plessis M*, *Girra K*, Clotuche R, Goret JF & Derenne S. organic matter from archeological tanning pits m: First insights from combined micromorphology & lipid biomarkers. *26th International Meeting on Organic Geochemistry* (15-20 Septembre, Tenerife, Espagne), Book of abstracts, 234-235.
- 2013
PI21 **Nguyen Tu TT**, Biron P, Quénéa K, Alexis M, Richard P, Zeller B, Lett C, Maseyk K, Vaury V, Bardoux G, Pouteau V, Girardin C, Pechot N, Billiou D, *Girra K* & Bariac T. Variability of ¹³C-labeling in plant tissues, implications for biogeochemical studies. *26th International Meeting on Organic Geochemistry* (15-20 Septembre, Tenerife, Espagne), Book of abstracts, 268-269.

- 2013
PI20
Cammas C, **Nguyen Tu TT**, Plessis M, Clotuche R & Derenne S. Human imprint on archaeological anthroposols : first assessment of combined micromorphological, pedological and lipid biomarkers analyses of organic matter.
European Geosciences Union General Assembly 2013 (7-12 Avril, Vienne, Autriche) EGU2013-11982
- 2012
PI19
Nguyen Tu TT, Biron P, Richard P, Quénéa K, Alexis M, Zeller B, Lett C, Maseyk K, Vaury V, Bardoux G, Pouteau V, Girardin C, Pechot N, Billiou D, Grira K & Bariac T. Variability of ¹³C-labeling in plant tissues, implications for biogeochemical studies.
Joint European Stable Isotopes Users Meeting 2012 (2-7 Septembre, Leipzig, Allemagne), Abstract Book, 180.
- 2012
PI18
Mendez-Millan M, **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Derenne S, Derrien D, Zeller N, Balesdent J, Hatté C. Compound-specific ¹³C & ¹⁴C analysis of soil lipids along a savanna (C₄)/eucalyptus (C₃) chronosequence (Pointe-Noire, Congo) : New insights to resolve soil organic carbon dynamics (DynaMOS ANR-project).
Radiocarbon 2012 (9-13 juin, Paris, France), S14-P313.
- 2012
PI17
Quénéa K, **Nguyen Tu TT** & Alexis M. Variability of ¹³C-labeling in plant tissues.
Eurosoil 2012 (2-6 Juillet, Bari, Italie), S07.01-P27.
- 2011
PI16
Nguyen Tu TT, Mendez-Millan M, Egasse C, Derenne S, Zeller B, Derrien D, Jacob J & Hatté C. Molecular and isotopic characterization of soil lipids in a savannah (C₄)/eucalyptus (C₃) chronosequence (Pointe-Noire, Congo).
25th International Meeting on Organic Geochemistry (18-23 Septembre, Interlaken, Suisse), P498.
- 2010
PI15
Mendez-Millan M, **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Derenne S, Derrien D, Zeller N, Balesdent J, Hatté C. Molecular DYNAMics of Soil Organic carbon (DYNAMOS) : a project focusing on soils and carbon through data and modeling.
European Geosciences Union General Assembly 2010 (2-7 Mai, Vienne, Autriche), EGU2010-9877-1.
- 2009
PI14
Zanetti F, Broutin J, Huon S, Derenne S & **Nguyen Tu TT**. Early diagenesis of leaf lipids in an oligotrophic lake. *24th International Meeting on Organic Geochemistry* (6-11 Septembre, Brême, Allemagne), P57.
- 2008
PI13
Nguyen Tu TT, Egasse C, Zeller B, Bardoux G, Biron P, Richard P, Bariac T & Derenne S. Early degradation of plant lipids in soil : A field experiment using ¹³C-labelled leaves.
Joint European Stable Isotopes Users Meeting 2008 (31 Août-5 Septembre, Presqu'île de Giens, France), 4-P157.
- 2003
PI12
Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Bardoux C & Mariotti A. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes.
21st International Meeting on Organic Geochemistry (8-12 Septembre, Cracovie, Pologne), Book of Abstracts – Part II, 331
- 2002
PI11
Berthelin M, **Nguyen Tu TT**, Broutin J, Derenne S, Largeau C & Baudin F. Chemical characterization of Permian fossil Gigantopteridalean leaves: geochemical and taxinomial implications.
6th European Paleobotany – Palynology Conference (29 Août – 2 Septembre, Athènes, Grèce), Book of Abstracts, 200-201.
- 2002
PI10
Nguyen Tu TT, Kvaček J, Uličný D, Bocherens H, Mariotti A & Broutin J. Isotope reconstruction of plant Palaeoecology - Case study of Cenomanian floras from Bohemia.
6th European Paleobotany – Palynology Conference (29 Août – 2 Septembre, Athènes, Grèce), Book of Abstracts, 229-230.
- 2001
PI9
Nguyen Tu TT, van Bergen P & Kürschner WM. Exceptional chemical preservation of Miocene fossil oaks.
20th International Meeting on Organic Geochemistry (10-14 Septembre, Nancy, France), Abstracts Volume 1, 245-246.
- 2001
PI8
Nguyen Tu TT, van Bergen P, Kürschner WM & Schouten S. Can plant carbon isotope composition record long term variations in atmospheric CO₂ levels ? Stable carbon isotopes of Miocene oak leaves as a case study.
20th International Meeting on Organic Geochemistry (10-14 Septembre, Nancy, France), Abstracts Volume 1, 304-305.

- 2001
PI7 **Berthelin M, Nguyen Tu TT**, Broutin J, Derenne S, Largeau C & Baudin F. Chemical characterization of Permian fossil Gigantopteridalean leaves: geochemical and taxinomial implications. *20th International Meeting on Organic Geochemistry* (10-14 Septembre, Nancy, France), Abstracts Volume 2, 117-118.
- 1999
PI6 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Bocherens H, Mariotti A & Pons D. Effect of fungal infection on extract composition of higher plant remains. *19th International Meeting on Organic Geochemistry* (6-10 Septembre 1999, Istanbul, Turquie), Abstracts Part II, 555-556.
- 1999
PI5 **Nguyen Tu TT**, Mariotti A, Bocherens H, Derenne S, Largeau C, Pons D, Broutin J & Bardoux G. Isotopic analysis of individual compounds: a reliable tool to investigate fossil plant isotopic signal. *Annual meeting of the Stable Isotope Mass Spectrometry Users group* (19-20 Janvier, Exeter, Royaume-Uni), Book of Abstracts, 69-70.
- 1998
PI4 **Nguyen Tu TT**. Lipids of *Frenelopsis alata*, chemical evidence of lignolytic activity of fossil fungi. *9th Plant Taphonomy Meeting* (21-22 Novembre, Utrecht, Pays-Bas).
- 1998
PI3 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Mariotti A & Bocherens H. Comparison of leaf lipids from a fossil Ginkgoale and its modern equivalent at two degradation stages. *8th annual V.M. Goldschmidt Conference* (30 Août- 3 Septembre, Toulouse, France), Mineralogical Magazine 62A(2), 1081-1082.
- 1998
PI2 **Nguyen Tu TT**, Mariotti A, Bocherens H, Derenne S, Largeau C, Pons D & Broutin J. Isotopic analysis of individual compounds: a tool to investigate fossil plant isotopic signal. *8th annual V.M. Goldschmidt Conference* (30 Août- 3 Septembre, Toulouse, France), Mineralogical Magazine 62A(2), 1079-1080.
- 1997
PI1 **Nguyen Tu TT**, Bocherens H, Mariotti A, Derenne S, Largeau C, Pons D & Broutin J. Isotopic and molecular studies of Cenomanian terrestrial higher plants: paleoenvironmental implications. *18th International Meeting on Organic Geochemistry* (22-26 Septembre, Maastricht, Pays-Bas), Abstracts Part II, 843-844.

Communications en congrès nationaux

▪ Communications orales : 5

- 2016
ON5 **Baton F**, Dufraisse A, Lemoine M, Vaury V, Derenne S, **Delorme A** & **Nguyen Tu TT**. Dendroclimatologie isotopique sur charbon de bois archéologique : cadrage méthodologique. *3^{ème} réunion des chercheurs francophone en géochimie organique*, (7-8 juillet, Poitiers)
- 2013
ON4 **Nguyen Tu TT**, Cammas C, Clotuche R, Goret JF, Teyssie G, **Plessis M**, **Griira K**, **Rebaud T** & Derenne S. Apport de l'étude de la matière organique de sédiments archéologiques à la reconstitution du tannage. *14^{ème} Congrès français de sédimentologie* (4-8 Novembre, Paris), Livre des résumés, 301.
- 2001
ON3 **Nguyen Tu TT**, Derenne S, Largeau C, Pons D, Broutin J, Mariotti A & Bocherens H. Les lipides des plantes fossiles dans leurs rapports avec les plantes actuelles. *12^{ème} Colloque de l'Organisation Francophone de Paléobotanique* (11-12 Octobre, Lichtenberg), Résumés, 38.
- 1999
ON2 **Nguyen Tu TT**, Broutin J, Pons D, Bocherens H, Mariotti A, Derenne S & Largeau C. Les lipides des plantes fossiles dans leurs rapports avec les plantes actuelles. Exemples des paléoflores cénomaniennes d'Anjou et de Bohême. *Réunion de la Société Française de Biologie* (15 Décembre, Paris).

1997
ON1

Nguyen Tu TT, Broutin J, Pons D, Bocherens H, Mariotti A, Derenne S & Largeau C. Etudes isotopiques et moléculaires de plantes terrestres cénomaniennes : implications paléoenvironnementales. *Colloque de l'Organisation Francophone de Paléobotanique* (14-15 Novembre, Paris), Livre de résumés des communications, 25.

▪ **Affiches : 6**

2014
PN6

Cammas C, Vissac C, Fondrillon M & **Nguyen Tu TT**. Géoarchéologie des sols urbains : constituants et processus de formation. *Rencontres Internationales de Liessies - Cycle des sols et des hommes* (24-25 Septembre, Liessies).

2013
PN5

Tramoy R, Schnyder J, **Nguyen Tu TT**, Yans J, Storme JY, Sebilo M, Derenne S, Jacob J & Baudin F. Paléonitrogen : L'utilisation des isotopes stables de l'azote des matières organiques fossiles terrestres comme nouveau marqueur paléoclimatiques - Premiers résultats. 14^{ème} Congrès français de sédimentologie (4-8 Novembre, Paris), Livre des résumés, 401.

2013
PN4

Cammas C, Clotuche R, **Nguyen Tu TT** & Borderie Q. Geoarcheology of towns : First results of micromorphological study of pit infillings in the Roman *vicus* of *Famars*. XIX^e Colloque d'Archéométrie du Groupe des Méthodes Pluridisciplinaires Contribuant à l'Archéologie (22-26 Avril 2013, Caen).

2010
PN3

Mendez-Millan M, **Nguyen Tu TT**, Egasse C, Derenne S, Derrien D, Gauthier C, Zeller B & Hatté C. Molecular characterization and compound specific ¹³C & ¹⁴C analysis of soil lipids along a savanna (C₄)/eucalyptus (C₃) (Pointe-Noire, Congo) (DynaMOS ANR-project). 6^{ème} congrès de la Société Française des isotopes Stables (26-29 octobre 2010, Toulouse), Book of Abstracts, 31.

2006
PN2

Nguyen Tu TT, Egasse C, **Zanetti F**, Zeller B, Bardoux G, Biron P, Richard P, Bariac T & Derenne S. Devenir des lipides végétaux dans les sols : Apport des isotopes stables du carbone. 23^{ème} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (11-14 septembre, Nantes), Livre des résumés, 245.

2006
PN1

Nguyen Tu TT, Derenne S, Largeau C, Bardoux G & Mariotti A. Effets de la diagenèse sur la composition isotopique individuelle de *n*-alcanes végétaux. Les matières organiques en France (22-24 janvier, Carqueiranne).



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 212 (2004) 199–213

PALAEO

www.elsevier.com/locate/palaeo

Leaf carbon isotope composition of fossil and extant oaks grown under differing atmospheric CO₂ levels

Thanh Thuy Nguyen Tu^{a,*}, Wolfram M. Kürschner^b, Stefan Schouten^c,
Pim F. Van Bergen^{a,1}

^a*Organic Geochemistry Group, Faculty of Earth Sciences, Utrecht University, P.O. Box 80021, 3508 TA Utrecht, The Netherlands*

^b*Laboratory of Palynology and Palaeobotany, Utrecht University, Budapestlaan 4, 3584 CD Utrecht, The Netherlands*

^c*Department of Marine Biochemistry and Toxicology, Royal Netherlands Institute for Sea Research, P.O. Box 59, 1790 AB Den Burg, The Netherlands*

Received 29 July 2003; received in revised form 28 May 2004; accepted 28 May 2004

Abstract

The aim of this study is to investigate the effects of long-term variations in atmospheric CO₂ levels (*p*CO₂) on stable carbon isotope ratios in plants. Isotope measurements were undertaken on two kinds of oak leaves: fossil leaves originating from two Miocene levels of well-documented and differing *p*CO₂ (i.e., 280 and 360 ppmv), and extant leaves of the same species coming from plants experimentally grown under contrasted *p*CO₂. Measurements were performed separately on sun and shade leaves to avoid bias linked to leaf morphotype, and on bulk leaves and individual *n*-alkanes extracted from the leaves, to detect possible diagenetic alteration of the isotope signal. Although extant oaks exhibit no significant trend in isotope discrimination with varying *p*CO₂, fossil oaks from the high *p*CO₂ level tend to exhibit slightly smaller isotope discrimination than those from the low *p*CO₂ level. However, the difference in fossil discrimination is only of 0.5‰ and its origin cannot be unequivocally assessed since other environmental parameters could be responsible for it. Therefore, it appears that if plant carbon isotope composition is sensitive to long-term *p*CO₂ variations, its response is rather minimal.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Leaf; Oak; *p*CO₂; Stable carbon isotopes

1. Introduction

Stable carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ values) of plant tissues are primarily controlled by the photosynthetic system adopted by the plant (C₃, C₄ or CAM), but are also correlated with a number of environmental factors (e.g., reviews by O'Leary, 1981; Gannes et al., 1998;

* Corresponding author. Current address: Laboratoire de Paléobotanique et Paléoécologie, CEB-EA 3496, Université Paris VI, 12 Rue Cuvier, 75 005 Paris, France.

E-mail address: ttnguyen@snv.jussieu.fr (T.T. Nguyen Tu).

¹ Current address: Shell Global Solutions International, Badhuisweg 3, 1031 CM Amsterdam, P.O. Box 38000, 1030 BN Amsterdam, The Netherlands.

Dawson et al., 2002). Therefore, the carbon isotopic composition of fossil plants can be used to reconstruct the ecology of extinct plants and palaeoenvironments (e.g., Bocherens et al., 1993; Nguyen Tu et al., 2002; Gröcke, 2002). For example, the carbon isotope composition of fossil plants has been used to investigate the first appearance of the C₄ photosynthetic pathway (e.g., Nambudiri et al., 1978; Bocherens et al., 1993). In plants using the C₃ photosynthetic pathway, $\delta^{13}\text{C}$ values have been modelled by Farquhar et al. (1982a) as a function of the isotope composition of atmospheric CO₂ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$), the intercellular CO₂ concentration inside the leaf (C_i) and the atmospheric CO₂ level (C_{atm} that is also referred to as $p\text{CO}_2$ in palaeoenvironmental studies) according to the expression:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{plant}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{atm}} - a - (b - a)C_i/C_{\text{atm}} \quad (1)$$

where a and b refer to the isotope discriminations linked to the diffusion of CO₂ in air and to the primary carbon fixation, respectively. a and b remain roughly constant in the temperature range at which photosynthesis is possible (e.g., O'Leary, 1981). C_i is mainly controlled by the enzymatic activity and the stomatal conductance that are dependent on various local environmental parameters such as water availability and irradiance (e.g., reviews by Tieszen, 1991; Dawson et al., 2002). The influence of $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ and numerous local environmental factors is well documented in modern plants and the use of the isotope composition of fossil plants to reconstruct the isotope composition of palaeoatmospheric CO₂ and local palaeoenvironments has been validated (e.g., Arens et al., 2000; Nguyen Tu et al., 2002; Gröcke, 2002). However, as shown by Eq. (1) $\delta^{13}\text{C}_{\text{plant}}$ is also dependant on C_{atm} , and atmospheric CO₂ levels have varied considerably through geological times (e.g., Berner, 1991). Although theoretical considerations (detailed thereafter) suggested that variations in $p\text{CO}_2$ have a minor influence on $\delta^{13}\text{C}_{\text{plant}}$, the relationship between these two parameters remains to be tested on the long term so that the palaeoenvironmental and palaeoecological applications of fossil plant isotope studies can be applied efficiently on long geological periods. With this in mind, the aim of this study is to better document the effects of long-term variations of $p\text{CO}_2$ on plant $\delta^{13}\text{C}$ values.

Since the carbon isotope composition is an important tool in plant physiology, this study should also have implications for the understanding of the physiological adaptations of plants, in response to long-term variations in $p\text{CO}_2$.

The effects of varying $p\text{CO}_2$ on plant isotope composition have been investigated in a number of growth chamber experiments, studies of subfossil leaves and by using modern plants growing along altitudinal gradients. In order to avoid bias linked to variations of $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$, these studies generally deal with the effects of varying $p\text{CO}_2$ on C_i/C_{atm} or on the carbon isotope discrimination $\Delta^{13}\text{C}$ defined by Farquhar et al. (1982a, 1989) for C₃ plants as:

$$\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{atm}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{plant}} = a + (b - a)C_i/C_{\text{atm}} \quad (2)$$

A number of studies reported increasing isotope discrimination under increasing $p\text{CO}_2$ (e.g., Körner et al., 1988, 1991; Beerling et al., 1993; van de Water et al., 1994; Peñuelas and Estiarte, 1997). Some of these pointed to a plant regulation of its gas exchange by maintaining the difference $C_{\text{atm}} - C_i$ constant (Marshall and Monserud, 1996; Hultine and Marshall, 2000). In contrast, other works tended to show that $\Delta^{13}\text{C}$ decreases under increasing $p\text{CO}_2$ (e.g., Polley et al., 1992; Beerling, 1997). Finally, some studies pointed to a constant metabolic setpoint for C_i/C_{atm} reporting no or nonsignificant correlations between $\Delta^{13}\text{C}$ and $p\text{CO}_2$ (e.g., Farquhar et al., 1982a; Peñuelas and Ascón-Bieto, 1992; Polley et al., 1993; Ehleringer and Cerling, 1995; Beerling, 1996). Hence, rather conflicting results have been reported on the effects of varying $p\text{CO}_2$ on $\Delta^{13}\text{C}$ and thus on $\delta^{13}\text{C}$ values.

Such a discrepancy between studies may be attributed, among other causes, to the fact that general physiological response to varying $p\text{CO}_2$ may be species and/or growth form dependent (e.g., Ehleringer and Cerling, 1995; Hamilton et al., 2001) and vary according to environmental conditions such as temperature (Friend et al., 1989; Wayne et al., 1998; Zhu et al., 1999), salinity (Guy and Reid, 1986), soil resistance to root penetration (Masle et al., 1990), or water and nitrogen supply (Wechsung et al., 2000). Moreover, the CO₂ ranges previously investigated maturity of the specimens and the reaction time tested varied significantly among studies. Hence, the effects

of varying $p\text{CO}_2$ on plant $\delta^{13}\text{C}$ values are not yet well constrained, probably due to the interplay of multiple parameters. Nonetheless, all previous investigations on the subject dealt with time periods that are short (i.e., several 10,000 years maximum) when compared with geological time scale and with the time necessary for biological evolution. The effects of long-term variations of $p\text{CO}_2$ on plant $\delta^{13}\text{C}$ values may differ from the short-term effects. Long-term effects remain to be investigated to determine whether, contrary to short-term, a long-term trend can be observed.

To date, only few studies have mentioned fossil plant $\delta^{13}\text{C}$ values with respect to long-term $p\text{CO}_2$ variations (Popp et al., 1989; Raven and Sprent, 1989; Bocherens et al., 1993; Ehleringer and Cerling, 1995; Arens et al., 2000). They all report an absence of correlation between fossil plant $\delta^{13}\text{C}$ values and palaeo- $p\text{CO}_2$ with almost constant isotope ratios for all the fossil plant record, although $p\text{CO}_2$ exhibited large variations during the Phanerozoic. However, these studies generally combined data from various plant organs (e.g., wood, leaves and seeds) and/or numerous species. $\delta^{13}\text{C}$ values are known to differ significantly amongst organs within a given plant, for example wood and seeds are known to be ^{13}C -enriched by at least 4‰ when compared with leaves (e.g., Troughton, 1972; Farquhar and Richards, 1984; Leavitt and Long, 1991; Martinelli et al., 1998). Moreover, plant response to varying $p\text{CO}_2$ has been suggested to be species-dependent (e.g., Feng, 1998).

Fossil leaves from the Upper Miocene of the Lower Rhine Embayment (Germany) provide an exceptional opportunity to investigate the long-term response of plant stable carbon isotope ratios to varying $p\text{CO}_2$. The Miocene to Pliocene sediments of the embayment include numerous fossiliferous levels that yielded a rich and exceptionally well preserved fossil flora, including leaves of the oak *Quercus pseudocastanea* (e.g., van der Burgh, 1987). Stomatal analyses of *Q. pseudocastanea* leaves allowed inference of palaeo- $p\text{CO}_2$ from the Tortonian to the Piacenzian Stages, revealing several fluctuations between low $p\text{CO}_2$ episodes [minimum: $p\text{CO}_2=270$ parts per million by volume (i.e., ppmv)] and high $p\text{CO}_2$ episodes (maximum: $p\text{CO}_2=360$ ppmv; Kürschner et al., 1996). Two fossiliferous levels, deposited under differing atmospheric CO_2 concentrations and separated by more than

1 million years, were chosen for isotope investigations of *Q. pseudocastanea*: $p\text{CO}_2$ of ca. 360 ppmv at 8.2 Ma and 280 ppmv at 6.5 Ma. The sedimentology of the complete sequence has been studied in detail (e.g., Zagwijn and Hager, 1987) allowing a reasonably detailed environmental interpretation of the plant habitats. Moreover, in a recent paper (Utescher et al., 2000) the changes in palaeoclimate in the Lower Rhine Basin during the Neogene have been reconstructed from the characteristics of local Paleofloras. Furthermore, the marine carbonate record is almost complete for the Cainozoic (e.g., Zachos et al., 2001) allowing rather precise estimations of $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ for this era. Therefore, the environmental parameters which may have influenced plant $\delta^{13}\text{C}$ values are well constrained. In addition, the fossil oak species present in this section probably still exists nowadays. Indeed, the leaf remains are identified conventionally as the fossil species *Q. pseudocastanea* and *Q. roburoides*. However, these species are likely to correspond to fossil representatives of the durmast oak, *Quercus petraea* (van der Burgh, 1993, 2001). Isotope studies were also undertaken on a few leaves of *Q. petraea* previously grown in experimental chambers of differing $p\text{CO}_2$ (i.e., 350 and 700 ppmv; Kürschner et al., 1998) in a first approach to compare the response of *Q. pseudocastanea* $\delta^{13}\text{C}$ values to varying CO_2 on a much shorter time scale.

Several aspects may bias the isotope results obtained from fossil leaves and thus affect the inferred palaeoenvironmental reconstructions. The main parameter in this respect is diagenesis, although in several cases, fossil plants can retain their original isotope composition (e.g., Degens, 1969; Rigby et al., 1981; Balesdent and Mariotti, 1996). Bulk $\delta^{13}\text{C}$ values of a plant correspond to the weighted mean averages of the $\delta^{13}\text{C}$ value of each of its constituents. Thus, stable carbon isotope ratios can be altered in bulk plants, if the carbon lost during diagenesis by microbial/chemical degradation has $\delta^{13}\text{C}$ values significantly different than the carbon that is preserved (e.g., Benner et al., 1987; van Bergen and Poole, 2002). Artificial and natural degradation experiments showed that during the early stages of diagenesis, the isotope composition of plant detritus tended toward the $\delta^{13}\text{C}$ value of the resistant constituent, lignin, which is significantly depleted in ^{13}C when compared with the bulk plant material

(e.g., Benner et al., 1987; Schleser et al., 1999a). Isotope analysis of individual biomarkers stable through geological times, constitute an alternative methodology allowing investigation of plant isotope composition whatever the preservation stage of fossils. Long chain *n*-alkanes have been often used as an unaltered record of the isotope composition of fossil plants (e.g., Huang et al., 1997; Kuypers et al., 1999; Schefuß et al., 2003). Another important parameter that can bias isotope investigations of fossil leaves, is the systematic ^{13}C -enrichment of sun leaves when compared with shade leaves (e.g., Lockheart et al., 1997, 1998). Within a tree, sun leaves are exposed to higher levels of irradiance when compared with shade leaves. This is known to induce higher photosynthetic rates and/or stomatal closure which, in turn, leads to lower C_i and then higher $\delta^{13}\text{C}$ values in sun leaves than in shade leaves (e.g., Waring and Silvester, 1994; Lockheart et al., 1998). Because sun and shade morphotypes have been identified among the fossil leaves of the Lower Rhine Embayment (Kürschner, 1997), the two morphotypes can be studied separately.

In this study, the isotope composition of Late Miocene plants from the Lower Rhine Embayment grown under differing $p\text{CO}_2$ in an interval of more than 1 million years was investigated as a first approach to test the response of plant carbon isotope ratios to long-term variations in palaeo- $p\text{CO}_2$. The study focuses on a single organ (i.e., leaves) of a single species (i.e., *Quercus pseudocastanea*) to be independent of the isotope variability that exists among species and among organs within a given species. Moreover, analyses were undertaken separately on sun and shade leaves, and bulk leaves and individual leaf alkanes, to avoid biases linked to the systematic ^{13}C -enrichment of sun leaves and diagenetic alteration of the isotope signal, respectively. Furthermore, the results obtained on the fossils were compared with some obtained on (i) leaves experimentally grown under contrasted $p\text{CO}_2$ and (ii) sun and shade leaves from a nature tree of *Quercus petraea*, the living equivalent of *Q. pseudocastanea*, in an attempt to compare the long-term response to varying $p\text{CO}_2$ of this oak to that on a shorter time scale. Rather than an exhaustive survey, this restricted sample set represents a first appraisal of the carbon isotope response of plants to long-term variations in $p\text{CO}_2$.

2. Material and methods

2.1. Samples

2.1.1. Fossil samples

2.1.1.1. Fossil leaves of *Quercus pseudocastanea*. The fossil leaves originate from the Lower Rhine Embayment, a fault-controlled depositional centre marking the current southeastern margin of the Neogene North Sea Basin exposed in Germany and adjacent part of the Netherlands (Zagwijn and Hager, 1987). The material was collected from the brown-coal open-cast mine at Hambach near Cologne (Germany). The fossil leaf remains were derived from two successive clay intercalations in the upper part of the Hauptkies Series in the lithological units 7F and 8 of Schneider and Theile (1965), which are both of Late Miocene age. Sediment blocks were either split along bedding planes at the site to reveal fossils or returned to the laboratory for processing.

Fossils were classified according to morphology into four types: sun, intermediate sun, intermediate shade, and shade. Shade leaves are characterised by a greater size, less deeply lobed margin and less pubescent leaf blade than sun leaves (Fig. 1; Blue and Jensen, 1988). When leaf morphology was intermediate or when the attribution to the sun or shade morphotype could not be achieved for certain,

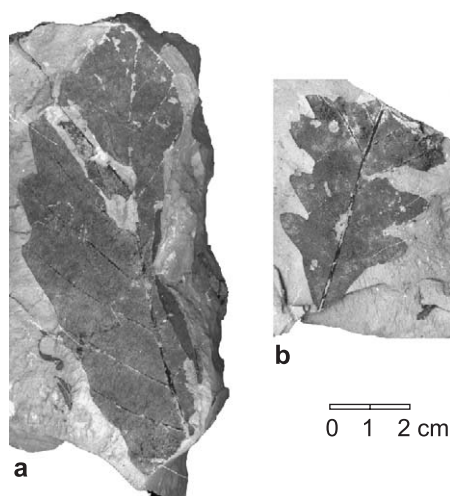


Fig. 1. Characteristic morphologies of shade (a) and sun (b) leaves of *Quercus pseudocastanea*.

leaves were classified into intermediate sun or intermediate shade morphotypes. Leaves were isolated from the sediment using 43% HF for approximately 15 min until a sufficient fraction of the sediment was dissolved to release the leaves, and rinsed afterwards in distilled water (Kerp, 1990).

2.1.1.2. Sediment. To test possible homogenisation of the isotope signal between fossil plants and the embedding sediment, sediment samples were investigated following the same protocol as for fossil plants. For each stratigraphic level, a piece of sediment devoid of fossil was taken from five distinct fossiliferous blocks. The five subsamples were then combined to obtain a sediment sample representative of each level.

2.1.2. Modern samples

A few modern samples of *Quercus petraea* were investigated to provide an idea of the potential response of the closest living relative of *Quercus pseudocastanea* to variations in $p\text{CO}_2$ level (i.e., growth chamber samples) and in irradiance (i.e., nature samples). Plant carbon isotopic composition is dependent on a number of factors that were probably different for the Miocene *Q. pseudocastanea* and the two batches investigated for the present-day *Q. petraea*. Therefore, the isotope composition of fossil and modern oaks cannot be directly compared, and this work only refers to cautious comparisons of trends obtained by compiling the results of a given batch of samples.

2.1.2.1. Growth chamber experiments of *Quercus petraea*. Detailed experimental settings are described in Hertog et al. (1993) and Kürschner et al. (1998). Briefly, acorns of *Quercus petraea* were collected from old oak trees in the Limburg area (The Netherlands) and germinated in December 1992. At the end of March 1993, two sets of 23 seedlings each were placed in controlled chambers and grown for 4 months. $p\text{CO}_2$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ were held at 350 ppmv and -12.3‰ for the first chamber and at 700 ppmv and -18.6‰ for the second one. $p\text{CO}_2$ was controlled regularly using infrared gas analysers (Siemens type ZFPCS and ZFP-DZ). Environmental parameters were similar in both chambers and maintained constant for the duration of the experiment: 20 °C continuously and

65% relative humidity. Light intensity was held between 500 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (400–700 nm, measured with a quantum-sensor, SKP 215, Skye, Llandrindod Wells, UK) during a 12-h day, provided by Philips HPI-T lamps (400 W) and 40 W incandescent bulbs in a 1:1 ratio, leading to leaves of intermediate shade morphotype. Three seedlings of each grow chamber were sampled for isotope analyses.

2.1.2.2. Leaves of a nature tree of *Quercus petraea*.

Leaves were sampled in July 2000 from a mature tree growing in a relatively open area of the national park De Hoge Veluwe (The Netherlands) where urban pollution is minimal. Leaves were harvested randomly on several representative branches around the tree at approximately 2 m above the ground. Three sun leaves were obtained from the outermost part of the tree canopy and six shade leaves were taken from the interior of the canopy.

2.2. Experimental

All leaves were dried overnight in an oven at 80 °C and stored dark in aluminium foil at ambient temperature. Each leaf was separately ground to a fine homogeneous powder in an agate mortar before analyses.

2.2.1. Isotope analyses of bulk leaves

Thirteen and 15 fossil leaves of *Quercus pseudocastanea* originating from level 8 and 7F, respectively, nine leaves of the nature tree and 21 leaves of experimentally grown *Quercus petraea* were investigated for their stable carbon isotope composition. Each leaf was analysed separately except for the experimentally grown specimens. For each plant of the growth experiment, the isotope data were obtained from a combined sample of three powdered leaves to determine a measurement representative of the whole plant. The intraleaf variability was investigated in six modern leaves and six fossil leaves, by measuring $\delta^{13}\text{C}$ values at, at least, eight different points of the lamina. Carbon elemental abundance was measured simultaneously to $\delta^{13}\text{C}$ values to investigate possible pattern of diagenetic alteration of the isotope signal. Samples were combusted in a Fisons NA 1500-NCS elemental analyser connected to a Finnigan DeltaPlus

isotope ratio mass spectrometer. Each sample was run in quadruplicate, or at least in duplicate when available fossil material was limited. Graphite standards were run frequently between batches of samples to obtain reliable mean values. The results of bulk isotope measurements on fossil and modern oaks are summarised in Table 1, analytical reproducibility of replicate samples being better than 0.2‰.

2.2.2. Lipid extraction and *n*-alkane isolation

Seven fossils, two sediments and eight modern leaf samples were extracted to determine the individual *n*-alkane isotope composition. Extractions of the modern oak samples were achieved on the combination of three powdered leaves to obtain a representative sample of a given plant. Depending on the available material, fossil leaf extracts correspond to a single leaf or to the combination of two or three leaves of the same morphotype and of similar bulk isotope composition, as indicated in Table 2. When several leaves were combined, the isotope composition of the bulk sample was measured before extraction. Powdered leaves were extracted by three successive ultrasonications (5 min) in 5 ml CH₂Cl₂ at room temperature. After each ultrasonication, the extract was recovered by 10-min centrifugation at

3000 rpm. The three lipid extracts were combined and evaporated under vacuum. Sediments were extracted using the same procedure but with 10 ml CH₂Cl₂. Elemental sulphur was removed from the sediment and fossil extracts by overnight magnetic stirring in 5 ml CH₂Cl₂ at room temperature with copper turnings previously washed in acid and solvent. Total lipids were fractionated by micro-column chromatography in a Pasteur pipette filled with approximately 500 mg of Al₂O₃ (degree of activity I). *n*-Alkanes were recovered with the hydrocarbon fraction after elution with 3 ml hexane. When necessary, saturated hydrocarbons were separated from unsaturated hydrocarbons by elution with hexane over an AgNO₃-impregnated silica column. *n*-Alkane fractions were concentrated to dryness under nitrogen and redissolved in small volume of hexane prior to analyses.

2.2.3. Isotope analyses of individual *n*-alkanes

Identification of *n*-alkanes was carried out by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry using a Hewlett-Packard 5890 series II chromatograph equipped with an on-column injector and fitted with a fused silica capillary column, coated with CP-SIL-5CB (50 m×0.32 mm i.d., 0.12-µm film

Table 1

Summary of isotope results (‰) obtained on bulk leaves of *Quercus petraea* and *Quercus pseudocastanea*

Sample	Level	Estimated <i>p</i> CO ₂ (ppmv)	δ ¹³ C _{CO₂}	Morphotype	<i>n</i>	Average δ ¹³ C _{plant}	Average Δ ¹³ C _{plant}	Standard deviation
<i>Q. pseudocastanea</i>	8	280	−6.7	sun	4	−28.3	21.6	0.4
<i>Q. pseudocastanea</i>	8	280	−6.7	intermediate sun	2	−28.1	21.4	0.9
<i>Q. pseudocastanea</i>	8	280	−6.7	intermediate shade	4	−28.2	21.5	0.4
<i>Q. pseudocastanea</i>	8	280	−6.7	shade	3	−28.5	21.8	0.4
<i>Q. pseudocastanea</i>	8	280	−6.7	all morphotypes	13	−28.2	21.5	0.4
Sediment	8	280	−6.7	–	2	−28.4	21.7	0.0
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	sun	5	−27.0	20.7	0.8
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	intermediate sun	6	−27.3	21.0	0.8
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	???	1	−27.5	21.2	–
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	intermediate shade	1	−27.4	21.1	–
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	shade	2	−27.5	21.2	0.2
<i>Q. pseudocastanea</i>	7	360	−6.3	all morphotypes	15	−27.2	20.9	0.7
Sediment	7	360	−6.3	–	2	−26.4	20.1	0.0
<i>Q. petraea</i> greenhouse	m	350	−12.3	intermediate shade	3	−30.3	18.0	1.5
<i>Q. petraea</i> greenhouse	m	700	−18.6	intermediate shade	3	−38.3	19.7	1.7
<i>Q. petraea</i> nature	m	370	−8.2	sun	6	−29.8	21.6	0.1
<i>Q. petraea</i> nature	m	370	−8.2	shade	3	−30.3	22.1	0.2

Modern leaf (m), not relevant (–), undeterminable morphotype (???). Values noted in bold correspond to the average values per level all morphotypes included.

Table 2

Summary of isotope results (‰) obtained on individual *n*-alkanes of *Quercus petraea* and *Quercus pseudocastanea*

Sample	Estimated $p\text{CO}_2$ (ppmv)	Morphotype	$\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$	$\delta^{13}\text{C}_{n\text{-alkane}}$ ^a				Average	Average $\Delta^{13}\text{C}_{n\text{-alkane}}$
				C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁		
<i>Q. pseudocastanea</i> ^b	280	sun	-28.0	-30.5±0.7	-31.2±0.6	-33.0±0.3	-33.8±0.6	-32.1	25.4
<i>Q. pseudocastanea</i>	280	sun	-28.5	-32.4±0.4	-	-32.8±0.6	-	-32.6	25.9
<i>Q. pseudocastanea</i> ^b	280	sun	-28.5	-	-	-	-34.9	(-34.9)	(28.2)
<i>Q. pseudocastanea</i>	280	shade	-28.7	-35.2	-34.6	-34.1	-35.0	-34.7	28.0
<i>Q. pseudocastanea</i>	280	shade	-28.8	-33.7	-32.9±0.1	-33.7	-32.5	-33.2	26.5
Sediment	280	-	-28.4	<i>-34.5±0.3</i>	-34.8±0.1	-34.5±0.5	-36.1±0.3	-35.0	29.4
<i>Q. pseudocastanea</i> ^b	360	sun	-27.2	<i>-29.9</i>	-32.3	-35.3±0.3	-34.5±0.7	-33.0	26.7
<i>Q. pseudocastanea</i> ^b	360	shade	-27.5	<i>-29.7±0.1</i>	-32.8±0.3	-34.5±0.6	-34.3±0.4	-32.8	26.5
Sediment	360	-	-26.4	<i>-32.1±0.9</i>	-31.9±0.3	-32.5±0.6	-34.3±0.1	-32.2	25.9
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	350	int. shade	-28.8	-	-32.7±0.5	-34.7±0.2	-35.2±0.4	-34.2	21.9
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	350	int. shade	-31.8	<i>-34.9±0.3</i>	-36.0±0.4	-36.7±0.2	-37.8±0.1	-36.4	24.1
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	350	int. shade	-32.2	<i>-33.6±0.4</i>	-34.6±0.1	-36.2±0.1	-37.5±0.1	-35.5	23.2
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	700	int. shade	-36.9	-	-40.7±0.4	-43.5±0.1	-44.8±0.2	-43.0	24.4
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	700	int. shade	-37.8	<i>-39.7±0.1</i>	-42.1±0.3	-43.4±0.2	-44.4±0.6	-42.4	23.8
<i>Q. petraea</i> greenhouse ^b	700	int. shade	-40.2	<i>-40.1±0.1</i>	-43.3±0.4	-46.6±0.4	-47.3±0.2	-44.3	25.7
<i>Q. petraea</i> nature ^b	370	sun	-29.8	-31.7±0.4	-35.4±0.1	-37.0±0.1	-36.4±0.7	-35.1	26.9
<i>Q. petraea</i> nature ^b	370	shade	-30.3	-33.1±0.2	-36.9±0.4	-38.0±0.2	-37.5±0.2	-36.4	28.2

Not determined (-). Values written in bold correspond to the dominant *n*-alkane; values written in italic correspond to the less abundant alkane of the four alkanes investigated.

^a Average±standard deviation (no S.D. is indicated when only one measurement was done).

^b Several leaves combined.

thickness) and a Fisons instruments VG platform II quadrupole mass spectrometer, scanning from m/z 50 to 650, electron energy 70 eV, scan time 0.65 s. The temperature program used was 70–315 °C at 4 °C.min⁻¹ and then 315 °C isothermal for 20 min, using helium as carrier gas. Results of the analyses of *n*-alkanes and other lipid constituents of fossil and modern oaks will be discussed in detail in a forthcoming paper. The hydrocarbon fraction was dominated by C₂₅, C₂₇, C₂₉ and C₃₁ *n*-alkanes. Compound specific $\delta^{13}\text{C}$ values of the dominant alkanes were determined with a HP5860 series II gas chromatograph coupled via a combustion interface (940 °C) to a Thermofinnigan Delta C isotope ratio mass spectrometer. The gas chromatograph was equipped with an on-column injector and fitted with a fused silica capillary column, coated with CP-SIL-5CB (25 m×0.32 mm i.d., 0.12- μm film thickness). The temperature program used was 70–130 °C at 20 °C.min⁻¹, subsequently heated to 320 °C at 4 °C.min⁻¹ and then isothermal for 10 min. Each sample was run at least twice. The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured with instrumental standard deviation of the measurement being 0.3‰ and repeated measurements

on a single sample yielded typically a precision (1 σ) of 0.5‰.

2.2.4. Atmospheric correction for isotope composition

To avoid bias linked to variations of $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$, the following discussion is based on the isotope discrimination $\Delta^{13}\text{C}$ that was calculated according to Eq. (2). It should be noted that because the considered discrimination mainly refers to a reaction for which substrate is not limiting (i.e., photosynthetic fixation of atmospheric CO₂), $\Delta^{13}\text{C}$ is similar to ϵ the isotope effect also termed isotope enrichment factor (e.g., Freeman and Hayes, 1992; Lajtha and Michener, 1994). $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ was measured directly in the growth chamber for the CO₂-enrichment experiments. According to the NOAA atmospheric record (Global-view-CO₂, 2001), a $\delta^{13}\text{C}$ value of -8.2‰ and a $p\text{CO}_2$ of 370 ppmv were used to characterise the atmosphere of the extant specimen of *Quercus petraea* obtained from the Veluwe. $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ can be estimated from the carbonate isotope record for the Miocene epoch. Indeed, atmospheric CO₂ is in isotope equilibrium with surface marine carbonates whose isotope composition is recorded in the tests of planktonic

organisms after a small isotope effect (e.g., Mook, 1986). Overall, a ^{13}C -depletion of 9‰ is generally considered from planktonic carbonates to atmospheric CO_2 (e.g., Mook, 1986; Koch et al., 1995). Several records of the carbon isotope composition of planktonic foraminifers are available between 8.2 and 6.5 Ma. To estimate $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ for the Lower Rhine Embayment, the two planktonic carbonate records available for the northern Atlantic were used (Shackleton and Hall, 1997; Spezzaferrri et al., 2002). They led to very similar $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ values for a given age: -6.3‰ and -6.7‰ for 8.2 and 6.5 Ma, respectively. Considering the limited size of most batches of samples, comparison of $\Delta^{13}\text{C}$ values was achieved by nonparametric tests, i.e., Mann–Whitney tests on Statview SE+ 1.02.

3. Results and discussion

3.1. Modern leaves of *Quercus petraea*

3.1.1. Experimental plants

The isotope discrimination of bulk leaves from oaks experimentally grown at 350 and 700 ppmv average at $18.0 \pm 1.5\text{‰}$ and $19.7 \pm 1.7\text{‰}$, respectively (Table 1), average intraleaf variability being 0.4‰ (S.D.). The standard deviations calculated here within a leaf and within a chamber are somewhat higher than these reported in the literature within a leaf and within a given population of a species (e.g., Ehleringer, 1991): 0.2‰ and 0.4‰, respectively. Nevertheless, the standard deviations obtained are of the same magnitude as in previous works and accordingly the intraleaf deviation is systematically smaller than the intrachamber deviation. In the same way the range of $\delta^{13}\text{C}$ measured here (i.e., $\pm 3\text{‰}$) is in agreement with the ranges reported in literature which varies, for a given population from 1‰ to 5‰ (e.g., Ehleringer and Cooper, 1988; Friend et al., 1989; Mooney et al., 1989; Martinelli et al., 1998).

Oaks grown at 700 ppmv tend to exhibit higher isotope discrimination than oaks grown at 350 ppmv. This trend toward higher isotope discrimination with higher $p\text{CO}_2$ (Fig. 2) fits with those previously found by Picon et al. (1996) on seedlings of *Quercus robur* grown in experimental chamber, and suggested by Hemming et al. (1998) from *Q. robur* tree-ring

analyses. This trend is also in agreement with a number of studies dealing with other species based on CO_2 -enrichment experiments (e.g., Park and Epstein, 1960; Polley et al., 1995), altitudinal gradients (e.g., Körner et al., 1988; Kogami et al., 2001) or subfossil examination (e.g. van de Water et al., 1994; Peñuelas and Estiarte, 1997). However, the difference in isotope composition between both data sets is only slightly larger than the intrachamber standard deviation, lower than the intrachamber range of $\delta^{13}\text{C}$ values (Table 1), and appeared nonsignificant under the Mann–Whitney test.

Except the C_{25} homologue of one seedling, all individual n -alkanes extracted from leaves of experimental *Quercus petraea* appear ^{13}C -depleted when compared with the bulk leaves (Table 2). The variability of $\delta^{13}\text{C}$ values for a given alkane homologue is similar to that of the bulk and compared with other n -alkanes (Table 2). The isotope discrimination increases with alkane chain length: average alkane $\Delta^{13}\text{C}$ values range from 21.6‰ for the C_{25} to 25.7‰ for the C_{31} homologue (Fig. 2). These alkane isotope patterns are in agreement with previous studies on the isotope composition of individual leaf lipids of C_3 plants (Collister et al., 1994; Lockheart et al., 1997; Nguyen Tu et al., 2004). Three of the four investigated n -alkanes also exhibit a slight tendency toward a higher carbon isotope discrimination with higher $p\text{CO}_2$, as detected at the bulk leaf level. This trend appears statistically significant for the C_{29} and the C_{31} homologues. An inverse tendency can be drawn from the isotope composition of the C_{25} homologue. The contrasting results of the C_{25} alkane may be related to the low abundance of this homologue when compared with the other alkanes. Indeed, the specific isotope composition of minor constituents is expected to vary to a greater extent than for abundant constituents due to higher analytical uncertainties and higher sensitivity to contaminations from microbes that only colonize less than 2% of the surface of healthy leaves (Juniper and Jeffree, 1983).

3.1.2. Nature tree

The leaves from the mature tree grown in the field exhibited higher $\Delta^{13}\text{C}$ values than greenhouse leaves grown at similar $p\text{CO}_2$, both at the bulk leaf level as well as at the molecular level (Fig. 2). Numerous environmental parameters were probably different for

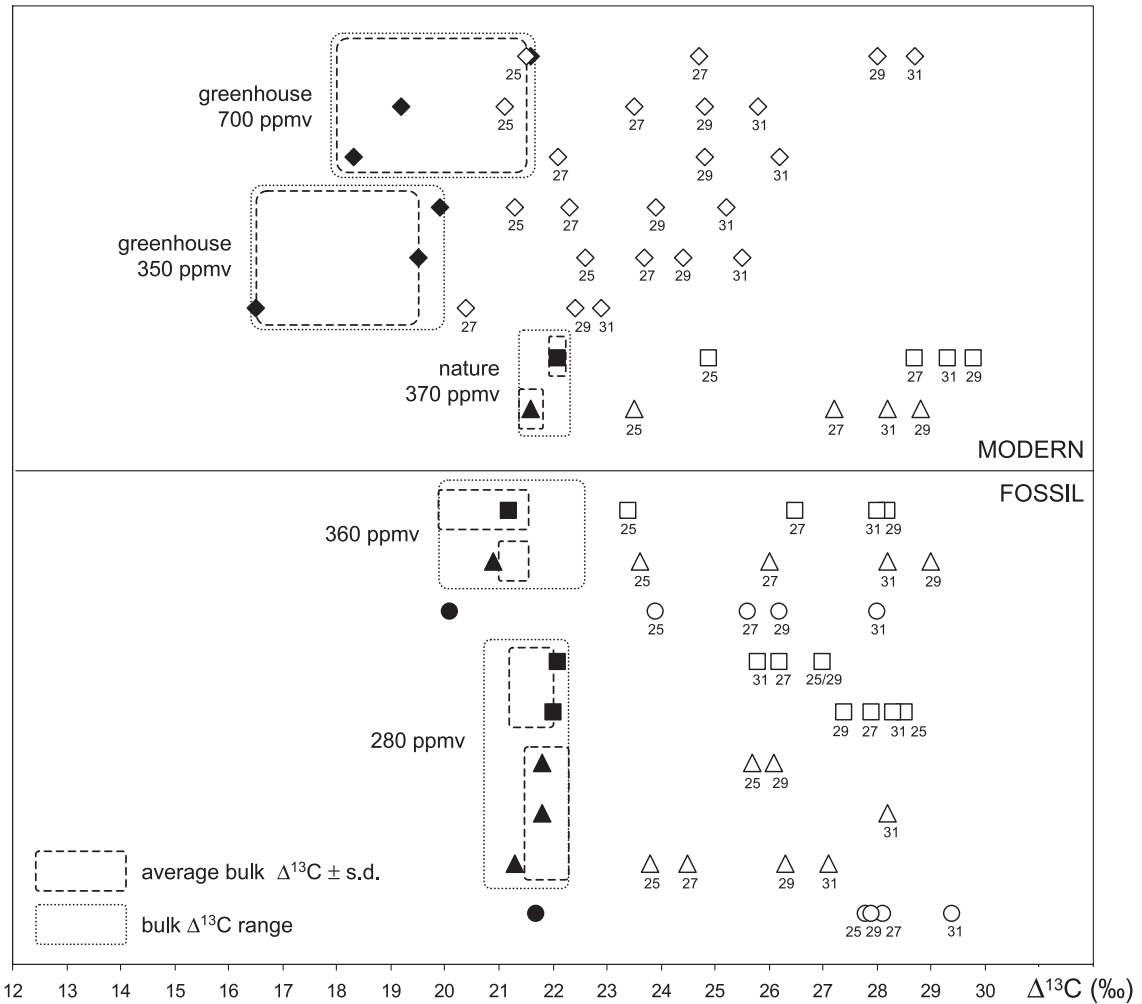


Fig. 2. Isotope discrimination of bulk samples (◆, ▲, ■, ●) and individual n -alkanes (◇, △, □, ○) extracted from leaves of modern and fossil oaks. □, ■: Shade morphotypes; ◇, ◆: intermediate shade morphotypes; ▲, △: sun morphotypes; ○, ●: sediment. Numbers under symbols indicate n -alkane chain length.

the nature tree and the growth chamber seedlings, which may be responsible for the higher $\Delta^{13}\text{C}$ calculated for the nature tree. Moreover, it should be noted that the greenhouse specimens studied are young and probably derived a part of their nutrients from seeds that are known to be ^{13}C -enriched when compared with leaves (e.g., Troughton, 1972; Farquhar and Richards, 1984). The intratree variability of isotope ratios in bulk leaves from the nature tree appeared quite narrow (i.e., range of 0.9‰) when compared with that of the greenhouse seedlings (i.e., range of 3.0‰). This finding is probably related to the

difference in the number of plants investigated between greenhouse and nature samples (i.e., three plants for the greenhouse batch vs. one tree for the nature one). Nonetheless, sun leaves are ^{13}C -enriched when compared with shade leaves (Table 1) which is in agreement with literature data (e.g., Schleser, 1990; Lockheart et al., 1998). Although difference in $\Delta^{13}\text{C}$ is rather narrow, statistical analysis (Mann–Whitney test) demonstrated that it is significant, thus suggesting that the minimal difference that might be expected in the isotope composition of fossil sun and shade leaves would be about 0.5‰.

The lower isotope discrimination in sun leaves when compared with shade leaves appeared more marked for individual *n*-alkanes than for bulk organic matter (Fig. 2, Table 2). An explanation for this observation could be that an important part of the *n*-alkane pool is generally biosynthesised later in the year than the other leaf constituents (e.g., El-Otmani and Coggins, 1985; Lockheart et al., 1997). Therefore, the isotope composition of individual *n*-alkanes is more likely to reflect the microenvironmental conditions shortly before harvesting, whereas the isotope composition of bulk leaves probably constitutes an integrated record of the environment of leaf lifetime including microenvironmental conditions earlier in the leaf's development, when sunlight exposure of sun and shade leaves was not significantly different. The C₃₁ *n*-alkane of the nature tree of *Quercus petraea* exhibited lower $\Delta^{13}\text{C}$ than the C₂₉, whereas the other homologues exhibited the usual increasing $\Delta^{13}\text{C}$ trend with increasing chain length (Fig. 2). Here again, this may be due to the low abundance of the C₃₁ homologue when compared with other *n*-alkanes.

3.2. Fossil leaves of *Quercus pseudocastanea*

Isotope discriminations of bulk fossil leaves (all morphotypes included) of *Quercus pseudocastanea* from levels 7F ($p\text{CO}_2 \approx 360$ ppmv) and 8 ($p\text{CO}_2 \approx 280$ ppmv) averaged $20.9 \pm 0.7\%$ and $21.5 \pm 0.4\%$, respectively (Table 1), intraleaf variability being 0.7% (S.D.). The variabilities of isotope composition within and among leaves from a given level are in agreement with those reported in literature and measured here for modern oaks. Moreover, isotope composition of fossil leaves appeared different from that of the embedding sediment (Table 1, Fig. 2). The fossil leaves exhibited homogeneous TOC values (i.e., $48.0 \pm 4.4\%$) that are not correlated with $\delta^{13}\text{C}$ values. Sun leaves tend to exhibit lower $\Delta^{13}\text{C}$ than shade leaves, which is in agreement with the results obtained for the extant *Quercus petraea*. These findings suggest that diagenesis has not significantly affected the bulk isotope ratios of the fossil leaves studied. Statistical analyses (Mann–Whitney test) on bulk $\Delta^{13}\text{C}$ values of fossil leaves all morphotypes included demonstrated that discrimination in leaves from level 8 are significantly higher than those from

level 7F. The number of leaves investigated for each morphotype is insufficient to allow statistical analyses. Nevertheless, sun leaves from level 8 also seem to exhibit slightly higher $\Delta^{13}\text{C}$ values than those from level 7F and the same pattern is noted for shade leaves (Table 1). Such an increase in leaf isotope discrimination from level 7F to level 8 is in agreement with previous measurements on woods from nearby localities (Frielinsdorf, 1992 in Utescher et al., 2000; Jordan, 1995 in Utescher et al., 2000).

As with *Quercus petraea*, individual *n*-alkanes of *Quercus pseudocastanea*, appeared ^{13}C -depleted when compared with bulk leaves (Table 2, Fig. 2). The fossil *n*-alkanes roughly follow the usual increasing $\Delta^{13}\text{C}$ trend with increasing chain length. However, it is not as obvious as for the modern oak; for example, the C₂₅ $\Delta^{13}\text{C}$ is often higher than that of the longest homologues (Fig. 2). In the same way, at the molecular level, there is no statistically significant isotope distinction between sun and shade morphotypes and no unambiguous trend can be drawn between the stratigraphic level and the isotope discrimination. These rather mixed isotope distribution patterns of individual *n*-alkanes may be attributed to a possible slight diagenetic alteration of the isotope signal at the molecular level and/or minor contributions from other lipid pools originating either from the leaves themselves (i.e., breakdown products of other constituents) or the embedding sediment (i.e., bacteria, algae, and other higher plants). Such slight alterations of specific *n*-alkane isotope composition were recently suggested to occur in *Ginkgo biloba* leaf during the early stages of degradation in a well-drained soil (Nguyen Tu et al., 2004).

As with the bulk samples, the isotope composition of individual *n*-alkanes from the sediment were distinct from those of the leaf alkanes, pointing to an absence of homogenisation of the isotope signal between leaf lipids and that of the embedding sediment. Moreover, in contrast to fossil leaf alkanes, all homologues of sedimentary alkanes tend to exhibit increasing $\Delta^{13}\text{C}$ values from stratigraphic level 7F to 8, just as bulk $\Delta^{13}\text{C}$ values of both fossil leaves and sediment (Fig. 2). Such tendency cannot be checked statistically because, for each stratigraphic level, only one sediment sample was investigated for isotope analyses. Nevertheless, each sediment sample

corresponded to the combination of several subsamples taken on distinct fossiliferous block (see experimental section). Therefore, as noted by Lücke et al. (1999) on the brown coal matrix embedding fossil woods, the sediment surrounding fossils may constitute a better isotope record of the environment than the fossils themselves because it is more likely to integrate the various environmental parameters on a relatively long time scale and be less sensitive to degradation and intraplant variability of the isotope signal.

Although the difference between both levels is rather small, oak leaves from level 8 exhibit a bulk isotope discrimination significantly higher than those from level 7. This difference may be attributed to the following main factors:

(i) The difference may correspond to a response to the $p\text{CO}_2$ variation documented by other methods (Kürschner et al., 1996). This would imply that the fossil *Quercus pseudocastanea* and the extant *Quercus petraea* exhibit different isotope response to $p\text{CO}_2$ variations. Such a result may be due to difference in the isotope response of a given species according to the time scale considered as suggested by Ehleringer and Cerling (1995). Otherwise, since van der Burgh (2001) demonstrated that the oak leaves from level 7F and 8 belonged to population of different morphological characteristics, the difference in isotope discrimination observed may also be due to difference in isotope response of different populations of a given species as suggested by Feng (1998).

(ii) Eq. (1) shows that plant isotope composition is also dependent on the partial pressure of CO_2 inside the leaf (C_i). C_i varies, among others, in response to local environmental parameters and particularly to the availability of water in the soil on which the plant grows (e.g., Farquhar et al., 1982b). Decreasing water availability leads to a closure of stomata and thus reduces C_i which in turn induces an decrease of plant $\delta^{13}\text{C}$ values. Water availability may have been different for fossil oaks sampled in levels 8 and 7F. Indeed the deposit environment of level 7F is interpreted as an oxbow lake whereas that of level 8 as a flood plain (Zagwijn and Hager, 1987). Moreover, precipitation was probably slightly more abundant for level 7F than for level 8 (Zagwijn and Hager, 1987; Utescher et al., 1997, 2000). Therefore, water availability was prob-

ably higher for level 7F than for level 8, which should have led to higher $\delta^{13}\text{C}$ values for level 7F when compared with level 8, which is not the case. Therefore, precipitation does not seem to be the main cause for the different isotope discrimination.

(iii) Global environmental parameters, other than atmospheric CO_2 levels, can also influence plant $\delta^{13}\text{C}$ values, particularly temperature. The influence of temperature on plant $\delta^{13}\text{C}$ values has been mostly investigated using laboratory experiments and are rather inconclusive because both a positive (e.g., Pearman et al., 1976; Beerling, 1996), a negative (e.g., Smith et al., 1976; Körner et al., 1991) or no (e.g., Troughton et al., 1974; Feng and Epstein, 1995) relationship has been reported. Although it has not yet been repeated, one of the strongest relationships reported between temperature and plant $\delta^{13}\text{C}$ values is the positive one observed by Beerling (1996) on subfossil leaves of *Salix*. Temperature was probably higher for level 7F than for level 8 (Zagwijn and Hager, 1987; Utescher et al., 1997, 2000), which perhaps could, at least partially, explain the isotope composition measured for the fossil oaks studied.

Obviously, several of the aforementioned hypothesis can partially explain the difference observed in isotope discrimination between leaves from level 7F and those from level 8, but none can be solely considered to be the most likely.

4. Conclusions

To investigate the long-term effects of variations in $p\text{CO}_2$ on stable carbon isotope ratios in plants, the isotope composition of fossil oak leaves of 8.2 and 6.5 Ma grown at 360 and 280 ppmv, respectively, was determined. As in extant oaks, sun leaves appeared slightly ^{13}C -enriched when compared with shade leaves and individual n -alkanes generally ^{13}C -depleted with respect to bulk leaves. Along with a lack of homogenisation of the isotope signal between the fossils and the surrounding sediment, these findings pointed to an absence of significant diagenetic alteration of the isotope signal in the fossils. Although growth chamber experiments suggested that the isotope composition of extant oak leaves may be not sensitive to $p\text{CO}_2$ variations, the 6.5 Ma leaves exhibit

slightly higher isotope discrimination than the 8.2 Ma leaves. However, this difference is only of 0.5‰ and its origin cannot be unequivocally assessed since other environmental parameters could be responsible for it. Thus it appears that if plant carbon isotope composition is sensitive to long-term $p\text{CO}_2$ variations, its response is rather minimal and therefore does not appear to prevent the use of fossil plant isotope composition as a palaeoecological tool. Otherwise, although the potential sources of isotope variation were limited in this study (e.g., only one species and one organ investigated, $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ documented), too many parameters appear to influence plant $\delta^{13}\text{C}$ values so that it is almost impossible to draw marked trends with global environmental parameters such as $p\text{CO}_2$. Moreover, the coupling between various environmental parameters can complicate response patterns of plant isotope signal even further. Temperature for instance is coupled to $p\text{CO}_2$ via the so-called greenhouse effect. Otherwise, as noted by Schleser et al. (1999b), the response of plant isotope composition to variations in environmental parameters is probably not linear and it would be useful, in future, to precisely characterise these transfer functions.

Acknowledgements

We are grateful to M. van Alphen, T. Zalm, N. Welters, J. van Tongeren and G. Nobbé for technical assistance. We would like to thank J.W. de Leeuw, J. van der Burgh and L. Simon for helpful discussions. The analytical part of the study was supported by a grant from the European Community (Marie Curie Fellowship).

References

- Arens, N.C., Jahren, A.H., Amundson, R., 2000. Can C3 plants faithfully record the carbon isotopic composition of atmospheric carbon dioxide? *Paleobiology* 26, 137–164.
- Balesdent, J., Mariotti, A., 1996. Measurements of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. In: Boutton, T.W., Yamasaki, S.-I. (Eds.), *Mass Spectrometry of Soils*. Marcel Dekker, New York, pp. 83–111.
- Beerling, D.J., 1996. ^{13}C discrimination by fossil leaves during the late-glacial climate oscillation 12–10 Ka BP: measurements and physiological control. *Oecologia* 108, 29–37.
- Beerling, D.J., 1997. Carbon isotope discrimination and stomatal responses of mature *Pinus sylvestris* L. trees exposed in situ for three years to elevated CO_2 and temperature. *Acta Oecologica* 18, 697–712.
- Beerling, D.J., Matey, D.P., Chaloner, W.G., 1993. Shifts in the $\delta^{13}\text{C}$ composition of *Salix herbacea* L. leaves in response to spatial and temporal gradients of atmospheric CO_2 concentrations. *Proceedings of the Royal Society of London B* 253, 53–60.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion in ^{13}C of lignin and its applications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Berner, R.A., 1991. A model for atmospheric CO_2 over Phanerozoic time. *American Journal of Science* 291, 339–376.
- Blue, M.P., Jensen, R.J., 1988. Positional and seasonal variation in oak (*Quercus*; Fagaceae) leaf morphology. *American Journal of Botany* 75, 939–947.
- Bocherens, H., Friis, E.M., Mariotti, A., Pedersen, K.R., 1993. Carbon isotopic abundances in Mesozoic and Cenozoic plants: palaeoecological implications. *Lethaia* 26, 347–358.
- Collister, J.W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analysis of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolism. *Organic Geochemistry* 21, 619–627.
- Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P., 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 33, 507–559.
- Degens, E.T., 1969. Biogeochemistry of stable carbon isotopes. In: Eglinton, G., Murphy, M.T. (Eds.), *Organic Geochemistry: Methods and Research*. Springer, Berlin, pp. 304–329.
- Ehleringer, J.R., 1991. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionation studies and its utility in terrestrial plant fractionation. In: Coleman, D.E., Fry, B. (Eds.), *Carbon Isotope Techniques*. Academic Press, San Diego, pp. 187–200.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E., 1995. Atmospheric CO_2 and the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentration in plants. *Tree Physiology* 15, 105–111.
- Ehleringer, J.R., Cooper, T.A., 1988. Correlations between carbon isotope ratios and microhabitats in desert plants. *Oecologia* 76, 562–566.
- El-Otmani, M., Coggins Jr., C.W., 1985. Fruit development and growth regulator effects on normal alkanes of “Washington” navel orange fruit epicuticular wax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 656–663.
- Farquhar, G.D., Richards, R.A., 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11, 539–552.
- Farquhar, G.D., O’Leary, M., Berry, J.A., 1982a. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9, 121–137.
- Farquhar, G.D., Ball, M.C., von Caemmerer, S., Roskandic, Z., 1982b. Effects of salinity and humidity on $\delta^{13}\text{C}$ values of halophytes. Evidence for diffusional isotope fractionation determined by the ratio of intercellular/atmospheric partial pressure of CO_2 under different environmental conditions. *Oecologia* 52, 121–124.

- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T., 1989. Carbon discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 503–537.
- Feng, X., 1998. Long-term C_i/C_a response of trees in western North America to atmospheric CO_2 concentration derived from carbon isotope chronologies. *Oecologia* 117, 19–25.
- Feng, X., Epstein, S., 1995. Carbon isotopes of trees from arid environments and its applications for reconstructing atmospheric CO_2 concentrations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 2599–2608.
- Freeman, K.H., Hayes, J.M., 1992. Fractionation of carbon isotopes by phytoplankton and estimates of ancient CO_2 levels. *Global Biogeochemical Cycles* 6, 185–198.
- Friend, A.D., Woodward, F.I., Switurl, V.R., 1989. Field measurements of photosynthesis, stomatal conductance, leaf nitrogen and $\delta^{13}C$ along altitudinal gradients in Scotland. *Functional Ecology* 3, 117–122.
- Gannes, L.Z., Martínez del Rio, C., Koch, P., 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiology and ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A, 725–737.
- Globalview- CO_2 , 2001. Cooperative Atmospheric Data Integration Project — Carbon Dioxide. CD-ROM, NOAA CMDL, Boulder, Colorado [Also available on Internet via anonymous FTP to <ftp.cmdl.noaa.gov>, Path: [ccg/co2/GLOBALVIEW](ftp://ccg/co2/GLOBALVIEW)].
- Gröcke, D.R., 2002. The carbon isotope composition of ancient CO_2 based on higher-plant organic matter. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A* 360, 633–658.
- Guy, R.D., Reid, D.M., 1986. Photosynthesis and the influence of CO_2 -enrichment on $\delta^{13}C$ values in a C_3 halophyte. *Plant, Cell and Environment* 9, 65–72.
- Hamilton, J.G., Thomas, R.B., Belucia, E.H., 2001. Direct and indirect effects of elevated CO_2 on leaf respiration in a forest ecosystem. *Plant, Cell and Environment* 24, 975–982.
- Hemming, D.L., Switurl, V.R., Waterhouse, J.S., Heaton, T.H.E., Carter, A.H.C., 1998. Climate variation and the stable carbon isotope composition of tree ring cellulose: an intercomparison of *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* and *Pinus silvestris*. *Tellus* 50 B, 25–33.
- Hertog, J., den Stulen, I., Lambers, H., 1993. Assimilation, respiration and allocation of carbon in *Plantago major* as affected by atmospheric CO_2 levels. *Vegetatio* 104/105, 369–378.
- Huang, Y., Eglinton, G., Ineson, P., Latter, P.M., Bol, R., Harkness, D., 1997. Absence of carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes in a 23-year decomposition experiment with *Calluna vulgaris*. *Organic Geochemistry* 26, 497–501.
- Hultine, K.R., Marshall, J.D., 2000. Altitude trends in conifer leaf morphology and stable carbon isotope composition. *Oecologia* 123, 32–40.
- Juniper, B.E., Jeffree, C.E., 1983. *Plant Surfaces*. Edward Arnold, London.
- Kerp, H., 1990. The study of fossil Gymnosperms by mean of cuticular analysis. *Palaios* 5, 548–569.
- Koch, P.L., Zachos, J.C., Dettman, D.L., 1995. Stable isotope stratigraphy and paleoclimatology of the Paleogene Bighorn Basin (Wyoming, USA). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 115, 61–89.
- Kogami, H., Hanba, Y.T., Kibe, T., Terashima, I., Masuzawa, T., 2001. CO_2 transfer conductance, leaf structure and carbon isotope discrimination of *Polygonum cuspidatum* leaves from low and high altitudes. *Plant, Cell and Environment* 24, 529–538.
- Körner, C., Farquhar, G.D., Roksandic, Z., 1988. A global survey of carbon isotope discrimination in plants from high altitude. *Oecologia* 74, 623–632.
- Körner, C., Farquhar, G.D., Wong, S.C., 1991. Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia* 74, 623–632.
- Kürschner, W.M., 1997. The anatomical diversity of recent and fossil leaves of the durmast oak (*Quercus petraea*, Liebl./*Q. pseudocastanea*, Goepf.)—implication for their use as biosensors of paleoatmospheric CO_2 levels. *Review of Palaeobotany and Palynology* 96, 1–30.
- Kürschner, W.M., van der Burgh, J., Visscher, H., Dilcher, D.L., 1996. Oak leaves as biosensors of Late Neogene and early Pleistocene paleoatmospheric CO_2 concentrations. *Marine Micropaleontology* 27, 299–312.
- Kürschner, W.M., Stulen, I., Kuiper, P.J.C., 1998. Comparison of experimental data and palaeobotanical observations on the response of the durmast oak (*Quercus petraea*, Liebl.) to climate change: gas exchange and modification in stomatal parameters. *Annals of Botany* 81, 644–657.
- Kuypers, M.M.M., Pancost, R., Sinninghe Damsté, J.S., 1999. A large and abrupt fall in atmospheric CO_2 concentrations during Cretaceous times. *Nature* 399, 342–345.
- Lajtha, K., Michener, R.H., 1994. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Leavitt, S.W., Long, A., 1991. Seasonal stable-carbon isotope variability in tree rings: possible paleoenvironmental signal. *Chemical Geology* 87, 59–70.
- Lockheart, M.J., van Bergen, P.F., Evershed, R.P., 1997. Variations in the stable carbon isotope composition of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher plant-derived sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 26, 137–153.
- Lockheart, M.J., Poole, I., van Bergen, P.F., Evershed, R.P., 1998. Leaf carbon isotope composition and stomatal characters: important considerations for palaeoclimate reconstructions. *Organic Geochemistry* 29, 1003–1008.
- Lücke, A., Helle, G., Schleser, G.H., Figueiral, I., Mosbrugger, V., Jones, T.P., Rowe, N.P., 1999. Environmental history of the German Lower Rhine Embayment during the Middle Miocene as reflected by carbon isotopes in brown coal. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 154, 339–352.
- Marshall, J.D., Monserud, R.A., 1996. Homeostatic gas-exchange parameters inferred from $^{13}C/^{12}C$ in tree rings of conifers. *Oecologia* 105, 13–21.
- Martinelli, L.A., Almeida, S., Brown, I.F., Moreira, M.Z., Victoria, R.L., Sternberg, L.S.L., Ferreira, C.A.C., Thomas, W.W., 1998. Stable isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in tropical forest in Rondônia, Brazil. *Oecologia* 114, 170–179.
- Masle, J., Farquhar, G.D., Gifford, R.M., 1990. Growth and carbon economy of wheat seedlings as affected by soil resistance to

- penetration and ambient partial pressure of CO₂. Australian Journal of Plant Physiology 17, 465–487.
- Mook, W.G., 1986. ¹³C in atmospheric CO₂. Netherlands Journal of Sea Research 20, 211–223.
- Mooney, H.A., Bullock, S.H., Ehleringer, J.R., 1989. Carbon isotope ratios of plants of a tropical dry forest in Mexico. Functional Ecology 3, 137–142.
- Nambudiri, E.M.V., Tidwell, W.D., Smith, B.N., Heber, N.P., 1978. A C₄ plant from the Pliocene. Nature 276, 816–817.
- Nguyen Tu, T.T., Kvaček, J., Uličný, D., Bocherens, H., Mariotti, A., Broutin, J., 2002. Isotope reconstruction of plant palaeoecology. Case study of Cenomanian floras from Bohemia. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 183, 43–70.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Bardoux, G., Mariotti, A., 2004. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes. Organic Geochemistry 35, 317–329.
- O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. Phytochemistry 20, 553–567.
- Park, R., Epstein, S., 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. Geochimica et Cosmochimica Acta 21, 110–126.
- Pearman, G.I., Francey, R.J., Fraser, P.J.B., 1976. Climatic implications of stable isotopes in tree rings. Nature 260, 771–772.
- Peñuelas, J., Ascón-Bieto, J., 1992. Changes in leaf δ¹³C of herbarium plant species during the last 3 centuries of CO₂ increase. Plant, Cell and Environment 15, 485–489.
- Peñuelas, J., Estiarte, M., 1997. Trends in plant carbon concentration and plant demand for N throughout this century. Oecologia 109, 69–73.
- Picon, C., Guehl, J.M., Aussenac, G., 1996. Growth dynamics, transpiration and water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated *p*CO₂ and drought. Annals of Forest Science 53, 431–446.
- Polley, H.W., Johnson, H.B., Mayeux, H.S., 1992. Growth and gas exchange of oats (*Avena sativa*), wild mustard (*Brassica kaber*) at subambient CO₂ concentrations. International Journal of Plant Science 153, 453–461.
- Polley, H.W., Johnson, H.B., Marino, B.D., Mayeux, H.S., 1993. Increase of water-use efficiency and biomass over Glacial to present CO₂ concentration. Nature 361, 61–64.
- Polley, H.W., Johnson, H.B., Mayeux, H.S., 1995. Nitrogen and water requirements of C₃ plants grown at glacial to present carbon dioxide concentration. Functional Ecology 9, 86–96.
- Popp, B.N., Takigiku, R., Hayes, J.M., Louda, J.W., Baker, E.W., 1989. The post-Paleozoic chronology and mechanisms of ¹³C-depletion in primary marine organic matter. American Journal of Science 289, 436–454.
- Raven, J.A., Sprent, J.J., 1989. Phototrophy, diazotrophy and palaeoatmospheres: biological catalysis and H, C, N, and O biological cycles. Journal of the Geological Society 146, 161–170.
- Rigby, D., Batts, B.D., Smith, J.W., 1981. The effects of maturation on the isotopic composition of fossil fuels. Organic Geochemistry 3, 29–36.
- Scheffuß, E., Schouten, S., Jansen, J.H.F., Sinninghe Damsté, J.S., 2003. African vegetation is controlled by tropical sea surface temperatures during the mid-Pleistocene. Nature 422, 418–421.
- Schleser, G.H., 1990. Investigation of the δ¹³C pattern in leaves of *Fagus sylvatica* L. Journal of Experimental Botany 41, 565–572.
- Schleser, G.H., Frielingsdorf, J., Blair, A., 1999a. Carbon isotope behaviour in wood and cellulose during artificial aging. Chemical Geology 158, 121–130.
- Schleser, G.H., Helle, G., Lücke, A., Vos, H., 1999b. Isotope signals as climate proxies: the role of transfer functions in the study of terrestrial archives. Quaternary Science Review 18, 927–943.
- Schneider, H., Thiele, S., 1965. Geohydrologie des Erftgebietes. Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf. 185 pp.
- Shackleton, N.J., Hall, M.A., 1997. The Late Miocene stable isotope record, site 926. Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results 154, 367–373.
- Smith, B.N., Oliver, J., McMillan, C., 1976. Influence of carbon source, oxygen concentration, light intensity and temperature on ¹³C/¹²C ratios in plant tissues. Botanical Gazette 137, 99–104.
- Spezzaferri, S., McKenzie, J.A., Isem, A., 2002. Linking the oxygen isotope record of late Neogene eustasy to sequence stratigraphic patterns along the Bahamas margin: results from a paleoceanographic study of ODP Leg 166, Site 1006 sediments. Marine Geology 185, 95–120.
- Tieszen, L.L., 1991. Natural variations in the carbon isotope values of plants: implications for archaeology, ecology and paleoecology. Journal of Archaeological Science 18, 227–248.
- Troughton, J.H., 1972. Carbon isotope fractionation by plants. Proceedings of the 8th International Congress on Radiocarbon. The Royal Society of New Zealand, Wellington, pp. 420–457.
- Troughton, J.H., Card, K.A., Björkmann, O., 1974. Temperature effects on the carbon isotope ratios of C₃, C₄ and CAM plants. Carnegie Institute of Washington Year Book 73, 780–783.
- Utescher, T., Gebka, M., Mosbrugger, V., Schilling, H.-D., Ashraf, A.R., 1997. Regional palaeontological-meteorological palaeoclimate reconstruction of the Neogene Lower Rhine Embayment. Mededelingen Nederlands Instituut voor Toegepaste Geowetenschappen TNO 57, 263–271.
- Utescher, T., Mosbrugger, V., Ashraf, A.R., 2000. Terrestrial climate evolution in Northwest Germany over the last 25 million years. Palaios 15, 430–449.
- van Bergen, P.F., Poole, I., 2002. Stable carbon isotopes of woods: a clue to palaeoclimate? Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 182, 31–45.
- van de Water, P.K., Leavitt, S.W., Betancourt, J.L., 1994. Trends in stomatal density and ¹³C/¹²C ratios of *Pinus flexilis* needles during last glacial-interglacial cycle. Science 264, 239–243.
- van der Burgh, J., 1987. Miocene floras in the Lower Rhenish basin and their ecological interpretation. Review of Palaeobotany and Palynology 52, 299–366.
- van der Burgh, J., 1993. Oaks related to *Quercus petraea* from the Upper tertiary of the Lower Rhenish Basin. Palaeontographica B 230, 195–201.
- van der Burgh, J., 2001. Changes in the leaves of Fagaceae during the Late Miocene and Pliocene in the Lower Rhine Embayment. Acta Palaeobotanica 41, 283–297.

- Waring, R.H., Silvester, W.B., 1994. Variations in foliar $\delta^{13}\text{C}$ values within the crowns of *Pinus radiata* trees. *Tree Physiology* 14, 1203–1213.
- Wayne, P.M., Reeckie, E.G., Bazzaz, F.A., 1998. Elevated CO_2 ameliorates birch response to high temperature and frost stress: implication for modelling climate-induced geographic range shifts. *Oecologia* 114, 335–342.
- Wechsung, F., Garcia, R.L., Wall, G.W., Kartschall, T., Kimball, B.A., Michaelis, P., Pinter Jr., P.J., Wechsung, G., Grossman-Clarke, S., Lamorte, R.L., Adamsen, F.J., Leavitt, S.W., Thompson, T.L., Matthias, A.D., Brooks, T.J., 2000. Photosynthesis and conductance of spring wheat ears field in response to free-air CO_2 enrichment and limitations in water and nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* 23, 917–929.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292, 686–693.
- Zagwijn, W.H., Hager, H., 1987. Correlation of continental and marine Neogene deposits in the south-eastern Netherlands and the Lower Rhine District. *Mededelingen van de Werkgroep voor Tertiaire en Kwartaire Geologie* 24, 59–78.
- Zhu, J., Goldstein, G., Bartholomew, D.P., 1999. Gas exchange and carbon isotope composition of *Ananas comosus* in response to elevated CO_2 and temperature. *Plant, Cell and Environment* 22, 999–1007.



Leaf lipid degradation in soils and surface sediments: A litterbag experiment



Thanh Thuy Nguyen Tu^{a,*}, Céline Egasse^b, Christelle Anquetil^a, Florent Zanetti^b, Bernd Zeller^c, Sylvain Huon^d, Sylvie Derenne^a

^a Sorbonne Universités, UPMC, Univ Paris 06, CNRS, EPHE, UMR 7619 Metis, 4, place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

^b UMR 7207 CR2P MNHN-CNRS-UPMC CR2P, MNHN, Case courrier 48, 57 rue Cuvier, 75 231 Paris cedex 05, France

^c UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, Centre INRA de Nancy, 54 280 Champenoux, France

^d UPMC, iEES Paris, UMR 7618 CNRS-UPMC-INRA-IRD-UPEC-Univ. Paris Diderot., Case 120, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2016

Received in revised form 29 November 2016

Accepted 1 December 2016

Available online 05 December 2016

Keywords:

Diagenesis

Biomarker

Litterbag

Leaf lipids

Soil

Surface sediment

GC–MS

ABSTRACT

The fate of leaf lipids upon early diagenesis was monitored in a two year litterbag experiment in a soil and at the water-sediment interface of an adjacent pond. The biomarker content of degrading leaves exhibited substantial variability among litterbags, even for a given time step within a given environmental condition, likely reflecting natural microenvironmental variability. Due to this variability and the oxic conditions in the pond, no substantial difference between the soil and the pond could be evidenced in the biomarker degradation pattern. An occasional increase in the abundance of several biomarkers (β -sitos-terol, oleanolic acid, C₁₆ phytyl ester, C₂₇ *n*-alkane) was also noted during the experiment, which was attributed to release of bound compounds and/or an external contribution. Nevertheless, absolute quantification showed that the concentration of all lipid constituents was reduced, but they exhibited different decay profiles: (i) rapid extensive degradation (phytyl ester), (ii) exponential-like decrease (fatty lipids) and (iii) variable degradation profile (polycyclic triterpenoids). However, all the main constituents initially present in the senescent leaves were still detected after two years of degradation in both environments. Fatty lipids abundances generally decreased to < 10% of the initial content but the main distribution features (carbon number maximum and predominance) remained unchanged. The results thus tend to validate their use as proxy for source and environment in ancient organic matter. They also suggest that, on a mid-term basis, a plant biomarker signature is not substantially affected by differential degradation in soil and at the water-sediment interface, at least for a qualitative approach.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid biomarkers constitute efficient tools for tracing the sources of organic matter (OM) in marine (Harada et al., 1995; Aquilina et al., 2010), fluvial (Jaffé et al., 1995; Hemingway et al., 2016) or lacustrine environments (Rieley et al., 1991; Jacob et al., 2007). Quantifying biomarker variation through sedimentary sequences facilitates reconstruction of past environmental variability over various timescales, from centuries (McCaffrey et al., 1991; Ortiz et al., 2016) to millions of years (Pearson and Obaje, 1999; Tzortzaki et al., 2013). However, the diagenetic fate of biomarkers must be assessed before their distribution and abundance can be used as quantitative proxies. From their structures, it would be anticipated that different biomarkers would exhibit

varying degrees of susceptibility to degradation, which would ultimately affect their preservation in sediments (Meyers and Ishiwatari, 1993). Several stability scales have been established for lipids in sediments; *n*-alkanes are generally considered as the most stable components, while functionalized compounds such as pigments or *n*-alkanols as the most readily degraded (Cranwell, 1981; Colombo et al., 1997). Sterols and fatty acids (FAs) exhibit intermediate stability that varies according to functionality and degree of unsaturation (Cranwell, 1981; Meyers and Ishiwatari, 1993; Colombo et al., 1997). Environmental parameters in the water column, at the water-sediment interface and within the sediment also influence lipid degradation/preservation (Meyers, 1997; Rontani and Volkman, 2003).

Vascular plants are major contributors to sedimentary OM and plant biomarkers often serve as proxies for continental OM in marine sediments (Volkman, 1986; Hedges and Oades, 1997). The plant biomarker signature in sediments can be biased by

* Corresponding author.

E-mail address: thanh-thuy.nguyen_tu@upmc.fr (T.T. Nguyen Tu).

differences in productivity among taxa, and biomarker solubility or transport mode (Diefendorf et al., 2014). Among polycyclic terpenoids, Giri et al. (2015) showed that these pre-sedimentation processes tend to favor diterpenoids at the expense of triterpenoids, leading to an overestimation of conifer input vs. angiosperm input in paleovegetation reconstruction. Before deposition in marine sediments, plant detritus may remain for varying extents of time in soil and/or in fresh water. The contrasting degradation conditions in these environments may in turn affect the plant biomarker signature. Surface degradation of a given plant on land was shown to modify bulk leaf chemistry to a different extent than degradation in buried conditions (Webster and Benfield, 1986; Steart et al., 2009). Although the fate of molecular biomarkers was independently studied in several environments via various approaches (e.g. soil litterbags, soil/sediment profiles/sections, laboratory incubations; Cranwell, 1981; Meyers and Ishiwatari, 1993; Rieley et al., 1998; Zech et al., 2011; Wiesenberg et al., 2012; Wang et al., 2014), comparative studies addressing the fate of biomarkers in diverse natural environments are rare. However, the plant biomarkers recovered from sedimentary OM may have undergone different pre-burial histories that may have influenced their robustness as a quantitative proxy.

As the comparative fate of plant lipids in different environments is not fully documented, the aim of the present study was to compare the degradation of lipids from a given plant species in two differing environments: soil and the water-sediment interface. The investigation focused on leaf lipids, as epicuticular wax is the main source of the fatty lipids commonly used as continental biomarkers in marine sediments. The study was based on a litterbag experiment, in order to (i) allow the recovery of the small leaf debris generally obtained after several months of degradation and (ii) precisely monitor the changes undergone in the leaves initially introduced into the bags, without potential bias due to contamination by other plant material. European beech (*Fagus sylvatica* L.) was chosen because it commonly occurs in temperate forests. The lipid composition of the leaves from two litterbag experiments conducted simultaneously in a soil and in a nearby pond was investigated to test whether these different environments might lead to different biomarker signatures. The key questions were: Do different lipid classes degrade similarly in these two environments? Is the distribution of fatty lipids modified similarly in the two environments?

2. Material and methods

2.1. Experimental site

The experiment was set up in the “Breuil-Chenué” experimental forest site, in Burgundy, France (47°18'10"N, 4°4'44"E). The forest is part of the “Parc Naturel Régional du Morvan”, a protected area where urban pollution is minimal. The experimental area is on a shelf 650 m above sea level and exhibits a slight northwest facing slope. Mean annual temperature and precipitation at the site are 9 °C and 1280 mm, respectively. The bedrock is the alkaline granite of “La Pierre qui Vire”, covered by a thin layer of eolian silt. The incubations took place in a 30 yr old European beech (*Fagus sylvatica* L.) stand planted after a clear-cut in 1976, and in a ca. 300 m² adjacent pond, respectively. The soil is classified as a dystic cambisol (WRB, 2006) with moder-type humus. It is acidic with pH 4–4.5 and has a poorly saturated cation exchange complex. More information on the site is available elsewhere (Moukoui et al., 2006; Andrianarisoa et al., 2010). The pond had a maximum depth of 1.5 m. The main characteristics were determined using a CTD (conductivity – temperature – depth) probe equipped with additional sensors and external fluorometers (ASD sensors). During

the course of the study the water column displayed nearly constant temperature, electrical conductivity and pH with water depth (Supplementary Table A.1). The water had a slightly acid pH (ca. 6.1), low dissolved ion load (low electrical conductivity, ca. 25.7 μ S/cm), low turbidity (FTU < 20), high CDOM content (chromolenic dissolved OM, > 200 μ g/l) and saturated or close to saturation dissolved O₂ concentration (ca. 98%). Overall, this is typical of surface and subsurface waters of forests soils on granitic substratum (Beaucaire and Michard, 1982). Thermal stratification only occurs during summer, when photosynthetic activity is enhanced (high chlorophyll-*a* concentration and oversaturation for dissolved O₂; Supplementary Table A.1 and Fig. A.1).

2.2. Litterbag incubations

At the end of October 2004, senescent leaves were collected from the beech stand where the soil incubation took place. The soil litterbag experiment has been described elsewhere (Nguyen Tu et al., 2011). The leaves were collected from the same height (ca.1.5 m) from the branches of several different trees in order to provide an averaged composition and to minimize bias linked to intrapopulation variability. After harvesting, the leaves were rinsed with distilled water to remove extraneous particles and dried at 45 °C to constant weight. Each batch was composed of 10–15 leaves and corresponded to ca. 1 g OM. Batches were assembled using leaves from as many different trees as possible to provide equivalent batches.

Litterbags (9.5 × 14.5 cm) were made of Al wire; mesh size was 1.4 × 1.8 mm, i.e. sufficient to retain small leaf litter debris but sufficiently large to permit free entry of mesofauna (main functional group at the site) and microbial activity (bacteria and fungi). Pond litterbags were ballasted with glass sticks to maintain them at the bottom of the pond. Before being enclosed in litterbags, leaves were weighed and then re-moistened with distilled water to recreate natural conditions. The litterbags were placed in the field in December 2004. Litterbags (in duplicate) were then regularly retrieved over 2.5 yr: after 5, 10, 15, 20, 30, 40, 52, 79 and 129 weeks for the soil, and 9, 27, 66 and 100 weeks for the pond. The soil litterbags correspond to the unlabeled leaves analyzed before for their specific alkane isotope composition (Nguyen Tu et al. (2011)).

2.3. Lipid extraction and fractionation

The recovered material was first rinsed with distilled water to remove obvious extraneous particles such as moss, roots or arthropods. Leaves were then dried at 45 °C to constant weight and weighed. Samples were stored dark in Al foil at 5 °C until analysis. All the leaves for each litterbag were combined and ground fine enough to pass through a 500 μ m mesh. Leaf powder was ultrasonically extracted for 20 min with CH₂Cl₂/MeOH (2/1; v/v). The mixture was centrifuged (10 min, 4000 rpm) and the lipids were recovered in the supernatant. The extraction procedure was repeated 6× with the centrifugation residue. The combined extracts were concentrated via rotary evaporation and dried under N₂. The extract was fractionated using column chromatography on alumina (Sigma-Aldrich 507C, ca. 150 mesh) deactivated to Brockmann grade IV by adding 0.1 wt% distilled water. The non-polar fraction (1) was recovered with heptane. The slightly polar fraction (2) was recovered with toluene. The medium polarity fraction (3) was recovered with CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂/MeOH (9/1; v/v). Each fraction was concentrated via rotary evaporation and dissolved in ca. 3 ml heptane, toluene, and CH₂Cl₂, respectively. The main components of the three fractions were quantified using internal standards: tetratriacontane for fraction 1 and tricosan-1-ol for fractions 2 and 3.

2.4. Analysis

The hydrocarbon fraction was analyzed as such, while the other two fractions were converted to trimethylsilyl derivatives prior to analysis. Aliquots (30 μ l) of the fractions were dried under N_2 and then silylated with 30 μ l N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) for 1 h at 80 °C. After cooling, the aliquot was dried under a gentle stream of N_2 and dissolved in 30 μ l of appropriate solvent (toluene for fraction 2 and CH_2Cl_2 for fraction 3). Assignment and quantification of lipids were carried out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and GC with flame ionization detection (FID, 350 °C), respectively. Separation was with an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a split/splitless injector (350 °C) and fitted with a fused silica column, coated with VF5-MS (50 m \times 0.32 mm i.d., 0.12 μ m film thickness). The GC conditions were: 80 °C to 100 °C at 10 °C/min, and then to 325 °C (held 30 min) at 4 °C/min. He was the carrier gas at a constant 2 ml/min. For GC-MS an Agilent 5973N electron impact mass spectrometer (70 eV, scan range m/z 35–800) was used. Components were assigned according to library and published mass spectra. Quantification was achieved from the response factor in GC-FID of the measured components and comparison of GC-FID peak areas with those of the internal standards, introduced to the fractions in known amount. Response factors were obtained from calibration curves of the standard and the component, or compound with similar structure, polarity and molecular weight, if no reference compound was available. Coelution in GC-FID occasionally prevented quantification of some lipid components. Biomarker content was quantified as μ g/g dry biomass and further expressed in % relative to initial content in Fig. 1 for comparison purposes.

3. Results and discussion

3.1. Biomarker behavior

The composition of lipids from senescent leaves of *Fagus sylvatica* has been described by Nguyen Tu et al. (2007). The lipids were dominated by sterols, the most abundant being β -sitosterol, and to a lesser extent, by acyclic isoprenoids, including phytadienes and phytol esters (C_6 – C_{20} , max. C_{16}). Oleanolic triterpenoids, mainly oleanolic acid, and fatty lipids were also abundant. The latter comprise homologous series with even chain length predominance: mainly *n*-alkan-1-ols (C_{14} – C_{30} , max. C_{28}), *n*-acids (C_8 – C_{28} , max. C_{16} , C_{28}) and, to a lesser extent, *n*-aldehydes (C_{20} – C_{32} , max. C_{28}). Predominantly odd numbered series also occurred in substantial amounts: mainly *n*-alkanes (C_{12} – C_{33} , max. C_{27}), and to a lesser extent *n*-alkan-2-ols (C_{23} – C_{29} , max. C_{27}) and *n*-alkan-2-ones (C_{25} – C_{29} , max. C_{27}). The lipid fingerprint of degrading beech leaves revealed no major qualitative changes during 2 yr of diagenesis in the soil or at the water-sediment interface. Most of the initial components were still present at the end of the experiment and no degradation products were evidenced. Quantification of the main components of each lipid class for each degradation stage showed that the concentration of all the biomarkers studied was (i) very variable but (ii) substantially reduced at the end of the experiment, although to varying extent (Fig. 1).

3.2. Variability in biomarker concentration

In this 2 yr experiment, the biomarker content of degrading leaves exhibited substantial variability among litterbags, even for a given time step within a given environmental condition (Fig. 1). Therefore, we address the potential origin of such variability before discussing degradation patterns. The difference in biomarker content between replicate litterbags maximized in soil at 70% and 100% of initial leaf content, for oleanolic acid and C_{16}

phytyl ester, respectively. Other quantified compounds (β -sitosterol, C_{16} acid, C_{28} alcohol and C_{27} alkane) exhibited maximum differences between replicate litter bags of around 40%. Such variability may relate to (i) initial variability of leaf lipid content and/or to (ii) variability in microenvironmental conditions. The concentration of leaf lipids is known to vary substantially between species, within species, within individuals and even within a given leaf (Herbin and Robins, 1969; Gülz et al., 1991; Gao et al., 2015). In agreement with the lower variability of in vitro experiments vs. field studies, the variability in lipid decay is higher here than reported for beech lipids in a laboratory experiment (Rieley et al., 1998). Soils, and especially forest soils, are recognized as highly heterogeneous environments (Hedges and Oades, 1997; Bélanger and Van Rees, 2008; Lehmann et al., 2008). A number of biogeochemical characteristics of soils commonly vary within a few decimeters, so that different decay profiles between litterbags separated by ca. 20 cm is not unexpected (Witkamp and Olson, 1963; Murphy et al., 1998; Suchewaboripont et al., 2011). Additionally, the main drivers of litter decomposition in Breuil-Chenue experimental forest are saprophytic fungi, which are represented mainly by three species (*Mycena inclinata*, *Mycena galopus* and *Phallus impudicus*) that generally exhibit a heterogeneous spatial distribution (Zeller et al., 2007). Decay conditions within sediments are believed to exhibit smaller spatial variability, although leaf degradation at the water-sediment interface under a substantial water column has seldom been investigated in the field. Nevertheless, leaf decomposition in seawater and stream water was shown to be variable over a few months monitoring and/or within small areas (Suberkropp et al., 1976; Rublee and Roman, 1982; Webster and Benfield, 1986; Boulton and Boon, 1991; Machás et al., 2006; Moretti et al., 2007). Hydrocarbon and FA content of deciduous leaves degrading in a blackwater stream were shown to vary substantially over three months (Mills et al., 2001).

3.3. Occasional increase in biomarker concentration

The lipids occasionally exhibited a higher content in degrading leaves than in initial senescent leaves. That was the case for 4 of the 6 classes investigated: β -sitosterol reached 112% of its initial content in pond leaves after 27 weeks of degradation, oleanolic acid had a content of between 114% and 141% for some litterbags in the soil and in the pond between 9 and 40 weeks of degradation, 123% of the initial C_{16} phytol ester was detected after 5 weeks in a soil litterbag, and the *n*- C_{27} alkane reached 124% and 103% of its initial content in pond litterbags after 27 and 103 weeks, respectively. Laboratory incubation of beech leaves by an estuarine microbial community (Rieley et al., 1998) also showed an initial sterol increase that was attributed to the release of free compounds from a bound state. Grass degradation in soil litterbags similarly exhibited an occasional increase in *n*-alkane content over 10 months, reaching up to 230% of the initial content (Wang et al., 2014). Initial increase in alkane content was also noted in maple, ash and beech leaves during a 2 year litterbag degradation, and their deuterium content suggested a microbial contribution (Zech et al., 2011). Isotope characterization (^{13}C) of the alkanes from the soil litterbags of the present study showed that microbial alkanes also contributed to the alkane pool in degrading leaves (Nguyen Tu et al., 2011). The occasional increase in some of the biomarkers may thus reflect either an external contribution, especially for rather ubiquitous compounds such as fatty lipids, and/or moiety release from bound structures.

3.4. Biomarker degradation profiles

Degradation at the water-sediment interface would be expected to be less extensive than in a soil. However, in the present

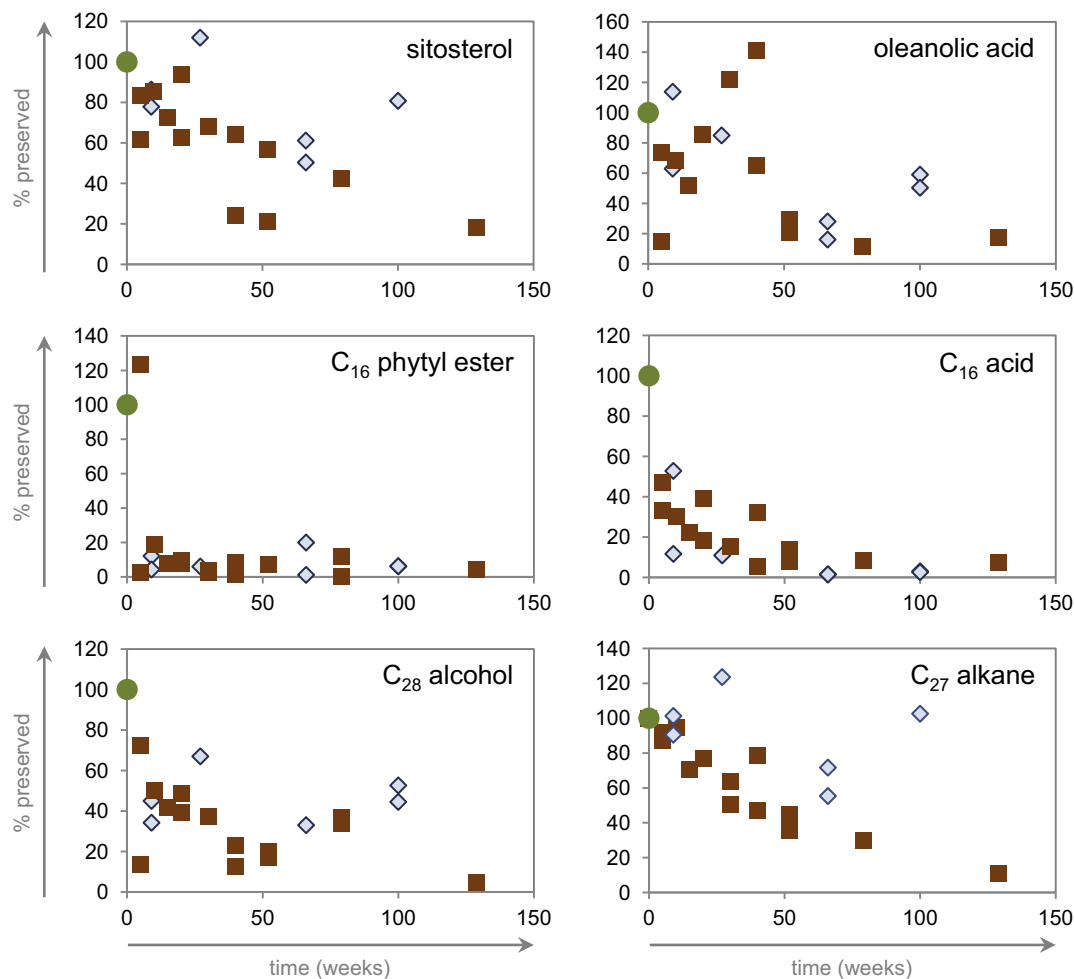


Fig. 1. *Fagus sylvatica* leaf lipid degradation profiles. Concentration (% relative to initial concentration) of major lipid components vs. time: ■, soil; ◇, pond water-sediment interface.

experiment the high variability in biomarker concentration precludes such a conclusion (Fig. 1). Indeed, this high variability prevented calculation of representative decay rates for most biomarkers. Consequently, no difference in degradation rates could be evidenced between the soil and the pond litterbags. This lack of slower degradation in the pond than in the soil may also be partly due to the oxic conditions at the bottom of the pond (Section 2.1), which are known to be more favorable for degradation than anoxic ones. The variability of the present results calls for caution when comparing decomposition patterns, but the quantified lipids seemed to degrade according to three main profiles, at least during the first 6 months (Fig. 1).

- Phytol esters were rapidly extensively degraded, as shown by the phytol hexadecanoate content, which dropped to $\leq 10\%$ after 15 weeks in the soil, as well as in the pond.
- Fatty lipids (*n*-alkanes, *n*-acids and *n*-alcohols) underwent exponential-like decrease, reaching ca. 7% of the initial content at the end of the experiment. Mass loss of bulk leaves is often approximated by an exponential decay model in soils and streams, as the rate of mass loss is assumed to be a constant fraction of the amount of material remaining (Olson, 1963; Webster and Benfield, 1986). The present results may thus suggest similar degradation kinetics for fatty lipids.
- Polycyclic triterpenoids exhibited a variable degradation pattern and remained at $\geq 15\%$ of the initial content after 2 yr, as shown by the β -sitosterol and oleanolic acid profiles (Fig. 1).

These results mainly match those reported for a three month laboratory incubation of beech leaves, although the mentioned laboratory experiment was more favorable for phytol ester preservation and less for alkanes (Rieley et al., 1998). The present results also differ slightly from the stability scales often deduced from sediment studies since *n*-alkanes are generally considered as the most stable lipid components and functionalized polycyclic terpenoids as being moderately stable (Cranwell, 1981; Colombo et al., 1997). Our results thus emphasize the complexity and variability of lipid degradation in natural environments.

3.5. Distribution pattern of fatty lipids

Despite the substantial degradation of fatty lipids, their main distribution pattern at the end of the experiment was similar to the starting one (Table 1, Fig. 2): they remained markedly dominated by a single homologue (*n*-C₂₈ for alcohols, *n*-C₁₆ for acids, and *n*-C₂₇ for alkanes), with a slight narrowing of the distribution range. Chain length distribution indexes remained similar to the initial values (Table 1): the average chain length (ACL) centered around the dominant homologue and the carbon preference index (CPI) close to zero for acids and alcohols, and markedly > 1 for alkanes. The only noticeable change in lipid series distribution concerns FAs, for which the long chain homologue (*n*-C₂₈) was rapidly degraded (i.e. no longer detectable

Table 1
Distribution pattern of main fatty lipid series in *F. sylvatica* leaves.

	<i>n</i> -Alkanes			<i>n</i> -Acids			<i>n</i> -Alcohols		
	C _{range} (C _{max})	ACL ^a	CPI ^b	C _{range} (C _{max} C _{submax})	ACL ^a	CPI ^b	C _{range} (C _{max})	ACL ^a	CPI ^b
Initial leaves	C ₁₂ -C ₃₃ (C ₂₇)	26.4	9.9	C ₉ -C ₂₈ (C ₁₆ , C ₂₈)	16.1	0.0	C ₁₄ -C ₃₀ (C ₂₈)	25.3	0.0
Pond	C ₂₅ -C ₂₉ (C ₂₇)	27.0	54.5	C ₉ -C ₂₄ (C ₁₆)	15.8	0.0	C ₁₆ -C ₃₀ (C ₂₈)	26.4	0.1
Soil	C ₁₂ -C ₃₃ (C ₂₇)	26.9	14.7	C ₉ -C ₂₄ (C ₁₆)	16.6	0.1	C ₁₆ -C ₃₀ (C ₂₈)	26.2	0.0

^a $\sum(n \times [C_n]) / \sum[C_n]$.

^b $[C_{17+19+21+23+25+27+29+31+33}] / [C_{16+18+20+22+24+26+28+30+32}]$.

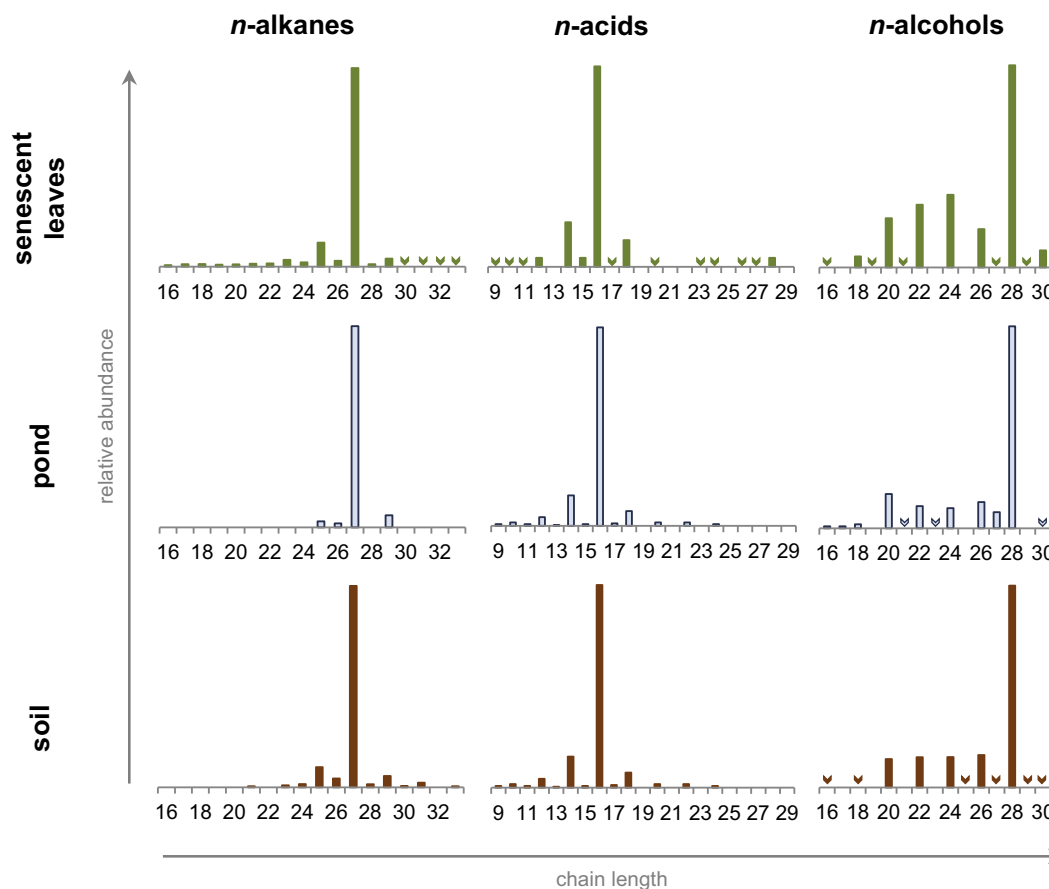


Fig. 2. Distribution of *n*-alkanes, *n*-acids and *n*-alcohols in senescent leaves and after 2 yr degradation in a soil and at the water-sediment interface of a pond. Arrows indicate when a homologue was detected but was below quantification level.

after 5 weeks). However, such degradation did not modify chain length distribution indexes (Table 1). On the contrary, several studies have reported ACL and CPI modifications through degradation (Meyers and Ishiwatari, 1993; Huang et al., 1996; Celerier et al., 2009; Zech et al., 2011; Wiesenberger et al., 2012), which were attributed to various causes, including contribution from microbial lipids, root lipids or else anthropogenic pollution. Nevertheless, *n*-alkanes from several grass species in soil litterbags showed variable degradation profiles but no change in ACL and CPI (Wang et al., 2014), similarly to the present study. Taken together, the results suggest that, in spite of degradation and potential contribution from external lipids, the original plant lipids can remain the main source of lipids in degraded plant debris and can typically retain their chain length characteristics. The results thus tend to validate the use of chain length characteristics of aliphatic series for source and paleoenvironment reconstruction, at least on the mid-term scale (i.e. a few years).

4. Conclusions

Comparative degradation of leaf lipids in a soil and at the water-sediment interface of a well oxygenated pond revealed that most of the biomarkers exhibited highly variable content, likely reflecting natural microenvironmental variability. Due to this variability and the oxic conditions in the pond, no substantial difference between the soil and the pond could be detected in biomarker degradation patterns during the 2 yr litterbag decay. All the constituents initially present in the senescent leaves were degraded, although to variable extent. Phytol esters were the most extensively degraded, while polycyclic triterpenoids appeared relatively better preserved, with fatty lipids exhibiting intermediate degradation patterns. Nevertheless, the main lipid constituents of initial senescent leaves were still detected after 2 yr degradation in both environments. During the experiment, an occasional increase in the abundance of several biomarkers was noted, implying moiety release from bound structures and/or an external contribution.

Although fatty lipid concentrations were markedly reduced, the distribution patterns were not substantially affected, validating their use as source and environmental biomarkers in ancient OM. The results suggest that, for the mid-term, a plant biomarker signature is not substantially affected by differential degradation in soil and at the water-sediment interface under oxic conditions, at least for a qualitative approach.

Acknowledgements

We are indebted to J. Ranger for access to the experimental site of Breuil-Chenu forest and D. Gelhaye, J.P. Calmet and P. Richard for assistance in the field. Thanks are also due to C. Fichot for access to the pond. J. Broutin is acknowledged for encouragement and support to build an organic chemistry laboratory in his department. We are grateful to B. David and S. Lemettre for help in lipid preparation. We also thank S. Peigné and S. Nguyen Tu for technical assistance. The work was funded by a grant from the Fond National pour la Science of France (ACI JC 10051 - notification 035214). Thanks are also due to S. Feakins and an anonymous referee, who provided constructive reviews.

Appendix A. Supplementary material

Geochemical characteristics of the water column are given: the range of values measured in the water column (Table A1) and examples of typical depth profiles for environmental parameters (Fig. A1). Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.12.001>.

Associate Editor—K.G.J. Nierop

References

- Andrianarisoa, K., Zeller, B., Poly, F., Siegenfuhr, H., Bienaimé, S., Ranger, J., Dambrine, E., 2010. Control of nitrification by tree species in a common-garden experiment. *Ecosystems* 13, 1171–1187.
- Aquilina, A., Knab, N.J., Knittel, K., Kaur, G., Geissler, A., Kelly, S.P., Fossing, H., Boot, C.S., Parkes, R.J., Mills, R.A., Boetius, A., Lloyd, J.R., Pancost, R.D., 2010. Biomarker indicators for anaerobic oxidizers of methane in brackish-marine sediments with diffusive methane fluxes. *Organic Geochemistry* 41, 414–426.
- Beaucaire, C., Michard, G., 1982. Origin of dissolved minor elements (Li, Rb, Sr, Ba) in superficial waters in a granitic area. *Geochemical Journal* 16, 247–258.
- Bélangier, N., Van Rees, K.C.J., 2008. Sampling forest soil. In: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Eds.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, pp. 15–24.
- Boulton, A.J., Boon, P.I., 1991. A review of methodology used to measure leaf litter decomposition in lotic environments: Time to turn over an old leaf? *Marine & Freshwater Research* 42, 1–43.
- Celerier, J., Rodier, C., Favetta, P., Lemeé, L., Ambles, A., 2009. Depth-related variations in organic matter at the molecular level in a loamy soil: reference data for a long-term experiment devoted to the carbon sequestration research field. *European Journal of Soil Science* 60, 33–43.
- Colombo, J.C., Silverberg, N., Gearing, J.N., 1997. Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough-II. Changes in composition of fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons during early diagenesis. *Organic Geochemistry* 26, 257–274.
- Cranwell, P.A., 1981. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* 3, 79–89.
- Diefendorf, A.F., Freeman, K.H., Wing, S.L., 2014. A comparison of terpenoid and leaf fossil vegetation proxies in Paleocene and Eocene Bighorn Basin sediments. *Organic Geochemistry* 71, 30–42.
- Gao, L., Guimond, J., Thomas, E., Huang, Y., 2015. Major trends in leaf wax abundance, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values along leaf venation in five species of C_3 plants: physiological and geochemical implications. *Organic Geochemistry* 78, 144–152.
- Giri, S.J., Diefendorf, A.F., Lowell, T.V., 2015. Origin and sedimentary fate of plant-derived terpenoids in a small river catchment and implications for terpenoids as quantitative paleovegetation proxies. *Organic Geochemistry* 82, 22–32.
- Gülz, P.G., Müller, E., Prasad, R.B.N., 1991. Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves. *Phytochemistry* 30, 769–773.
- Harada, N., Handa, N., Fukuchi, M., Ishiwatari, R., 1995. Source of hydrocarbons in marine sediments in Lützow-Holm bay, Antarctica. *Organic Geochemistry* 23, 229–237.
- Hedges, J.I., Oades, J.M., 1997. Comparative organic geochemistry of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry* 27, 319–361.
- Hemingway, J.D., Scheffuß, E., Dinga, B.J., Pryer, H., Galy, V.V., 2016. Multiple plant-wax compounds record differential sources and ecosystem structure I large river catchments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 184, 20–40.
- Herbin, G.A., Robins, P.A., 1969. Patterns of leaf variation and development in leaf wax alkanes. *Phytochemistry* 8, 1985–1998.
- Huang, Y., Bol, R., Harkness, D.D., Ineson, P., Eglinton, G., 1996. Post-glacial variations in distributions, ^{13}C and ^{14}C contents of aliphatic hydrocarbons and bulk organic matter in three types of British acid upland soils. *Organic Geochemistry* 24, 273–287.
- Jacob, J., Disnar, J.R., Boussafir, M., Spadano Albuquerque, A.L., Sifeddine, A., Turcq, B., 2007. Contrasted distributions of triterpene derivatives in the sediments of Lake Çaço reflect paleoenvironmental changes during the last 20,000 yrs in NE Brazil. *Organic Geochemistry* 38, 180–197.
- Jaffé, R., Wolff, G.A., Cabrera, A.C., Chitty, H.C., 1995. The biogeochemistry of the rivers of the Orinoco Basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4507–4522.
- Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Dathe, L., Wirick, S., Jacobsen, C., 2008. Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nature Geoscience* 1, 238–242.
- Machás, R., Santos, R., Peterson, B., 2006. Elemental and stable isotope composition of *Zostera noltii* (Horneman) leaves during the early phases of decay in a temperate mesotidal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66, 21–29.
- McCaffrey, M.A., Farrington, J.W., Repeta, D.J., 1991. The organic geochemistry of Peru margin surface sediments: II. Paleoenvironmental implications of hydrocarbon and alcohol profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 483–498.
- Meyers, P.A., 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry* 27, 213–250.
- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry—an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867–900.
- Mills, G.L., McArthur, J.V., Wolfe, C., Aho, J.M., Rader, R.B., 2001. Changes in fatty acid and hydrocarbon composition of leaves during decomposition in a southeastern blackwater stream. *Archiv Für Hydrobiologie* 152, 315–328.
- Moretti, M., Gonçalves, J.F., Callisto, M., 2007. Leaf breakdown in two tropical streams: differences between single and mixed species packs. *Limnologia* 37, 250–258.
- Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Berthelin, J., Ranger, J., 2006. Effect of tree species substitution on organic matter biodegradability and mineral nutrient availability in temperate topsoil. *Annals of Forest Science* 63, 763–771.
- Murphy, K.L., Klopatek, J.M., Coe-Klopatek, C., 1998. The effects of litter quality and climate on decomposition along an elevational gradient. *Ecological Applications* 8, 1061–1071.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Bardoux, G., Biron, P., Ponge, J.-F., David, B., Derenne, S., 2011. Early degradation of plant alkanes in soils: A litterbag experiment using ^{13}C -labelled leaves. *Soil Biology Biochemistry* 43, 2222–2228.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Derenne, S., 2007. Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *Comptes Rendus Palevol* 6, 451–461.
- Olson, J.S., 1963. Energy storage and the balance of products and decomposers in ecological systems. *Ecology* 44, 322–331.
- Ortiz, J.E., Sánchez-Palencia, Y., Torres, T., Domingo, L., Mata, M.P., Vegas, J., Sánchez España, J., Morellón, M., Blanco, L., 2016. Lipid biomarkers in Lake Enol (Asturias, Northern Spain): coupled natural and human induced environmental history. *Organic Geochemistry* 92, 70–83.
- Pearson, M.J., Obaje, N.G., 1999. Onocerane and other triterpenoids in Late Cretaceous sediments from the Upper Benue Trough, Nigeria: tectonic and paleoenvironmental implications. *Organic Geochemistry* 30, 583–592.
- Riele, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G., 1991. The biogeochemistry of Ellesmere Lake U.K. -I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Organic Geochemistry* 17, 901–912.
- Riele, G., Raven, A.M., Lawson, A., Evershed, R.P., Parkes, R.J., Maxwell, J.R., 1998. Laboratory studies on sedimentary lipids preservation: different preservation potential inferred for leaf and algal lipids. *Ancient Biomolecules* 2, 177–183.
- Rontani, J.F., Volkman, J.K., 2003. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* 34, 1–35.
- Rublee, P.A., Roman, M.R., 1982. Decomposition of turtlegrass (*Thalassia testudinum* König) in flowing sea-water tanks and litter bags: compositional changes and comparison with natural particulate matter. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58, 47–58.
- Stear, D.C., Greenwood, D.R., Boon, P.I., 2009. The chemical constraints upon leaf decay rates: taphonomic implications among leaf species in Australian terrestrial and aquatic environments. *Review of Palaeobotany and Palynology* 157, 358–374.
- Suberkropp, K., Godshalk, G.L., Klug, M.J., 1976. Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology* 57, 720–727.
- Suchewaboripont, V., Pongpam, S., Patanaponpaiboon, P., 2011. Zonal variation in leaf-litter decomposition in a secondary mangrove forest. *Tropics* 20, 1–10.
- Tzortzaki, E., Karakitsios, V., Tsikos, H., 2013. Biomarker evidence for intermittent photic zone euxinia in the Aptian-Albian organic sedimentary record from the Ionian Zone (Epirus, Greece). *Organic Geochemistry* 64, 84–93.
- Volkman, J.K., 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry* 9, 83–99.

- Wang, G., Zhang, L., Zhang, X., Wang, Y., Xu, Y., 2014. Chemical and carbon isotopic dynamics of grass organic matter during litter decompositions: a litterbag experiment. *Organic Geochemistry* 69, 106–113.
- Webster, J.R., Benfield, E.F., 1986. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17, 567–594.
- Wiesenberg, G.L.B., Schneckenberger, K., Schwark, L., Kuzyakov, Y., 2012. Use of molecular ratios to identify changes of *Miscanthus × giganteus* (Greef et Deu.) soil during a laboratory experiment. *Organic Geochemistry* 46, 1–11.
- Witkamp, M., Olson, J.S., 1963. Breakdown of confined and non-confined oak litter. *Oikos* 14, 138–147.
- Zech, M., Pedenchouk, N., Buggle, B., Leiber, K., Kalbitz, K., Markovic, S.B., Glaser, B., 2011. Effect of leaf litter degradation and seasonality on D/H isotope ratios of *n*-alkane biomarkers. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 4917–4928.
- Zeller, B., Brechet, C., Maurice, J.-P., LeTacon, F., 2007. ¹³C and ¹⁵N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Forest Science* 64, 419–429.

Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes

T.T. Nguyen Tu^{a,*}, S. Derenne^b, C. Largeau^b, G. Bardoux^a, A. Mariotti^a

^aLaboratoire de Biogéochimie des Milieux Continentaux, UMR 7618 UPMC-CNRS-INRA, Centre INRA de Versailles-Grignon, Bâtiment EGER, 78 850 Thiverval-Grignon, France

^bLaboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, CNRS UMR 7573, 11 Rue Pierre et Marie Curie, 75 231 Paris Cédex 05, France

Received 24 April 2003; accepted 24 October 2003
(returned to author for revision 28 July 2003)

Abstract

The stable carbon isotope compositions of individual *n*-alkanes extracted from leaves of (1) *Ginkgo biloba* degrading in a well-drained soil and (2) *Eretmophyllum*, a fossil *Ginkgoale*, were investigated in a first approach to refining the estimate of potential diagenetic effects on the isotopic composition of sedimentary alkanes derived from higher plants; *n*-alkanes extracted from fresh leaves of *G. biloba* appeared ¹³C-depleted when compared with bulk leaves. Within a given extract they exhibited characteristic variability in specific isotope composition with respect to chain length. Although the isotope composition of bulk leaves remained unchanged through senescence and litter formation, the specific *n*-alkane isotopic composition varied in two respects: (i) general ¹³C-enrichment in all *n*-alkanes and (ii) homogenisation of specific isotopic composition of all the *n*-alkanes of a given extract. As for fresh and degrading leaves of *G. biloba*, *n*-alkanes extracted from the fossil *Eretmophyllum* appeared ¹³C-depleted when compared with bulk leaves. Their isotope distribution patterns suggested that the isotope composition of fossil alkanes may have been slightly affected by diagenesis. Results for degrading leaves and fossil leaves (1) indicated that the isotope composition of individual alkanes can be more affected by degradation than that of bulk leaves and (2) confirmed that the isotope signal in fossils, and sedimentary organic matter in general, may be less altered than in the organic matter of well-drained soil.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Stable carbon isotope ratios in organic geochemistry

Stable carbon isotope ratios can differ among living organisms and may vary according to environmental conditions (e.g. reviews by Deines, 1980; Gannes et al., 1998; Dawson et al., 2002). The isotope composition of

sedimentary organic carbon is thus often used, in combination with other tools, to infer the biological sources of organic matter and palaeoenvironmental conditions (e.g. Fogel and Cifuentes, 1993; Popp et al., 1997). However, diagenetic processes can lead to (i) carbon loss by various chemical transformations such as defunctionalisation or depolymerisation of biomolecules (e.g. Macko et al., 1993; Czimczik et al., 2002) and/or (ii) selective preservation of some resistant constituents of organic matter relative to more degradable compounds (e.g. Derenne et al., 1990; Hedges and Prahl, 1993). Therefore, stable carbon isotope ratios can be altered in bulk organic matter, if the carbon which is lost upon diagenesis by microbial/chemical degradation

* Corresponding author at present address: Laboratoire de Paléobotanique et Paléoécologie, CEB- EA 3496, Université Paris VI, 12 Rue Cuvier, 75 005 Paris, France. Fax: +33-1-44-27-65-72.

E-mail address: ttnguyen@snv.jussieu.fr (T.T. Nguyen Tu).

has $\delta^{13}\text{C}$ values significantly different from the preserved carbon (e.g. Benner et al., 1987; Schleser et al., 1999; van Bergen and Poole, 2002). To avoid bias due to differential alteration of the various constituents of organic matter, several authors have suggested the use of compound specific isotope analysis of biomarkers that are stable over geological time (Hayes et al., 1990; Macko, 1994; Popp et al., 1997). Recent isotope geochemical studies are thus based on the individual isotopic composition of various biomarkers. Among these, isoprenoids and alkyl lipids, notably *n*-alkanes, are the most commonly used (e.g. Kennicutt and Brooks, 1990; Harada et al., 1995; Grice et al., 1996; Huang et al., 2000; Schouten et al., 2000).

1.2. Diagenesis effects on isotope composition of biomarkers

The utilization of the isotope composition of individual biomarkers is based on the assumption that diagenesis induces little fractionation at the molecular level. Hayes et al. (1990) have indeed demonstrated for Cretaceous sediments that geoporphyrins and acyclic isoprenoids retain their original isotope composition. Individual characterisation of long-chain fatty acids from recent sediments has also suggested that early diagenesis and bacterial reworking have not significantly affected the isotope composition (Naraoka and Ishiwarati, 2000). In addition, Grice et al. (1996), have shown for Permian sediments that sulfurisation, which can represent an important process during diagenesis, does not significantly bias the interpretation of the isotope composition of free lipids, in terms of biological sources. Nevertheless, experimental evidence for the absence of isotope fractionation during diagenesis is scarce for the biomarkers used in geochemistry. Grice et al. (1998) have demonstrated that zooplankton herbivory does not affect the isotope composition of long-chain alkenones and sterols. Except for that study, most of the experiments on the subject deal with molecules that are (1) known for their chemical sensitivity to degradation and (2) are seldom used as biomarkers. For example, Macko et al. (1994) and Fogel and Tuross (1999) showed that the isotopic composition of individual amino acids can be strongly affected by early diagenesis. In the same way, Harvey and Macko (1997) detected a ^{13}C -enrichment in residual short-chain fatty acids (C_{12} – C_{18}) after 40 days of biodegradation. Bioremediation studies have also frequently revealed a ^{13}C -enrichment trend through biodegradation of individual hydrocarbon pollutants (i.e. benzene, styrene and toluene; e.g. Stehmeier et al., 1999; Ahad et al., 2000), which is in agreement with the ^{13}C -depletion (vs. substrate) often observed for the inorganic carbon released during biodegradation of organic matter (e.g. Blair et al., 1985; Baedeker et al., 1993; Zyakun, 1996). However, it is

not yet well established whether this fractionation effect, observed on small molecules, can significantly affect the isotope composition of molecules containing many more carbon atoms, such as the biomarkers generally used in geochemistry.

1.3. Potential diagenesis effects on isotope composition of *n*-alkanes

Straight chain alkanes are among the most commonly used biomarkers for specific compound isotope analysis. Stahl (1980) detected a slight ^{13}C -enrichment in the bulk alkane fraction isolated from petroleum after 40 days of biodegradation. So far, only a few studies have experimentally investigated the effects of diagenesis on the specific carbon isotope composition of long-chain *n*-alkanes. Mansuy et al. (1997) noticed a slight but non-significant ^{13}C -enrichment in the *n*-alkanes of an Oklahoma crude oil remaining after two months of laboratory biodegradation within a sand and water environment. Huang et al. (1997) reported the absence of carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes from shoots of *Calluna vulgaris* after 23 years of decomposition within a peaty soil. Mazéas et al. (2002) also reported a remarkably constant alkane isotope composition during the degradation of an Arabian light crude oil by an enriched bacterial community. The experiment was run in a simulated marine aerobic environment and degradation appeared extensive after 11 days.

The above studies were undertaken under specific experimental conditions and further experiments, representative of the various environments existing on Earth, are necessary to validate fully the use of individual *n*-alkanes as an isotope record of palaeoenvironments. Moreover, the aforementioned studies were performed under either stagnant water or acid and anaerobic environments that are often considered as exhibiting slower rates of organic matter decomposition than well-drained, neutral and aerobic environments. These environmental differences in the general intensity of organic matter degradation are also valid for the evolution of isotope composition. Indeed, Nadelhoffer and Fry (1988) have shown, for example, that diagenesis can lead to significantly different evolution of the isotope composition of bulk organic carbon in well-drained soil and in stagnant water soil.

1.4. Aim of study

One of the most important sources of long-chain *n*-alkanes in sediments is terrestrial plants (e.g. Eglinton and Hamilton, 1967), although a variety of organisms such as microalgae, bacteria, dinoflagellates, diatoms and fungi can also produce long-chain *n*-alkanes (e.g. Nishimura and Baker, 1986; Volkman et al., 1998).

Higher plant detritus often undergoes a more or less long stay in soils before sedimentation. Moreover, early diagenesis appears to be a crucial step in the fractionation of bulk isotope ratios of plant debris after death (e.g. Benner et al., 1987; Schleser et al., 1999). Therefore, monitoring the evolution of the isotope composition of *n*-alkanes extracted from leaves undergoing degradation in a well-drained, aerobic and neutral soil, should significantly contribute to the knowledge of the isotope fractionation that specific hydrocarbons can undergo during diagenesis.

The isotope characterisation of *n*-alkanes extracted from fossil plants may provide additional information on the diagenesis of plant debris. Indeed, like sedimentary organic matter and contrary to soil debris, fossils undergo a long diagenetic evolution. Furthermore, geochemical analysis of morphologically well-defined fossils has an advantage over analysis of bulk organic matter (e.g. in sediments) because the problems associated with contributions derived from multiple sources are not encountered. Therefore, the study of *n*-alkanes from degrading leaves and *n*-alkanes extracted from fossil leaves should allow us to refine the estimate of potential diagenetic effects on the isotope composition of sedimentary hydrocarbons and thus lead to a better use of compound-specific isotope analysis for palaeoenvironmental reconstruction.

1.5. Methodology

This study represents a first approach to evaluating the effects of the first steps of early diagenesis on the isotope composition of individual *n*-alkanes in a well-drained, aerobic and neutral soil, by characterising the long-chain *n*-alkanes extracted from *Ginkgo biloba* leaves undergoing degradation in the above-ground litter of a brown soil. Leaves at various degradation stages (i.e. fresh, senescent, litter) were sampled at relatively short time intervals (i.e. July, August, December, January and March) in an attempt to estimate the timing of early diagenesis effects on the isotope composition of individual *n*-alkanes. The isotopic composition of individual alkanes was compared with that of bulk leaves, to weigh the timing of the potential diagenetic effects on individual alkanes against the well known effects on bulk leaves.

Palaeoflora from the Cenomanian (± 90 m.y.) of France and the Czech Republic provide an exceptional opportunity for investigating the effects of diagenesis on specific compound isotope composition in fossils. Indeed, previous studies have shown that the bulk isotope signal of these fossils has not been significantly affected by diagenesis (Nguyen Tu et al., 1999, 2002). Moreover, the Cenomanian palaeoflora includes two fossil Ginkgoales, *Eretmophyllum andegavense* and *Eretmophyllum obtusum*. *Eretmophyllum* is a totally

extinct genus and its closest living relative is *G. biloba*, which is the only living representative of the Ginkgoales order. Furthermore, *E. andegavense* lipid extracts were previously shown to include substantial amounts of *n*-alkanes (Nguyen Tu et al., 2003).

Therefore, in addition to the detailed study of degrading leaves of *G. biloba*, some fossil leaves of *Eretmophyllum* were investigated for specific *n*-alkane isotope determination. Rather than an exhaustive survey, this restricted sample set represents a first appraisal of the diagenetic variation that might be expected, in sediments, for the isotope composition of higher plant alkanes.

2. Material and methods

2.1. Samples

Each batch of samples (i.e. fresh, senescent, litter and fossil) corresponded approximately to 30 leaves in order to avoid bias linked to leaf morphotype and to obtain average isotope compositions representative of each batch.

2.1.1. Degrading leaves of *G. biloba*

Leaves of *G. biloba* were collected from a rural area where urban pollution is minimal (Massif Central), from a single tree growing on a brown soil with a mull-type humus. Reference samples of undegraded leaves (green leaves) were collected at the end of the growing season [i.e. July (sample “fresh 1”) and August (sample “fresh 2”) 1998] so as to limit bias linked to variation in chemical and isotope composition through the growing season (e.g. Gülz et al., 1991; Lockheart et al., 1997). One batch of senescent leaves (yellow) was collected in December 1998 and two batches of leaves from litters (brown) at different degradation stages were collected in January (sample “litter 1”) and March (sample “litter 2”) 1999. Leaves were collected from several representative branches of the same tree for the fresh and senescent samples, and at the base of this tree, all around the trunk on the topmost part of the soil, for the litter leaves.

2.1.2. Fossil leaves

Fossil leaves of *E. andegavense* and *E. obtusum* originated from Cenomanian deposits of France (“Argiles du Baugeois” member, “Le Gué de Moré” locality, north of Angers) and the Czech Republic (unit 3 of “Peruc” member, Pecínov quarry, west of Praha), respectively. The geological setting for these sites has been studied in detail previously: the two deposits similarly consist of grey and finely laminated clays deposited under anoxic conditions in lagoonal environments during the Cenomanian transgression in Europe (Louail,

1984; Uličný et al., 1997). Both deposits were located at close palaeolatitudes, $35 \pm 5^\circ\text{N}$ and $37 \pm 5^\circ\text{N}$ for France and the Czech Republic, respectively (Philip et al., 2000) and in the same semi-arid climatic zone (Parish et al., 1982). The sediments yielded a rich and abundant flora with excellent morphological preservation as shown by leaf aspect: they look like falling leaves during autumn. Their good morphological preservation suggests that burial occurred near the vegetation zone (Louail, 1984; Uličný et al., 1997).

The fossil flora is similar in both deposits and very diversified; it includes leaves, wood and reproductive organs of pteridophytes, angiosperms and numerous gymnosperms (Pons et al., 1980; Uličný et al., 1997). Among the gymnosperms, either *E. andegavense* or *E. obtusum* is one of the most abundant species of the French and Czech floras, respectively. *E. andegavense* and *E. obtusum* exhibit a number of similar morphological and anatomical characteristics, leading some authors to include them in the same species (Hlušník, 1986; Pons, personal communication). Several isotope and biogeochemical patterns showed that the isotope signal of the bulk leaves has not been significantly affected by diagenesis (Nguyen Tu et al., 1999, 2002). Multi-disciplinary characterisation of the fossiliferous deposits demonstrated that the various plants of the palaeoflora were distributed along salinity gradients in marine-influenced environments, with both *Eretmophyllum* species occupying among the most salt-influenced habitats in the environment (Uličný et al., 1997; Nguyen Tu et al., 1999, 2002). Significant and correlated variations in $\delta^{13}\text{C}$ and leaf-width demonstrated that *E. andegavense* and *E. obtusum* were both able to thrive in habitats of contrasting salinity (Nguyen Tu et al., 1999, 2002).

Fossil leaves of *E. andegavense* and *E. obtusum* were collected in May 1996 and July 1998, respectively. In each of the aforementioned sites, several sediment blocks were sampled at the same level from different parts of the outcrop. Two batches of *E. andegavense* (samples “fossil 1” and “fossil 2”) and one batch of *E. obtusum* (sample “fossil 3”) leaves were used for investigating the isotope composition of individual *n*-alkanes. Each batch consisted of leaves of similar bulk isotope composition (s.d. 0.6‰), grouped together after preliminary isotope measurements. The two batches of *E. andegavense* leaves respectively corresponded to leaves of significantly different bulk isotope composition and leaf width (i.e. leaves originating from contrasting salinity habitats).

2.2. Experimental

Blocks of sediments containing fossil leaves were taken from the field and leaves were separated from the embedding sediment in the laboratory by taking off the leaves shrivelled up after drying overnight at 50°C .

After collection, fossil and modern leaves were dusted free of any adhering particles using pre-extracted cotton wool, dried overnight at 50°C and stored in aluminium foil in the dark at ambient temperature until analysis. Before analysis, all the leaves in a given batch were combined in an agate mortar and ground to a fine homogeneous powder.

2.2.1. Bulk isotope analysis

Stable isotope ratios were measured on fossil and modern leaves using an automatic unit that combined an elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer. The samples were combusted in a Carlo-Erba CHN elemental analyser connected to a VG-SIRA 10 isotope ratio mass spectrometer. After flash combustion at 1000°C with copper oxide, CO_2 was cryogenically distilled, purified and introduced on-line into the mass spectrometer to determine carbon isotope ratios (Girardin and Mariotti, 1991; Bocherens and Mariotti, 1999). The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured with instrumental standard deviation of 0.02‰ and repeated measurements on the same sample showed a precision (1σ) of 0.1‰. Each sample was run in triplicate and tyrosine standards were run frequently between samples to obtain reliable mean values.

2.2.2. Lipid extraction and *n*-alkane isolation

Powdered fossil and modern leaves were extracted with 30 ml of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1, v/v) by stirring overnight at room temperature, the extract being recovered by 10 min centrifugation at 4000 rpm. Total lipids were fractionated by micro-column chromatography in a Pasteur pipette filled with approximately 500 mg of Al_2O_3 (activity I). For the fossil samples, fine copper turnings previously washed in acid and solvent were added above the alumina to remove elemental sulfur. Before fractionation of the lipid extract, the entire micro-column device was cleaned by elution with 10 ml heptane; alkanes were recovered in the hydrocarbon fraction after elution with 3 ml heptane. Hydrocarbon fractions were concentrated to dryness under nitrogen and redissolved in a small volume of heptane prior to analysis.

2.2.3. Isotope analysis of individual *n*-alkanes

Identification of *n*-alkanes was carried out by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry using a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph equipped with a split injector fitted with a fused silica capillary column, coated with CP-SIL-5CB (25 m \times 0.32 mm i.d., 0.12 μm film thickness) and a Hewlett-Packard 5989A quadrupole mass spectrometer, scanning from m/z 40 to 800 (electron energy 70 eV, scan time 1.3 s). The temperature programme was $100\text{--}300^\circ\text{C}$ at 4°C min^{-1} and then 300°C isothermal for 20 min, using helium as carrier gas. Identification of *n*-alkanes and other lipid constituents of fresh, senescent

and litter leaves of *G. biloba*, as well as fossil leaves of *E. andegavense*, were previously achieved on other samples collected at similar time periods. The results are discussed in detail elsewhere (Nguyen Tu et al., 2001, 2003). Briefly, *G. biloba* *n*-alkanes were dominated by odd-carbon-numbered homologues maximising at C₂₇ while *E. andegavense* *n*-alkanes maximised at C₂₉ without any strong odd/even predominance (Nguyen Tu et al., 2001, 2003). Compound specific $\delta^{13}\text{C}$ values of the dominant alkanes were determined with a gas chromatograph/isotope ratio mass spectrometer coupling a Micromass Isochrom III, including a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (50 m BPX 5 capillary column, i.d. 0.32mm, film thickness 0.50 μm , heating programme 100–300 °C at 3 °C min⁻¹, splitless injector at 320 °C) to an Isochron isotope ratio mass spectrometer via a Micromass combustion interface (CuO combustion furnace at 850 °C and cryogenic trap at -100 °C). The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured with instrumental standard deviation of the measurement being 0.1‰ and repeated measurements on a single sample showed a precision (1σ) of 0.5‰. Each sample was run in triplicate. Specific isotope composition of *n*-alkanes containing 21–27 carbon atoms are reported in Table 1 except when nearly coeluting unidentified compounds were present in the chromatogram. The isotope composition of homologues containing more than 27 carbon atoms was not investigated due to the presence of unresolved compounds around the *n*-alkanes in the chromatogram.

3. Results and discussion

3.1. Fresh leaves of *G. biloba*

Two batches of fresh leaves of *G. biloba* were investigated as reference samples for non-degraded leaves. The

C₂₂–C₂₇ *n*-alkanes were investigated for compound specific isotope analysis; their $\delta^{13}\text{C}$ values are similar for both batches and range from -33.0 to -30.0‰ (Table 1). In agreement with literature data (e.g. Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1997; Lockheart et al., 1997, 1998), individual alkanes appeared ¹³C-depleted when compared with bulk leaves (Table 1 and Fig. 1). The ¹³C-depletion of lipids with respect to bulk biomass is mainly due to a kinetic isotope effect associated with the oxidative decarboxylation of pyruvate into acetyl-CoA during lipid synthesis by the fatty acid synthase complex (O'Leary, 1976; DeNiro and Epstein, 1977; Monson and Hayes, 1982; Melzer and Schmidt, 1987; Hayes, 2001). The ¹³C-depletion measured for *G. biloba* alkanes varies from 2.3 to 5.3‰ (mean ¹³C-depletion of 3.9‰; Table 1 and Fig. 1). This depletion falls within the range previously reported for *n*-alkanes of higher plants using the C₃ photosynthetic pathway (i.e. 1.5–10.0‰). Nevertheless, the ¹³C-depletion measured here is among the smallest of this literature range (Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1997; Lockheart et al., 1997, 1998). DeNiro and Epstein (1977) pointed out that the magnitude of ¹³C-depletion of lipids may be species-specific. This probably accounts for (1) the large range of *n*-alkane ¹³C-depletion noted upon compilation of literature data on higher plants and (2) the rather weak ¹³C-depletion detected here for *G. biloba* *n*-alkanes.

Specific *n*-alkanes of fresh leaves of *G. biloba* tend to be more ¹³C-depleted with increasing chain-length (Table 1 and Fig. 2). Such a trend has been previously observed in 10 of the 35 higher plants investigated previously (i.e. Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1995; Grossi et al., 2003). However, it is not systematic; some plants exhibit an increasing $\delta^{13}\text{C}$ value with increasing alkane length (4/35) or show no particular trend related to chain

Table 1
Isotope composition of bulk samples and individual *n*-alkanes extracted from leaves of modern and fossil Ginkgoales^a

Sample	bulk	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	<i>n</i> -alkane average
<i>G. biloba</i>									
Fresh 1 (July)	-27.7	-	-30.0 (2.3)	-31.5 (3.8)	-30.5 (2.8)	-32.5 (4.8)	-32.2 (4.5)	-33.0 (5.3)	-31.6 (3.9)
Fresh 2 (August)	-27.8	-	-30.3 (2.5)	-31.2 (3.4)	-30.0 (2.2)	-32.3 (4.5)	-32.5 (4.7)	-32.7 (4.9)	-31.5 (3.7)
Senescent (December)	-27.5	-29.3 (1.8)	-30.0 (2.5)	-30.5 (3.0)	-31.9 (4.4)	-31.1 (3.6)	-	-	-30.6 (3.1)
Litter 1 (January)	-27.9	-	-29.2 (1.3)	-30.0 (2.1)	-29.8 (1.9)	-30.0 (2.1)	-30.5 (2.6)	-30.5 (2.6)	-30.0 (2.1)
Litter 2 (March)	-27.7	-	-	-28.5 (0.8)	-	-29.5 (1.8)	-28.7 (1.0)	-28.6 (0.9)	-28.8 (1.1)
<i>E. andegavense</i>									
Fossil 1	-25.5	-27.6 (2.1)	-27.0 (1.5)	-27.7 (2.2)	-27.7 (2.2)	-	-	-	-27.5 (2.0)
Fossil 2	-22.5	-24.8 (2.3)	-26.0 (3.5)	-25.5 (3.0)	-24.5 (2.0)	-	-	-	-25.2 (2.7)
<i>E. obtusum</i>									
Fossil 3	-24.7	-27.3 (2.6)	-27.4 (2.7)	-27.1 (2.4)	-26.8 (2.1)	-27.0 (2.3)	-26.8 (2.1)	-26.3 (1.6)	-27.0 (2.3)

^a Expressed as $\delta^{13}\text{C}$ values in per mil (‰), measurement precision being 0.5‰. Bracketed values correspond to the ¹³C-depletion for *n*-alkanes with respect to bulk leaves.

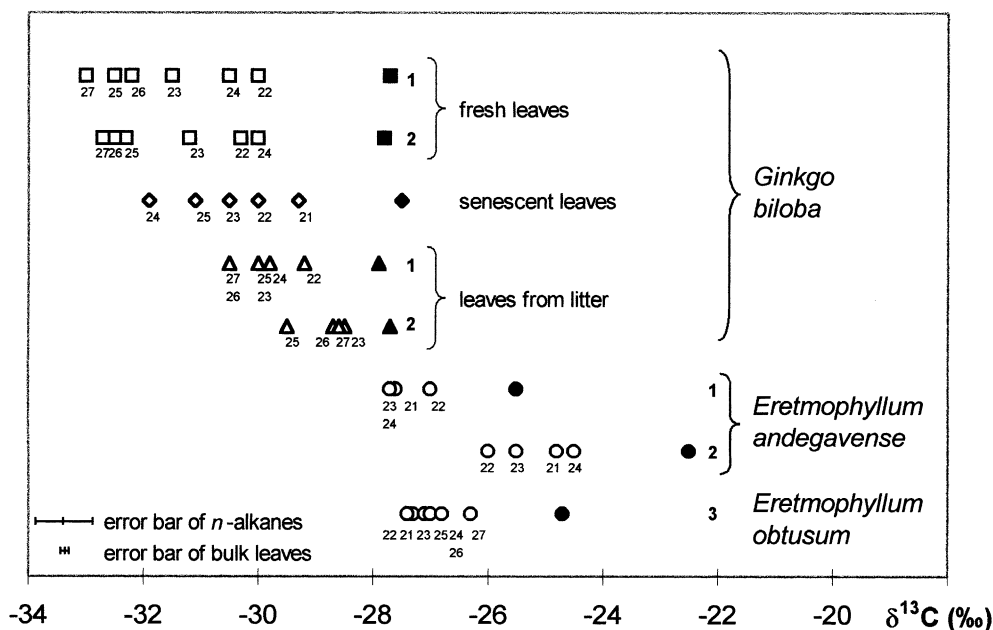


Fig. 1. Isotope composition of bulk samples (filled symbols) and individual n -alkanes (empty symbols) extracted from leaves of modern and fossil Ginkgoales.

length (Rieley et al., 1991, 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1995, 1997; Ficken et al., 1998). Moreover, the isotope distribution pattern of n -alkanes with respect to chain length may vary through the growing season (Lockheart et al., 1997). Nevertheless, increasing ^{13}C -depletion with increasing chain length is the most frequently reported trend for specific n -alkanes within a given plant sample so it might be of general significance (i.e. Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1995; Grossi et al., 2003). This trend probably accounts, at least partially, for the relatively weak ^{13}C -depletion, relative to bulk leaves, detected here for *G. biloba* alkanes. Indeed, the range of chain length investigated (C_{22} – C_{27}) includes relatively short chains when compared with those generally studied (C_{25} – C_{33}). Collister et al. (1994) suggested that this decrease in $\delta^{13}\text{C}$ value of alkanes with increasing chain length may be due to the combined effects of the two following factors: (1) $\delta^{13}\text{C}$ values of plants depend on environmental conditions (e.g. O’Leary, 1981; Farquhar et al., 1982) and (2) different homologues of a given series can be produced in different proportions at the various stages of the growing season (e.g. El-Otmani and Coggins, 1985; Güzl et al., 1991). For example, short-chain fatty lipids are generally synthesized earlier in the growing season than long-chain homologues (e.g. El-Otmani and Coggins, 1985; Güzl et al., 1991). Moreover, light intensity, for example, can be lower in spring than in summer. Since increasing light intensity induces a decrease in $\delta^{13}\text{C}$ values (e.g. Francey et al., 1985; Zimmerman and

Ehleringer, 1990), the mentioned factors can lead to lower $\delta^{13}\text{C}$ values for long-chain alkanes than for short-chain alkanes. However, the trend towards ^{13}C -depletion with increasing chain length has been observed in a wide variety of situations: open air and glasshouse, C_3 and CAM photosynthetic pathways, herbaceous and arborescent plants, evergreen and deciduous leaves, monocotyledonous and dicotyledonous taxa, modern and fossil plants (Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Huang et al., 1995, 1996; Lichtfouse et al., 1995). Such a diversity could suggest an additional cause for the decreasing trend observed for n -alkane isotope composition with increasing chain length. Long-chain alkyl lipids are derived from palmitic and stearic acids by successive additions of two-carbon atom units (e.g. Garrett and Grisham, 2000). A weak fractionation associated with each addition of two-carbons units may also contribute to the observed decrease. A weak fractionation at each step of chain elongation would explain why the effect could not be detected for short-chain components (DeNiro and Epstein, 1977) although it is detected for long chains. Such a fractionation associated with chain elongation has been suggested previously by Monson and Hayes (1980).

The n -alkanes from fresh leaves of *G. biloba* exhibit a marked odd/even predominance (Nguyen Tu et al., 2003). Nevertheless, the abundance of even homologues in the hydrocarbon fraction was sufficient to allow precise measurement of the carbon isotope composition. In the two studied batches of fresh leaves of *G. biloba*, even-carbon-numbered alkanes tend to exhibit $\delta^{13}\text{C}$ values slightly higher than odd-carbon-numbered

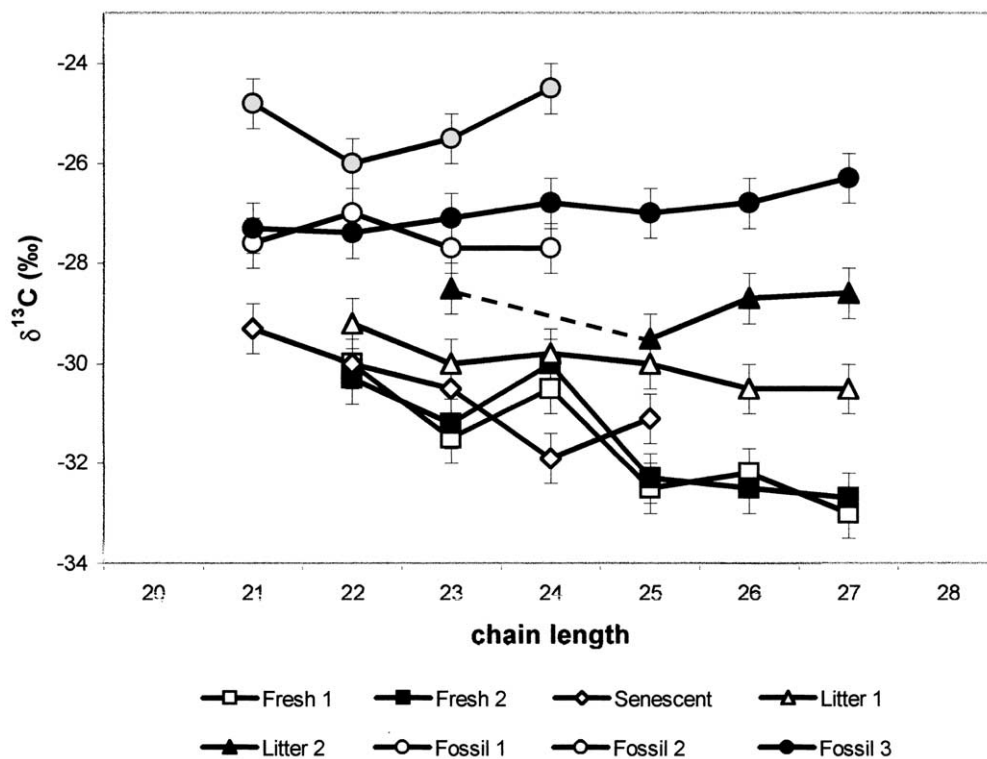


Fig. 2. Distribution of *n*-alkane isotope composition with respect to chain length.

homologues (Table 1 and Fig. 2). This trend is not significant for all *n*-alkanes since the difference between the specific isotope composition of a given C_n homologue and its C_{n-1} and C_{n+1} neighbours is sometimes only slightly higher than the analytical error. However, a majority of even-carbon-numbered alkanes exhibit $\delta^{13}C$ values significantly higher than their neighbours. Although far from systematic, it has also been reported for a few plants that, within a given series of fatty lipids, even and odd homologues exhibit significantly different $\delta^{13}C$ values (Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1995; Grossi et al., 2003). The specific isotope compositions of even-carbon-numbered *n*-alkanes and of the biosynthetically related odd-carbon-numbered *n*-acids and *n*-alcohols are rarely investigated due to their low abundance in plant extracts. Nevertheless, due to the low abundance of these components in plant extracts the same pattern has also been noted in some fossil plants (Huang et al., 1995), soil organic matter (Lichtfouse et al., 1995) and terrestrially-derived sedimentary organic matter (e.g. Kennicutt and Brooks, 1990; Ishiwarati et al., 1994; Schouten et al., 2001). The difference in specific isotope composition of odd and even *n*-alkanes reveals different origins. In the case of sedimentary and soil organic matter, this is generally attributed to two distinct sources of *n*-alkanes, i.e. higher plants for the odd homologues, and algae, bac-

teria, diagenesis or else pollution for the even homologues (e.g. Kennicutt and Brooks, 1990; Ishiwarati et al., 1994; Schouten et al., 2001). In the case of *n*-alkanes directly extracted from higher plants, the difference in specific isotope composition of even and odd homologues may be explained by three main hypotheses.

(1) The *n*-alkanes may originate from two distinct sources, i.e. plant lipids may have been contaminated by alkanes from other organisms, such as fungi or bacteria, of different isotope composition. Indeed, these microorganisms can synthesize long-chain fatty lipids (e.g. Jones, 1969; Welch and Burlingame, 1973; Volkman et al., 1998) and can exhibit $\delta^{13}C$ values significantly higher than those of terrestrial plants (e.g. Deines, 1980; Kohzu et al., 1999; Henn et al., 2002). However, less than 2% of the surface of healthy leaves is generally colonized by fungi or bacteria (Juniper and Jeffree, 1983) and scanning electron microscopy of the fresh leaves of *G. biloba* revealed no trace of microbial invasion (Nguyen Tu et al., 2001). Therefore, contamination by microbial lipids is unlikely to be the main factor accounting for the small ^{13}C -enrichment noted for the even-carbon-numbered *n*-alkanes of *G. biloba* fresh leaves.

(2) Odd and even homologues may have been synthesized at different periods, under different environmental conditions which would have affected their specific isotope composition. However, to the best of our

knowledge, such a differential synthesis of odd and even homologues has never been reported, perhaps because of the scarcity of studies dealing with even-carbon-numbered *n*-alkanes and the biosynthetically related odd-carbon-numbered *n*-acids and *n*-alcohols.

(3) Odd and even homologues may have been synthesized *via* different pathways, leading to different isotope fractionations and/or from two distinct pools of precursors of distinct isotope composition. Contrary to odd-carbon-numbered-alkanes, which were demonstrated to derive from acetyl-CoA after elongation by the fatty acid synthase complex, the biosynthetic origin of even-carbon numbered *n*-alkanes is not well documented (e.g. Garrett and Grisham, 2000). Even alkanes were suggested to derive from the fatty acid synthase complex after either α -oxidation of long-chain even-numbered fatty acids (e.g. Martin and Stumpf, 1959; Khan and Kolattukudy, 1974) or elongation of odd-carbon-numbered precursors such as propionyl-CoA (e.g. Garrett and Grisham, 2000). Another minor pathway for the synthesis of fatty lipids was also detected in *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* and *Licopersicon pennellii*: the α -ketoacid elongation pathway that uses threonine or pyruvate as precursor (Kandra et al., 1990; Kroumova et al., 1994). This pathway proceeds by successive additions of one-carbon units and thus leads to the formation of equivalent amounts of odd and even homologues (Kandra et al., 1990; Kroumova et al., 1994). Since they use either a different enzymatic complex and/or different precursors than for odd alkanes, the two last mentioned hypotheses for the biosynthetic origin of even *n*-alkanes might thus have played a role in the slight ^{13}C -enrichment detected here for even-carbon-numbered-alkanes of *G. biloba*.

The isotope composition of specific *n*-alkanes extracted from fresh leaves of *G. biloba* thus appears rather variable (i.e. within a 3‰ range). As noted by previous authors, this emphasizes the need for caution when interpreting small variations in the isotope compositions of specific biomarkers from modern and ancient sediments (e.g. Collister et al., 1994; Lockheart et al., 1997). Although the origins of these variations are not yet clearly established, the isotope distribution patterns of alkanes with respect to chain length appears rather reproducible for the two batches of *G. biloba* leaves studied: alkane specific isotope composition decreases with increasing chain length and even homologues tend to exhibit slightly higher $\delta^{13}\text{C}$ values than odd homologues.

3.2. Degrading leaves of *G. biloba*

Three batches of *G. biloba* leaves were analysed to study the evolution of the isotope signal during the first steps of early diagenesis: yellow senescent leaves (December) and two degradation stages of brown litter leaves (January “litter 1” and March “litter 2”). The $\delta^{13}\text{C}$ values of bulk leaves appeared virtually constant through

the early stages of diagenesis (-27.5 , -27.9 and -27.7 ‰ for senescent, litter 1 and litter 2 samples, respectively) and almost identical to those measured for fresh leaves (-27.7 and -27.8 ‰; Table 1 and Fig. 1). Previous work on the isotope effects of diagenesis have generally reported decreasing or increasing $\delta^{13}\text{C}$ values for bulk organic matter, depending on the environment. A decrease in bulk isotope composition of degrading plant material was documented in an anaerobic environment and was attributed to selective preservation of ^{13}C -depleted lignin (Benner et al., 1987). In contrast, an inverse trend is generally detected in soils (e.g. Nadelhoffer and Fry, 1988; Melillo et al., 1989; Balesdent et al., 1993). The stability of bulk $\delta^{13}\text{C}$ values observed here for degrading leaves is probably related to the short timescale investigated.

Depending on the batch, compound isotope compositions were measured on four to six homologues ranging from C_{21} to C_{27} ; their $\delta^{13}\text{C}$ values vary between -31.9 and -28.5 ‰ (Table 1 and Fig. 1). As in fresh samples, all the *n*-alkanes examined in *G. biloba* leaves undergoing degradation are ^{13}C -depleted when compared with bulk leaves. The mean ^{13}C -depletion for senescent, litter 1 and litter 2 samples are -3.1 ‰ (C_{21} – C_{25} measured), -2.1 ‰ (C_{22} – C_{27} measured) and -1.1 ‰ (C_{23} , C_{25} – C_{27} measured), respectively. The ^{13}C -depletion in *n*-alkanes with respect to bulk leaves is similar in senescent leaves to that calculated for fresh leaves. However, there is a marked decrease in this depletion as litter formation progresses. Comparing alkanes with different ranges of carbon number may bias the interpretation of isotope composition since *n*-alkanes of fresh leaves of *G. biloba* exhibited decreasing $\delta^{13}\text{C}$ values with increasing chain length. However, the trend is also observed when only the C_{23} and C_{25} homologues are considered (i.e. the two homologues measured in all five batches of *G. biloba* leaves). Indeed, the mean ^{13}C -depletion for these two alkanes progressively decreases from July to March: 4.3‰ (fresh 1), 4.0‰ (fresh 2), 3.3‰ (senescent), 2.1‰ (litter 1) and 1.3‰ (litter 2). There is thus a rather regular ^{13}C -enrichment for specific alkanes during the first steps of early diagenesis (Fig. 1). This trend is significant since it is higher than the analytical error. Moreover, specific isotope composition of all the *n*-alkanes of a given extract tended to become homogeneous with progressive litter formation. Indeed, the decrease in $\delta^{13}\text{C}$ values with increasing chain length that was detected in fresh leaves is no longer detectable in litter leaves (Table 1 and Fig. 2). Similarly, even-numbered-alkanes no longer seem ^{13}C -enriched when compared with odd homologues.

The origins of these alterations of the isotope composition of individual *n*-alkanes extracted from degrading *G. biloba* leaves can be multiple; the two most probable explanations are discussed as follows.

(1) A contribution from microbial *n*-alkanes that can exhibit (i) long chain length and (ii) a ^{13}C -enriched

isotope signal when compared with higher plants, may induce an enrichment and a homogenisation of the isotope composition of all the *n*-alkanes in a given sample.

(2) Otherwise, an isotope fractionation associated with the degradation of the alkanes of *G. biloba* leaves could also lead to the alteration pattern detected here for the isotope composition of individual *n*-alkanes.

Abiotic degradation processes, such as evaporation and water washing, might have partially influenced alkane $\delta^{13}\text{C}$ values. However, these processes are among the less intense for hydrocarbons and are not likely to result in substantial alteration of specific alkane isotope composition (e.g. Mansuy et al., 1997). In contrast, biodegradation is one of the most active degradative processes for long-chain *n*-alkanes (e.g. Mansuy et al., 1997). As mentioned in the Introduction section, low molecular weight hydrocarbon pollutants often exhibit increasing $\delta^{13}\text{C}$ values with biodegradation (e.g. Stehmeier et al., 1999; Ahad et al., 2000). So far, no significant fractionation has been reported for the degradation of higher molecular weight hydrocarbons. However, metabolism of carbohydrates, which are high molecular weight molecules, by bacteria and fungi can lead to significant fractionation effects (e.g. Blair et al., 1985; Will et al., 1989; Gleixner et al., 1993; Henn and Chapela, 2000). These effects are detectable at the bulk level as well as at the individual molecular level (e.g. *n*-acids, chitin) and can be positive or negative depending on substrate, microbe species and microbe metabolism (Blair et al., 1985; Gleixner et al., 1993; Abraham et al., 1998; Henn and Chapela, 2000). Depending on authors, such a fractionation would take place at different stages of microbial metabolism: respiration, various branching points during catabolism and anabolism pathways, substrate transport and uptake (Will et al., 1989; Gleixner et al., 1993; Abraham et al., 1998; Henn and Chapela, 2000). Fractionation during substrate uptake is likely to lead to a substantial alteration of the isotope composition of the remaining substrate. The preservation potential of long-chain *n*-alkanes is much higher than that of carbohydrates. Nevertheless, a number of bacteria and fungi are able to efficiently degrade long-chain hydrocarbons (e.g. Singer and Finnerty, 1984; Leahy and Colwell, 1990). Moreover, the surfaces of senescent and litter leaves are more likely than those of fresh leaves to be invaded by various degrading microorganisms such as bacteria and fungi. Furthermore, a decrease in *n*-alkane absolute abundance was previously noted through litter formation from *G. biloba* leaves (Nguyen Tu et al., 2003). Therefore, preferential biodegradation of ^{13}C -depleted *n*-alkanes might have contributed to the ^{13}C -enrichment detected here for the alkanes remaining in degrading leaves.

In summary, with senescence and litter formation a general ^{13}C -enrichment was detected for individual *n*-alkanes extracted from *G. biloba* leaves. Moreover, the

specific isotope composition of all the *n*-alkanes in a given extract tended to become homogeneous as litter formation progressed, while in fresh leaves they exhibited characteristic isotope distribution patterns with respect to chain length. These findings suggest that early diagenesis has significantly affected the isotope composition of individual *n*-alkanes in *G. biloba* leaves. The origins of these diagenetic effects are not clear. Nevertheless, it would be interesting to test whether the effects detected here could be confirmed on *G. biloba* and other species in various environments. If so, homogeneous isotope compositions for all the specific *n*-alkanes of a given sample could be used as a marker of diagenetic alteration of the isotope signal. The sample set studied here is too restricted to allow immediate generalisation. Nonetheless, a diagenetic effect was detected although the precautions generally suggested to avoid problems related to the diagenetic alteration of isotope signal were applied: (1) study of a morphologically well-defined object and (2) measurements on individual biomarkers stable through geological time. Moreover, alteration patterns were detected for the isotope composition of individual *n*-alkanes although the isotope composition of bulk leaves remained constant. These results thus suggest that, in well-drained soils, diagenesis might affect the isotope composition of individual molecules, such as *n*-alkanes, more intensively and/or more rapidly than that of bulk plant material.

3.3. Fossil leaves of *E. andegavense* and *E. obtusum*

Two batches of *E. andegavense* (samples “fossil 1” and “fossil 2”) and one batch of *E. obtusum* leaves (sample “fossil 3”) were extracted for isotope measurements of individual *n*-alkanes. Previous studies have shown that the bulk isotope composition of these fossil leaves has not been significantly affected by diagenesis (Nguyen Tu et al., 1999, 2002). The two batches of *E. andegavense* studied exhibit substantially different bulk $\delta^{13}\text{C}$ values due to differences in the salinity of the soil on which the plants grew (Nguyen Tu et al., 1999). The *n*-alkanes extracted from leaves of the fossil Ginkgoales exhibited specific isotope composition ranging from -27.7 to -24.5‰ (Table 1 and Fig. 1). *n*-Alkanes extracted from the fossil leaves batches 1, 2 and 3 were ^{13}C -depleted when compared with bulk leaves, by 2.0, 2.7 and 2.3‰, respectively. Within a given extract, all the measured *n*-alkanes exhibited rather homogeneous specific $\delta^{13}\text{C}$ values (Fig. 2).

Plant carbon isotopic composition is dependent on a number of factors that were probably different for the Cenomanian *Eretmophyllum* and the present-day *Ginkgo*. Therefore, direct comparison of specific alkane isotope composition between both Ginkgoales must be considered cautiously. Keeping in mind these limitations, it is possible to propose a tentative discussion of

the individual $\delta^{13}\text{C}$ values of *Eretmophyllum* *n*-alkanes. Fossil alkanes are ^{13}C -depleted with respect to bulk leaves, in agreement with results on fresh and degrading leaves of *G. biloba*, and other published work on present day plants (e.g. Rieley et al., 1993; Collister et al., 1994; Lichtfouse et al., 1994; Huang et al., 1997; Lockheart et al., 1997, 1998). The ^{13}C depletions calculated for *Eretmophyllum* alkanes are similar to those calculated for senescent leaves and January litter of *G. biloba*. This finding, as well as the absence of any trend with respect to chain length in the isotope composition of fossil alkanes, may be due to the two hypotheses discussed below.

(1) The observed isotope patterns may reflect physiological differences between both Ginkgoales. Indeed, the isotope pattern of individual alkanes may be species-specific (e.g. Rieley et al., 1991; Collister et al., 1994; Ficken et al., 1998). Moreover, although *Ginkgo* is the closest living relative of *Eretmophyllum*, it does not belong to the same genus and therefore could exhibit different characteristics in alkane isotope composition.

(2) The observed isotope patterns may also reflect a slight diagenetic alteration for *Eretmophyllum* alkanes. Such a diagenetic effect on individual molecules, with the isotope composition of bulk fossil leaves not being significantly affected by diagenesis, is in agreement with the results found for degrading leaves of *G. biloba*. Nevertheless, the slight alteration detected here for *n*-alkane individual $\delta^{13}\text{C}$ values does not preclude a palaeoenvironmental interpretation. Indeed, specific *n*-alkane isotope composition, which varies in the same direction as bulk leaf isotope composition, which was shown to be related to local environment. These findings tend to confirm that fossilisation can lead to a less altered geochemical signal than degradation occurring in well-drained soils.

4. Conclusions

The isotope compositions of individual *n*-alkanes extracted from fresh and degrading leaves of *Ginkgo biloba* and fossil leaves of *Eretmophyllum* were investigated in a first approach to refining the estimate of potential diagenetic effects on the isotope composition of sedimentary alkanes derived from higher plants.

The *n*-alkanes extracted from fresh leaves of *G. biloba* appeared to be ^{13}C -depleted when compared with bulk leaves. They exhibited characteristic isotope patterns with respect to chain length: their individual $\delta^{13}\text{C}$ value decreased with increasing chain length and odd homologues tended to be ^{13}C -depleted when compared with even homologues. These variations occurred within a 3‰ range, emphasizing the need for caution when interpreting small variations in the isotope compositions of specific sedimentary biomarkers.

Two trends could be detected for the specific $\delta^{13}\text{C}$ value of *n*-alkanes through leaf senescence and litter

formation: (i) general ^{13}C -enrichment in all homologues and (ii) homogenisation of specific isotope composition of all the *n*-alkanes of a given extract. The origin of these trends could not be unequivocally established. Nevertheless, they might constitute indicators of the level of diagenetic alteration of the isotope signal in alkanes, provided that such trends could be confirmed for other samples within other environments. These molecular changes were detected even though the isotope composition of bulk leaves remained unchanged, which suggested that diagenesis might affect the isotope composition of individual molecules, such as *n*-alkanes, more intensively and/or more rapidly than that of bulk plant material. Moreover, diagenesis is apparently able to affect the isotope composition of individual *n*-alkanes very rapidly over a few months after leaf senescence and fall (i.e. March); alkanes extracted from litter leaves appeared ^{13}C -enriched by about 3‰ when compared with those from fresh leaves.

The *n*-alkanes extracted from the fossil Ginkgoales, *Eretmophyllum andegavense* and *Eretmophyllum obtusum*, also appeared ^{13}C -depleted when compared with bulk leaves. The isotope distribution patterns of individual *n*-alkanes of *Eretmophyllum* suggested that the isotope composition of fossil alkanes may have been slightly affected by diagenesis. It should be noted that this diagenetic alteration of the isotope signal could be detected although the precautions generally suggested to avoid problems related to diagenesis of the isotope signal were applied, i.e. (1) study of a morphologically well-defined object and (2) measurements on individual biomarkers that are thought to be stable over geological time. This slight alteration does not seem to have erased the palaeoenvironmental information recorded by individual *n*-alkanes of *Eretmophyllum*. For the fossils, the diagenetic alteration undergone by the specific isotope composition of *n*-alkanes seemed much weaker than that expected after 3 months degradation in the above-ground litter of a well-drained soil. These findings thus suggest that the isotope signal in fossils, and sedimentary organic matter in general, can be better preserved than in soil organic matter. Nevertheless, the intensity of the alteration detected in the litter shows that the specific *n*-alkane isotope composition can potentially be strongly affected by diagenesis (i.e. if the residence time of plant debris in soil, before burial, is long enough), here again calling for circumspection when interpreting the specific isotope composition of sedimentary biomarkers such as alkanes.

Acknowledgements

We thank J. Kvaček and D. Pons for providing the Czech and French samples, respectively. We are grateful to Y. Pouet, M. Grably and C. Girardin for technical assistance. Thanks are due to J. Sakala, F. Baudin, M.F. Ollivier-Pierre and R. Grasset for their assistance

in the fieldwork. We are also indebted to J. Broutin, Y. Huang, H. Bocherens and V. Malécot for helpful discussions. We also thank S. Schulte and an anonymous referee, who provided constructive reviews of the manuscript. Special thanks are due to P. Farrimond for correction of the English in this manuscript. This work was funded in part by grants from C.N.R.S. (F.R. 101) and N.E.B., which are greatly appreciated.

Associate Editor—**P. Farrimond**

References

- Abraham, W.-R., Hesse, C., Pelz, O., 1998. Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4202–4209.
- Ahad, J.M.E., Sherwood Lollar, B., Edwards, E.A., Slater, G.F., Sleep, B.E., 2000. Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Environmental Science and Technology* 32, 892–896.
- Baedecker, M.J., Cozzarelli, I.M., Eganhouse, R.P., 1993. Crude oil in a shallow sand and gravel aquifer—III. Biogeochemical reactions and mass balance modelling in anoxic groundwater. *Applied Geochemistry* 8, 569–586.
- Balesdent, J., Girardin, C., Mariotti, A., 1993. Site-related $\delta^{13}\text{C}$ of tree leaves and soil organic matter in a temperate forest. *Ecology* 74, 1713–1721.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion in ^{13}C of lignin and its applications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E., des Marais, D., 1985. Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 996–1001.
- Bocherens, H., Mariotti, A., 1999. Carbon stable isotope analysis of fossil plants. In: Jones, T.P., Rowe, N.P. (Eds.), *Fossil Plants and Spores: Modern Techniques*. The Geological Society, London, pp. 139–142.
- Collister, J.W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Organic Geochemistry* 21, 619–627.
- Czimczik, C.I., Preston, C.M., Schmidt, W.I., Werner, R.A., Schulze, E.D., 2002. Effects of charring on mass, organic carbon, and stable carbon isotope composition of wood. *Organic Geochemistry* 33, 1207–1223.
- Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P., 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 33, 507–559.
- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197, 261–263.
- Deines, P., 1980. The isotopic composition of reduced organic carbon. In: Fritz, P., Fontes, J.C. (Eds.), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 329–406.
- Derenne, S., Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., 1990. Chemical evidence of kerogen formation in source rocks and oil shales via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae. Origin of ultralaminae. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 1041–1051.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Epicuticular leaf waxes. *Science* 156, 1322–1335.
- El-Otmani, M., Coggins Jr., C.W., 1985. Fruit development and growth regulator effects on normal alkanes of “Washington” navel orange fruit epicuticular waxes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 656–663.
- Farquhar, G.D., O’Leary, M.H., Berry, J.A., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9, 121–137.
- Ficken, K.J., Barber, K.E., Eglinton, G., 1998. Lipid biomarkers, $\delta^{13}\text{C}$ and plant macrofossil stratigraphy of a Scottish montane peat bog over the last two millennia. *Organic Geochemistry* 28, 217–237.
- Fogel, M.L., Cifuentes, L.A., 1993. Isotope fractionation during primary production. In: Engel, M.H., Macko, S.A. (Eds.), *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Plenum Press, New York, pp. 73–98.
- Fogel, M.L., Tuross, N., 1999. Transformation of plant biochemicals to geological macromolecules during early diagenesis. *Oecologia* 120, 336–346.
- Francey, R.D., Gifford, R.M., Sharkey, T.D., Weir, B., 1985. Physiological influences on carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9, 121–137.
- Gannes, L.Z., Martínez del Río, C., Koch, P., 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiology and ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A, 725–737.
- Garrett, R.H., Grisham, C.M., 2000. *Biochimie*. DeBoeck, Paris.
- Girardin, C., Mariotti, M., 1991. Analyse isotopique du ^{13}C en abondance naturelle dans le carbone organique : un système automatique avec robot préparateur. *Cahiers de l’Orstom-série Pédologie XXVI*, 371–380.
- Gleixner, G., Danier, H.-J., Werner, R.A., Schmidt, H.-L., 1993. Correlation between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiology* 102, 1287–1290.
- Grice, K., Schaeffer, P., Schwark, L., Maxwell, R.R., 1996. Molecular indicators of palaeoenvironmental conditions in an immature Permian shale (Kupferschiefer, Lower Rhine Basin, north-west Germany) from free and S-bound lipids. *Organic Geochemistry* 25, 131–147.
- Grice, K., Klein Breteler, W.C.M., Schouten, S., Grossi, V., de Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S., 1998. Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography* 13, 686–693.
- Grossi, V., Raphel, D., Schouten, S., 2003. Mono-, di- and trimethylalkanes and squalane in leaf waxes of halophyte plants. 21st International Meeting on Organic Geochemistry, Book of Abstracts II, Geosfera, Krakow, pp. 329–330.
- Gülz, P.G., Müller, E., Prasad, R.B.N., 1991. Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves. *Phytochemistry* 30, 769–773.
- Harada, N., Handa, N., Fukuchi, M., Ishiwarati, R., 1995.

- Sources of hydrocarbon in marine sediments in Lützow-Holm Bay, Antarctica. *Organic Geochemistry* 23, 229–237.
- Harvey, H.R., Macko, S.A., 1997. Catalysts or contributors tracking bacterial mediation of early diagenesis in the marine water column. *Organic Geochemistry* 26, 531–544.
- Hayes, J.M., 2001. Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 43, 225–277.
- Hayes, J.M., Freeman, K.H., Popp, B.N., Hoham, C.H., 1990. Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Organic Geochemistry* 16, 1115–1128.
- Hedges, J.I., Prahl, F.G., 1993. Early diagenesis: consequences for applications of molecular biomarkers. In: Engel, H.M., Macko, S.A. (Eds.), *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Plenum Press, New York, pp. 237–253.
- Henn, M.R., Chapela, I.H., 2000. Differential C isotope discrimination by fungi during decomposition of C₃- and C₄-derived sucrose. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4180–4186.
- Henn, M.R., Gleixner, G., Chapela, I.H., 2002. Growth-dependent stable isotope fractionation by Basidiomycete fungi: $\delta^{13}\text{C}$ pattern and physiological process. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4956–4964.
- Hlušák, A., 1986. Eretmophyllous Ginkgoales from the Cenomanian. *Sbornik Národního Muzea v Praze—Rada B* 42, 99–114.
- Huang, Y., Lockheart, M.J., Collister, J.W., Eglinton, G., 1995. Molecular and isotopic biogeochemistry of the Miocene Clarkia Formation: hydrocarbons and alcohols. *Organic Geochemistry* 23, 785–801.
- Huang, Y., Lockheart, M., Logan, G.A., Eglinton, G., 1996. Isotope and molecular evidence for the diverse origins of carboxylic acids in leaf fossils and sediments from the Miocene Lake Clarkia deposit, Idaho, U.S.A.. *Organic Geochemistry* 24, 289–299.
- Huang, Y., Eglinton, G., Ineson, P., Latter, P.M., Bol, R., Harkness, D.D., 1997. Absence of carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes in a 23-year field decomposition experiment with *Calluna vulgaris*. *Organic Geochemistry* 26, 497–501.
- Huang, Y., Dupont, L., Sarnthein, M., Hayes, J.M., Eglinton, G., 2000. Mapping C₄ plant input from North West Africa into North East Atlantic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 3505–3513.
- Ishiwari, R., Uzaki, M., Yamada, K., 1994. Carbon isotope composition of individual *n*-alkanes in recent sediments. *Organic Geochemistry* 21, 801–808.
- Jones, J.G., 1969. Studies on lipids of soil micro-organisms with particular reference to tobacco leaf hydrocarbons. *Journal of General Microbiology* 59, 145–152.
- Juniper, B.E., Jeffrey, C.E., 1983. *Plant Surfaces*. Edward Arnold, London.
- Kandra, L., Severson, R., Wagner, G.J., 1990. Modified branched-chain amino acid pathways give rise to acyl acids of sucrose esters exuded from tobacco leaf trichomes. *European Journal of Biochemistry* 188, 385–391.
- Kennicutt, M.C., Brooks, J.M., 1990. Unusual normal alkane distribution in offshore New Zealand sediments. *Organic Geochemistry* 15, 193–197.
- Khan, A.A., Kolattukudy, P.E., 1974. Decarboxylation of long chain fatty acids to alkanes by cell free preparations of pea (*Pisum sativa*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 61, 1379–1386.
- Kohzu, A., Yoshioka, T., Ando, T., Takahashi, M., Koba, K., Wada, E., 1999. Natural ¹³C and ¹⁵N abundance of field-collected fungi and their ecological implications. *New Phytologist* 144, 323–330.
- Kroumova, A.B., Xie, Z., Wagner, G.J., 1994. A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd-and even-length, medium-chain fatty acids in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 11437–11441.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbon in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305–315.
- Lichtfouse, E., Derenne, S., Mariotti, A., Largeau, C., 1994. Possible algal origin of long chain odd *n*-alkanes in immature sediments as revealed by distributions and carbon isotope ratios. *Organic Geochemistry* 22, 1023–1027.
- Lichtfouse, E., Berthier, G., Houot, S., Barriuso, E., Berghaud, Vallaeys, T., 1995. Stable carbon isotope evidence for microbial origin of C₁₄–C₁₈ *n*-alkanoic acids in soils. *Organic Geochemistry* 23, 849–852.
- Lockheart, M.J., van Bergen, P.F., Evershed, R.P., 1997. Variations in the stable carbon isotope composition of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher plant-derived sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 26, 137–153.
- Lockheart, M.J., Poole, I., van Bergen, P.F., Evershed, R.P., 1998. Leaf carbon isotope compositions and stomatal characters: important considerations for paleoclimate reconstruction. *Organic Geochemistry* 29, 1003–1008.
- Louail, J., 1984. La transgression crétacée au sud du Massif Armoricaïn, Cénomaniën de l'Anjou et du Poitou, Crétacé supérieur de Vendée. *Mémoires de la société géologique et minéralogique de Bretagne* 29, 1–333.
- Macko, S.A., 1994. Compound-specific approaches using stable isotopes. In: Lajtha, K., Michener, R.H. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Sciences*. Blackwell, Oxford, pp. 241–247.
- Macko, S.A., Engel, M.H., Parker, P.L., 1993. Early diagenesis of organic matter in sediments: assessment of mechanisms and preservation by the use of isotopic molecular approaches. In: Engel, H.M., Macko, S.A. (Eds.), *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Plenum Press, New York, pp. 211–224.
- Macko, S.A., Engel, M.H., Qian, Y., 1994. Early diagenesis and organic matter preservation—a molecular stable carbon isotope perspective. *Chemical Geology* 114, 365–379.
- Mansuy, L., Philp, R.P., Allen, J., 1997. Source identification of oil spills based on the isotopic composition of individual components in weathered oil samples. *Environmental Science and Technology* 31, 3417–3425.
- Martin, R.O., Stumpf, P.K., 1959. Fat metabolism in higher plants. XII. α -Oxidation of long chain fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* 234, 2548–2554.
- Mazéas, L., Budzinski, H., Raymond, N., 2002. Absence of stable carbon isotope fractionation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic bacterial biodegradation. *Organic Geochemistry* 33, 1259–1272.
- Melillo, J.M., Aber, J.D., Linkins, A.E., Ricca, A., Fry, B., Nadelhoffer, 1989. Carbon and nitrogen dynamics along the

- decay continuum: plant litter to soil organic matter. *Plant and Soil* 115, 189–198.
- Melzer, E., Schmidt, H.-L., 1987. Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 8159–8164.
- Monson, K.D., Hayes, J.M., 1980. Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Esterichia coli*. Evidence regarding the coupling of fatty acid and phospholipid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 11435–11441.
- Monson, K.D., Hayes, J.M., 1982. Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. Ozonolysis of unsaturated fatty acids as a mean of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 139–149.
- Nadelhoffer, K.J., Fry, B., 1988. Controls on natural nitrogen-15 and carbon-13 abundances in forest soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1633–1640.
- Naraoka, H., Ishiwarati, R., 2000. Molecular and isotopic abundances of long chain *n*-fatty acids in open marine sediments of the western North Pacific. *Chemical Geology* 165, 23–36.
- Nguyen Tu, T.T., Bocherens, H., Mariotti, A., Derenne, S., Largeau, C., Pons, D., Broutin, J., 1999. Ecological distribution of Cenomanian terrestrial plants based on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 145, 79–93.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., 2001. Evolution of the chemical composition of *Ginkgo biloba* internal and external leaf lipids. *Organic Geochemistry* 32, 45–55.
- Nguyen Tu, T.T., Kvaček, J., Uličný, D., Bocherens, H., Mariotti, A., Broutin, J., 2002. Isotope reconstruction of plant palaeoecology. Case study of Cenomanian floras from Bohemia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 183, 43–70.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., 2003. Comparison of leaf lipids from a fossil ginkgoalean plant and its extant counterpart at two degradation stages: diagenetic and chemotaxonomic implications. *Review of Paleobotany and Palynology* 124, 63–78.
- Nishimura, M., Baker, E.W., 1986. Possible origin of *n*-alkanes with a remarkable even-to-odd predominance in recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 299–305.
- O'Leary, M.H., 1976. Carbon isotope effect on the enzymatic decarboxylation of pyruvic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 73, 614–618.
- O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20, 553–567.
- Parish, J.T., Ziegler, A.M., Scotese, C.R., 1982. Rainfall patterns and the distribution of coal and evaporates in Mesozoic and Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 40, 67–101.
- Philip, J., et al. (35 co-authors), 2000. Late Cenomanian palaeoenvironments (94.7–93.5 Ma). In: Dercourt, J., Gaetani, M., et al. (Eds.), *Atlas Peri-Tethys Palaeogeographical Maps. CCGM/CGMW*, Paris : map 14.
- Pons, D., Lauvergeat, J., Broutin, J., 1980. Paléoclimatologie comparée de deux gisements du Crétacé supérieur d'Europe occidentale. *Mémoires de la Société géologique de France Nouvelle Série* 139, 151–158.
- Popp, B.N., Parekh, P., Tilbrook, B., Bidigare, R.R., Laws, E.A., 1997. Organic carbon $\delta^{13}\text{C}$ variations in sedimentary rocks as chemostratigraphic and paleoenvironmental tools. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 132, 119–132.
- Rieley, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G., Eakin, P.A., Fallick, A.E., 1991. Sources of sedimentary lipids deduced from stable carbon-isotope analyses of individual compounds. *Nature* 352, 425–427.
- Rieley, G., Collister, J.W., Stern, B., Eglinton, G., 1993. Gas chromatography / isotope ratio mass spectrometry of leaf *n*-alkanes from plants of differing carbon dioxide metabolisms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 7, 488–491.
- Schleser, G.H., Frielingsdorf, J., Blair, A., 1999. Carbon isotope behaviour in wood and cellulose during artificial aging. *Chemical Geology* 158, 121–130.
- Schouten, S., van Kamm-Peters, H.M.E., Rijpstra, W.I.C., Schoell, M., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Effects of an oceanic anoxic event on the stable carbon isotopic composition of early Toarcian carbon. *American Journal of Science* 300, 1–22.
- Schouten, S., Hatgers, W.A., López, J.F., Grimalt, J.O., Sinninghe Damsté, J.S., 2001. A molecular isotopic study of ^{13}C -enriched organic matter in evaporitic deposits: recognition of CO_2 -limited ecosystems. *Organic Geochemistry* 32, 277–286.
- Singer, M.E., Finnerty, W.R., 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 1–59.
- Stahl, W.J., 1980. Compositional changes and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionations during the degradation of hydrocarbons by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1903–1907.
- Stehmeier, L.G., Francis, M.McD., Jack, T.R., Diegor, E., Winsor, L., Abrajano Jr., T.A., 1999. Field and in vitro evidence for in-situ bioremediation using compound-specific $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio monitoring. *Organic Geochemistry* 30, 821–833.
- Uličný, D., Kvaček, J., Svobodová, M., Špičáková, L., 1997. High-frequency sea-level fluctuations and plant habitats in Cenomanian fluvial to estuarine succession: Pecéňov quarry, Bohemia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 136, 165–197.
- van Bergen, P.F., Poole, I., 2002. Stable carbon isotopes of woods: a clue to palaeoclimate? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 182, 31–45.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Organic Geochemistry* 29, 1163–1179.
- Welch, J.W., Burlingame, A.L., 1973. Very long-chain fatty acids in yeast. *Journal of Bacteriology* 115, 464–466.
- Will III, O.H., Tieszen, L.L., Gerlach, T., Kellen, M., 1989. Alteration of carbon isotope ratios by eight *Ustilago* species on defined media. *Botanical Gazette* 150, 152–157.
- Zimmerman, J.K., Ehleringer, J.R., 1990. Carbon isotope ratios are correlated with irradiance levels in the Panamanian orchid *Catasehlm viridiflavum*. *Oecologia* 83, 247–249.
- Zyakun, A.M., 1996. Stable carbon isotope discrimination by heterotrophic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 32, 153–159.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2013, 27, 1961–1968
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.6650

Variability of ^{13}C -labeling in plant leaves[†]

Thanh Thuy Nguyen Tu^{1*}, Philippe Biron², Kadmiel Maseyk², Patricia Richard², Bernd Zeller³, Katell Quénéa¹, Marie Alexis¹, Gérard Bardoux⁴, Véronique Vaury¹, Cyril Girardin⁴, Valérie Pouteau⁴, Daniel Billiou⁴ and Thierry Bariac²

¹UMR 7618 BioEMCo GOME, Université Pierre et Marie Curie, CC120, 4 Place Jussieu, 75 252, Paris cedex 05, France

²UMR 7618 BioEMCo TRANSFER, Centre INRA de Versailles-Grignon, Bât. EGER, 78850, Thiverval-Grignon, France

³UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, Centre INRA de Nancy, 54280, Champenoux, France

⁴UMR 7618 BioEMCo MOS, Centre INRA de Versailles-Grignon, Bât. EGER, 78850, Thiverval-Grignon, France

RATIONALE: Plant tissues artificially labeled with ^{13}C are increasingly used in environmental studies to unravel biogeochemical and ecophysiological processes. However, the variability of ^{13}C -content in labeled tissues has never been carefully investigated. Hence, this study aimed at documenting the variability of ^{13}C -content in artificially labeled leaves. **METHODS:** European beech and Italian ryegrass were subjected to long-term ^{13}C -labeling in a controlled-environment growth chamber. The ^{13}C -content of the leaves obtained after several months labeling was determined by isotope ratio mass spectrometry.

RESULTS: The ^{13}C -content of the labeled leaves exhibited inter- and intra-leaf variability much higher than those naturally occurring in unlabeled plants, which do not exceed a few per mil. This variability was correlated with labeling intensity: the isotope composition of leaves varied in ranges of *ca* 60‰ and 90‰ for experiments that led to average leaf ^{13}C -content of *ca* +15‰ and +450‰, respectively.

CONCLUSIONS: The reported variability of isotope composition in ^{13}C -enriched leaves is critical, and should be taken into account in subsequent experimental investigations of environmental processes using ^{13}C -labeled plant tissues. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Plant tissues artificially labeled with ^{13}C are increasingly used in environmental studies. *In situ* or laboratory incubations of ^{13}C -labeled material constitute a powerful approach to the monitoring of key processes in biogeochemical cycles, such as organic matter mineralization and sequestration in soils.^[1–3] $^{13}\text{CO}_2$ pulse-labeling is also commonly used in plant ecophysiology to study carbon allocation dynamics and its further transfer to rhizosphere microorganisms.^[4–7] However, as rates of carbon incorporation can differ widely among plant compartments, incorporation of ^{13}C may also vary, and thus further induce significant isotope variability of the obtained tissues. While qualitative monitoring of labeled carbon does not require precise knowledge of the isotope variability of the labeled tissues, this is not the case for quantitative purposes. Therefore, establishing unbiased conclusions from experimental data derived from labeled tissues requires taking precisely into account the variability of isotope labeling. In spite of the increasing use of carbon

isotope labeling in plants, to our knowledge, no study so far has carefully investigated the variability of the obtained isotope signal within labeled organic matter. The aim of the present study is thus to document the isotope variability of plant material after ^{13}C -labeling.

This study is focused on leaves since they are among the most frequently labeled plant organs. This paper combines results from two different labeling experiments, in order to investigate experimental conditions that differed in terms of:

- plant type: tree (*Fagus sylvatica* L.) vs grass (*Lolium multiflorum* Lam.),
- growth substrate: purely mineral substrate (vermiculite) vs natural soil, and
- intensity of ^{13}C -labeling: low (+35‰) vs medium (+500‰).

The plants were labeled in long-term experiments in a growth chamber representative of the most commonly used experimental greenhouses: a chamber with regulation of the injection of gases but without down-regulation of gas concentration. Isotope ratio mass spectrometry allowed determination of the ^{13}C -content of (1) CO_2 inside the chamber, which was monitored throughout the labeling experiment and (2) bulk leaf tissues. The latter were investigated to document intra-leaf, inter-leaf and inter-plant variability of ^{13}C -labeling. Rather than an extensive survey, this restricted sample set represents a first appraisal of the isotope variability to be expected for ^{13}C -labeled leaves.

* Correspondence to: T. T. Nguyen Tu, UMR 7618 BioEMCo GOME, Université Pierre et Marie Curie, CC120, 4 Place Jussieu, 75 252 Paris cedex 05, France.
E-mail: ttnguyen@snv.jussieu.fr

[†] Presented at the Joint European Stable Isotope Users Group Meeting (JESIUM) 2012 held in Leipzig, Germany, on September 2–7, 2012.

EXPERIMENTAL

Growth chamber

The two experiments were conducted in a 'RUBIC I' chamber (Reactor Used for Continental Isotopic Biogeochemistry^[8,9]). It is a 0.5 m³ entirely closed volume suitable for isotope studies. Light was provided by four daylight bulbs (4 × 400 W, HQI-BT metallic halogens), typically on a 12 h day/night regime. The air was regulated at a temperature of ca 21°C by its circulation above a heat exchanger. The air humidity was controlled by setting the dew point temperature using a chiller (Thermo-Neslab Merlin 150, 5045 W; Thermo Scientific, Illkirch, France). Beyond the set point (68% relative humidity), water vapor was condensed and collected. The air temperature and relative humidity were measured using three capacitive probes (Vaisala HMP45; Vaisala Oyj, Helsinki, Finland: 3% accuracy for relative humidity and 0.2°C for temperature) at three different heights above the soil surface (15, 30 and 45 cm). Rows of fans were placed in the ridges of the chamber to enhance the mixing of the air above the canopy. Nevertheless, some vertical variability was noted for the climatic parameters measured (Fig. 1).

In order to avoid contamination by outside air, the chamber was slightly over-pressured (30 to 50 Pa) with dry air that was provided by filtration above cold traps immersed in a bath of ethanol at -80°C delivered by coolers (Thermo Scientific CC100, Cryocools). For the second experiment on ryegrass, a molecular sieve (Domnick Hunter Das 1; Domnick Hunter, Gateshead, UK) was added which removed water vapor and CO₂ (-40°C dew point). The atmospheric overpressure was measured using a model CP300 pressure sensor (Kimo, Périgeux, France). The CO₂ concentration was measured using a Li-Cor 620 infrared analyzer (Lincoln, NE, USA) and maintained at 390 ppm using a regulation loop. Pure CO₂ was injected to compensate for plant photosynthesis and gas dilution. Labeling was performed by mixing enriched ¹³C₂O₂ with normal industrial CO₂. A system consisting of two mass flow controllers (EL-Flow F201 and F200C; Bronkhorst, Ruurlo, The Netherlands) allowed us to generate the desired mixing ratio between normal industrial CO₂ of known isotope signature ($\delta^{13}\text{C} = -31.3\text{‰}$) coming from a cylinder and a flowbus linked flow of ¹³C-labeled CO₂

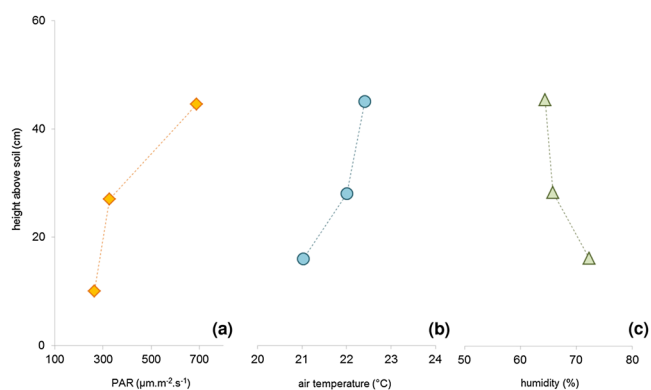


Figure 1. Vertical variability of climatic parameters within the chamber: (a) light intensity; (b) air temperature; and (c) relative humidity.

(cylinder; Eurisotop, Saint-Aubin, France: ¹³C abundance 10.69 ± 0.01%). Labeling started immediately after sealing the chamber for the experiment, without prior chamber flush. Daily samples of CO₂ were taken using cold traps immersed in liquid nitrogen to check its isotope signature at steady state and further adjust the ¹³CO₂ injection parameters. These daily samples were taken in the late morning (i.e. 11.00 hours), where the chamber air appeared to be at steady state. For each experiment, once climatic conditions inside the chamber were stabilized, the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ value was monitored throughout the day, to document the isotope variability of the carbon source used for photosynthesis.

During the second experiment, the flow rates of injected CO₂, CO₂-free flush air and chamber CO₂ concentration were measured at 10-min intervals. From these measurements we estimated the net CO₂ exchange due to the plants and soil in the chamber, fC_{net} :

$$fC_{\text{net}} = fC_{\text{out}} - fC_{\text{in}} + \Delta C$$

where fC_{out} and fC_{in} are the fluxes of CO₂ into and out of the chamber, respectively, and ΔC is the change in CO₂ concentration in the chamber over the 10-min time period. Using the nighttime fC_{net} as a measure of respiration, R_{tot} , the gross photosynthetic uptake during the daytime, A_g , was calculated as $A_g = fC_{\text{net}} + R_{\text{tot}}$, where fC_{net} and A_g are positive, and R_{tot} is negative.

Plant labeling

European beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds ($\delta^{13}\text{C}_{\text{seeds}} = -27.2\text{‰}$) were sown in pots containing vermiculite (195 seeds per m²). Young seedlings were transferred into the chamber after cotyledon development and before leaves started to grow. The chamber was then immediately sealed and control of climatic conditions started. The target isotope composition of atmospheric CO₂ inside the chamber was +35‰. The plants were fed three times a week with a Hoagland nutrient solution (pH 6). The date of emergence was carefully noted for each leaf. At the end of the labeling period (5 months), the chamber was opened, leaves immediately cut and referenced according to emergence date and plant number.

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) was seeded directly in the labeling chamber. Seeds ($\delta^{13}\text{C}_{\text{seeds}} = -27.5\text{‰}$) were sown (32.9 g.m⁻²) in pots containing sieved (<2 mm) soil obtained from the A horizon of a sandy loam soil (85% sand, 11% silt, 4% clay) with organic carbon and total nitrogen contents of 11.4 g.kg⁻¹ and 0.9 g.kg⁻¹, respectively. Immediately after sowing, the chamber was sealed and control of climatic conditions started. The target isotope composition of atmospheric CO₂ inside the chamber was +500‰. The plants were watered three times a week. At the end of the labeling period (10 weeks), the chamber was opened and leaves immediately cut. For some representative individuals, late (i.e. young) leaves growing in the center of the tuft were separated from peripheral early (i.e. old) leaves.

Sample preparation and analyses

A few unlabeled leaves were also studied to investigate the natural variability of isotope composition. Beech leaves and ryegrass leaves were collected at the end of summer in the surroundings of Etampes (60 km south of Paris, France).

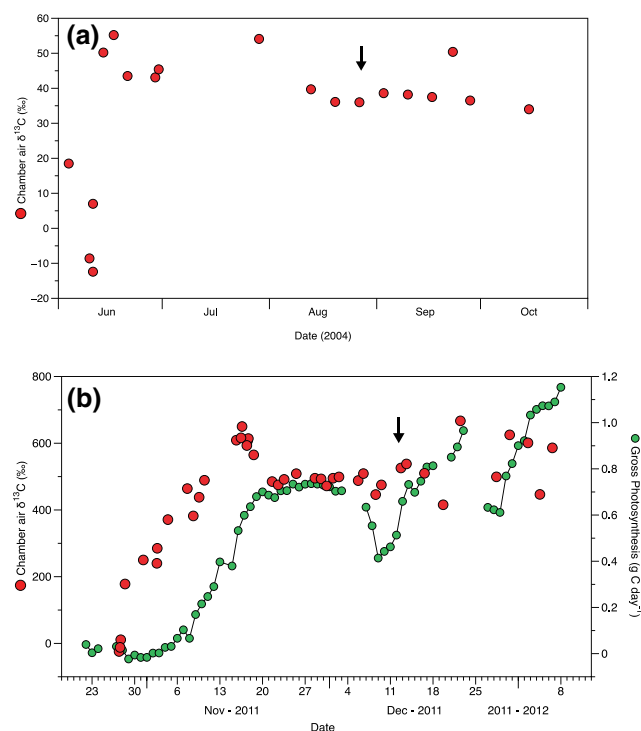


Figure 2. Isotope composition of atmospheric CO_2 inside the chamber throughout the labeling period (red circles): (a) beech experiment; (b) ryegrass experiment; arrows indicate the date of the kinetic study illustrated in Fig. 3. Also shown in (b) is the estimated gross photosynthetic uptake of CO_2 by the ryegrass (green circles).

The plant material was oven dried to constant weight at 45°C (~ 2 days) and stored in the dark in aluminum foil until analysis. To document isotope variability within and among plants, a fragment of each leaf was sampled at the apex for analyses. To further investigate isotope variability within leaves, a few leaves were cut in pieces of *ca* 0.5 cm^2 that were mapped on an image of the leaf before being analyzed.

The stable carbon isotope ratios of leaf samples were measured using an automated unit that combines an elemental analyzer with an isotope ratio mass spectrometer. The samples were combusted in a CHN elemental analyzer (Carlo-Erba, Milan, Italy) connected to a VG-SIRA 10 isotope ratio mass spectrometer (VG, Manchester, UK). After flash combustion with copper oxide at 1000°C , CO_2 was cryogenically distilled, purified and introduced on-line into

the mass spectrometer to determine carbon isotope ratios.^[10] The CO_2 sampled from the chamber atmosphere was purified cryogenically in a vacuum line after the dry air stream had passed through two liquid nitrogen traps, and was analyzed by isotope ratio mass spectrometry. The carbon isotope abundances were expressed in per mil (‰) with respect to the Vienna PDB standard: $\delta^{13}\text{C} = [({}^{13}\text{R}_{\text{sample}}/{}^{13}\text{R}_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$.^[11] The $\delta^{13}\text{C}$ values were measured with a precision of 0.1‰ (1σ).

RESULTS

Atmospheric CO_2 pattern inside the chamber

The isotope composition of atmospheric CO_2 inside the chamber ($\delta^{13}\text{CO}_2$ value) was monitored throughout the labeling period (Fig. 2). Although the two experiments were different in terms of isotope composition ($\sim +35\text{‰}$ *vs* $+500\text{‰}$) and plant development stage for labeling start (cotyledon *vs* seed), the isotope composition of the CO_2 inside the chamber exhibited similar patterns for the beech and the ryegrass experiments. The target isotope value was only reached 2 to 3 weeks after the start of labeling (Fig. 2). The influence of growth and photosynthesis on achieving stable isotope composition is evident in Fig. 2(b), where it can be seen that stability was achieved once the total photosynthetic CO_2 uptake had also reached an initial steady state. After these few weeks to reach stabilization, the isotope composition remained roughly constant, varying by *ca* 13.5% around the target value (Table 1); these variations were mainly related to maintenance operations on the chamber.

Once conditions in the chamber had stabilized (i.e. after more than 3 weeks; arrows on Fig. 2) the kinetics of the chamber CO_2 isotope composition was more intensively studied during a photoperiod (Fig. 3). Due to a slightly different experimental set-up, the CO_2 levels varied differently in the two experiments, particularly during the night. In the beech experiment, the pCO_2 regularly increased by more than 600 ppm during the night to reach 1000 ppm at the end of the night. This increase was probably due to the accumulation of CO_2 respired during the night. After the lamps were turned on, 2 h were then necessary to return to the target CO_2 level (Fig. 3(a)). In the ryegrass experiment, the pCO_2 showed no significant variation over 24 h, except for a slight 20 ppm increase after the lamps were turned off; this was flushed out within a few hours (Fig. 3(b)). The

Table 1. Isotope variability of atmospheric CO_2 inside the chamber and leaves ($\delta^{13}\text{C}$ values in ‰)

Experiment	CO_2				leaves			
	mean	range ^a	daily range ^b	stabilized σ^c	n	mean	range ^a	σ^d
Beech	+33.8	67.6	11.5	7.0	154	+15.8	65.9	15.0
Ryegrass	+515.2	614.0	269.3	55.8	31	+450.1	92.9	25.4

^a $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{min}}$, throughout the complete duration of the labeling experiment.

^b $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{min}}$, throughout a day.

^cStandard deviation after 2.5 weeks.

^dStandard deviation for all the studied leaves.

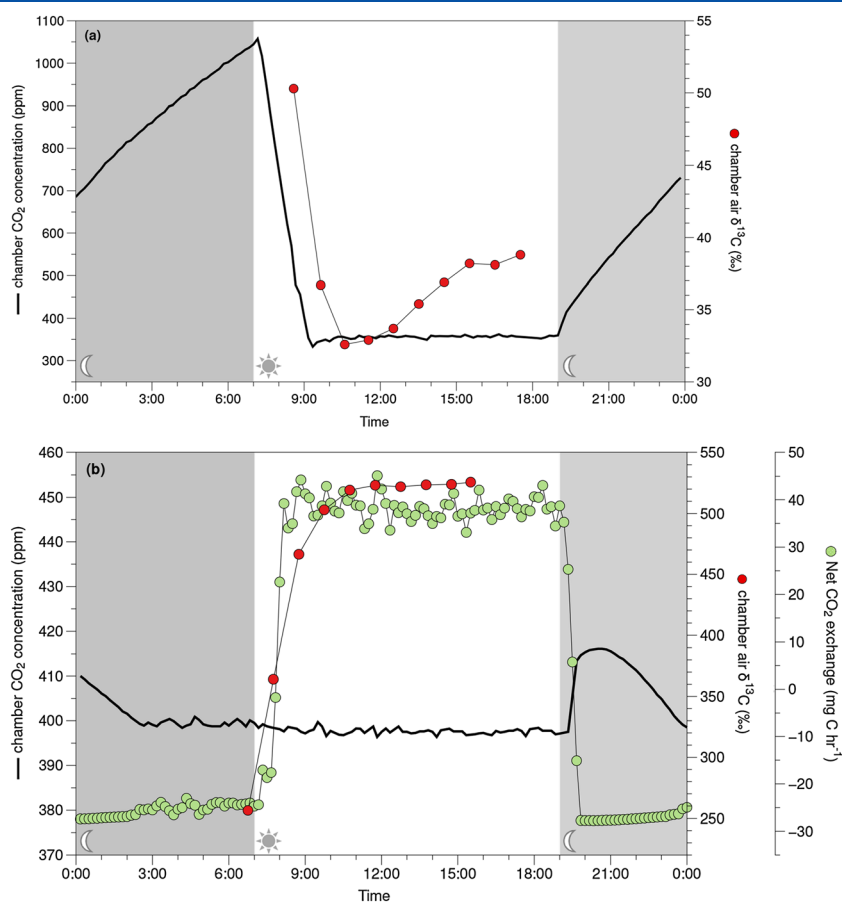


Figure 3. Detailed kinetics of CO₂ level (solid line) and isotope composition of atmospheric CO₂ inside the chamber throughout a day (red circles): (a) beech experiment and (b) ryegrass experiment. Also shown in (b) is the net CO₂ exchange of the chamber (green circles).

absence of CO₂ accumulation during the night was related to the presence of a molecular sieve in the filtration device for the air injected in the chamber (see Experimental section). This molecular sieve removed water vapor and CO₂ so that the night-respired CO₂ (1) was diluted by the CO₂-free air constantly injected in the chamber to maintain the overpressure and (2) thus could not accumulate as in the beech experiment. The slight CO₂ increase after the lamps were turned off might be due to light enhanced dark respiration.^[12,13]

The daily kinetics of the chamber atmospheric CO₂ isotope pattern was also somewhat different between the two experiments (Fig. 3). While the morning CO₂ was ¹³C-enriched (by ~18‰) with respect to the daytime value in the beech experiment, the morning CO₂ was ¹³C-depleted (by ~250‰) with respect to the daytime value in the ryegrass experiment. For both experiments, the isotope composition of atmospheric CO₂ inside the chamber then returned to the desired value about 2 h after the lamps were turned on (Fig. 3). From the estimates of net CO₂ exchange in the ryegrass experiment, it can be seen that net CO₂ uptake was achieved after about 30 min, and stable photosynthesis for about 1 h, after the lights were turned on. There was a subsequent gradual ¹³C-enrichment in the afternoon of about 6‰ and 22‰ in the beech and ryegrass experiments, respectively.

Leaf isotope composition

The average stable carbon isotope composition of the leaves obtained after labeling was $+15.8 \pm 15.0\text{‰}$ and $+450.1 \pm 25.4\text{‰}$ for beech and ryegrass, respectively (Table 1). For both experiments, ¹³C-labeling appeared roughly inversely correlated to leaf age: late leaves were more ¹³C-enriched than early leaves (Fig. 4). The beech leaves that emerged during the 2 weeks following the beginning of the labeling period exhibited highly variable $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -30‰ to $+15\text{‰}$, while the leaves that emerged after 10 June had quite consistent $\delta^{13}\text{C}$ values of around $+28\text{‰}$ (Fig. 4(a)). Although precise dating of leaf emergence was not possible for ryegrass, similar patterns were noted for this experiment: late leaves being ¹³C-enriched by *ca* 60‰ with respect to early leaves (Fig. 4(b)).

Labeled plants also exhibited a significant variability of isotope signal within a given leaf (Figs. 5 and 6). Beech leaves exhibited intra-leaf variability up to 7‰ (i.e. $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{min}}$); this range was slightly higher (6.9‰) for the early leaf that was less labeled (i.e. $\delta^{13}\text{C}_{\text{leaf}} = -18.2\text{‰}$, Fig. 5(b)) than for the late leaf (5.8‰) that was more labeled (i.e. $\delta^{13}\text{C}_{\text{leaf}} = +22.0\text{‰}$, Fig. 5(a)). This isotope range was significantly higher than that measured on the natural leaf (2.4‰, Fig. 5(c)). In the natural leaf, veins were ¹³C-enriched with respect to intercostal tissues. This was especially significant for the main vein that exhibited ¹³C-enrichments varying from

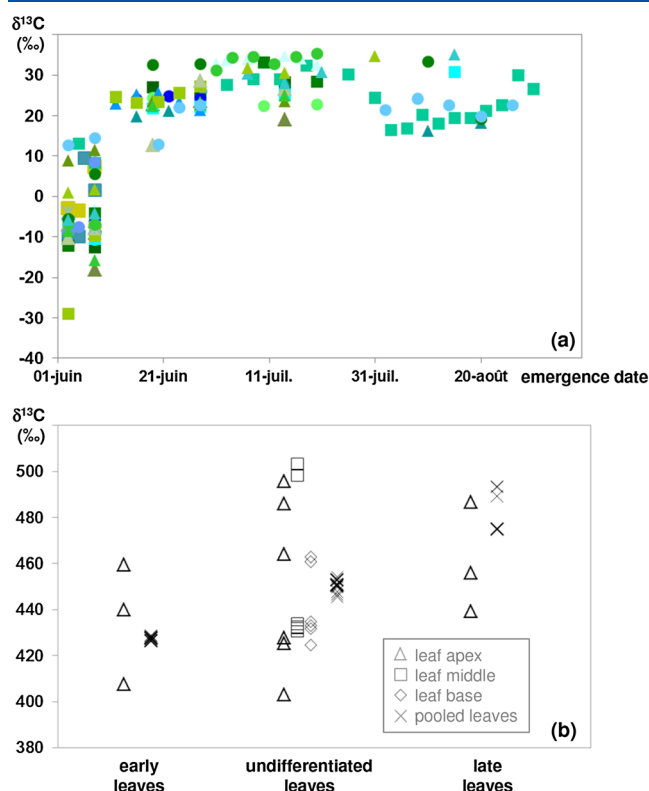


Figure 4. Isotope composition of leaves according to age: (a) beech experiment (each symbol corresponds to a given plant) and (b) ryegrass experiment.

0.4‰ to 3.8 ‰, from the apex of the leaf to its base (Fig. 5(c)). In the labeled leaves, while the veins were ^{13}C -enriched with respect to the intercostal tissues in the late leaf (Fig. 5(a)), the inverse situation was observed for the early leaf (Fig. 5(b)). The isotope composition of intercostal tissues seemed to vary randomly in labeled leaves (Figs. 5(a) and 5(b)). Ryegrass leaves also exhibited a much higher intra-leaf variability of the isotope signal in labeled leaves (i.e. up to 42.4‰) than in the natural leaf (i.e. 1.8‰; Fig. 6). The isotope composition of the natural leaf tended to become progressively ^{13}C -depleted from the base to the apex. In the labeled ryegrass leaves, the base can be either ^{13}C -depleted or ^{13}C -enriched with respect to the apex. Moreover, in some of the labeled leaves, the highest $\delta^{13}\text{C}$ values can be found in the middle of the lamina (Fig. 6(f)).

Crushing leaves to homogenous powder and pooling several leaves together led to $\delta^{13}\text{C}$ values averaging the isotope composition of the studied leaf (Fig. 5) and of the studied batch of leaves (Fig. 4(b)), respectively.

DISCUSSION

Variability of CO_2 isotope composition

The 2.5 weeks required to stabilize the CO_2 isotope composition at the desired value (Fig. 2) was probably due to the combination of three main factors: (1) low CO_2 uptake of emerging plants due to the absence or limitation of photosynthetic surfaces; (2) relatively high contribution of respiration from unlabeled substrate originating from soil, seeds or cotyledons,^[14] and (3)

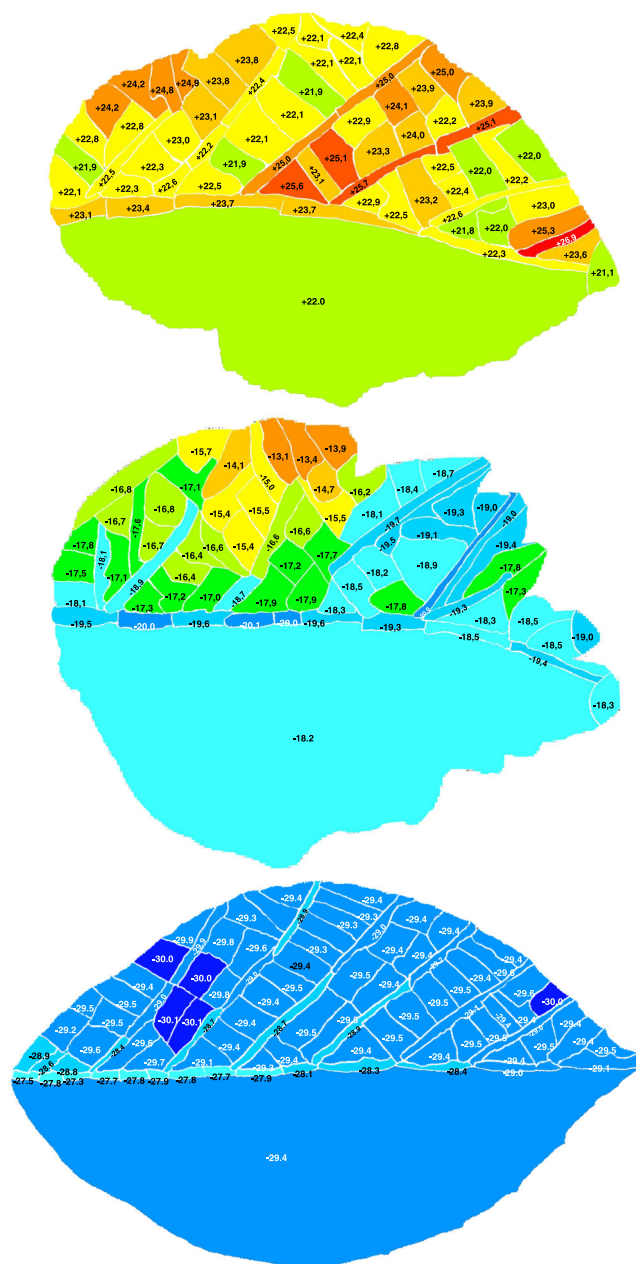


Figure 5. Isotope variability within beech leaves ($\delta^{13}\text{C}$ values in ‰): (a) labeled late leaf; (b) labeled early leaf; (c) natural leaf. Values noted on the bottom half-leaf were obtained after grinding and homogenizing.

the CO_2 regulation device of the chamber that can only inject CO_2 (i.e. no down-regulation possible). There was a strong relationship between the establishment of steady-state photosynthesis in the chamber and the stable atmospheric ^{13}C composition, which was evident at both the daily scale and over the growth period of the experiment. The discrimination increased with photosynthetic CO_2 uptake, leading to the progressively enriched atmosphere until stable photosynthetic rates were reached.

CO_2 respired by natural plants and ecosystems can exhibit diel variations up to 11.5‰, exceptionally 14.8‰.^[15] These variations were mainly attributed to temporal variations in post-photosynthetic fractionation related to changes in

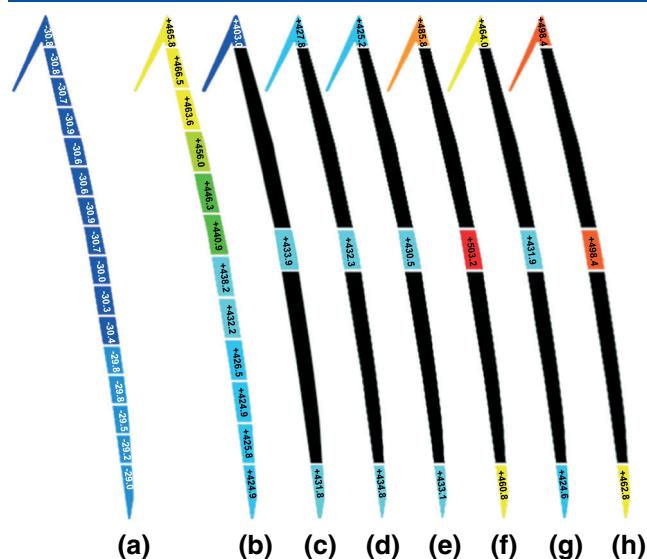


Figure 6. Isotope variability within ryegrass leaves ($\delta^{13}\text{C}$ values in ‰): (a) natural leaf; (b–h) labeled leaves.

carbon allocation to different metabolic pathways. The daily variations reported here, in CO_2 isotope composition inside the labeling chamber, are significantly higher: $\sim 18\%$ and $\sim 250\%$ for the beech and ryegrass experiments, respectively. Moreover, these variation ranges are probably slightly underestimated since no CO_2 sampling was done during the night. While these variation ranges in the $\delta^{13}\text{CO}_2$ values are higher than those currently reported for natural plants, there are some explanations for the trends observed.

The higher diel $\delta^{13}\text{CO}_2$ values observed for the $\delta^{13}\text{CO}_2$ values might be due to respiration processes. The sharp difference in $\delta^{13}\text{CO}_2$ values between early morning and the rest of the day could be explained by the night accumulation of respired CO_2 of isotope composition different from that of the labeled CO_2 injected in the chamber during daytime. This is in agreement with the $p\text{CO}_2$ patterns measured in the beech experiment (Fig. 3(a)). For that experiment, plants were grown on purely mineral soil (i.e. vermiculite) so that the respired CO_2 probably mainly originated from plant respiration. In natural plants, the CO_2 respired by leaves generally exhibits decreasing $\delta^{13}\text{C}$ values during the night while stems and trunks can exhibit increasing $\delta^{13}\text{C}$ values.^[15–18] The high $\delta^{13}\text{CO}_2$ values measured in the early morning for the beech experiment might thus be due to night accumulation of ^{13}C -enriched CO_2 respired by stems. This would imply that night respiration by stems was higher and/or more fractionated than that by leaves.

The diel $\delta^{13}\text{CO}_2$ pattern for the ryegrass experiment differs as the ryegrass was grown on natural soil and therefore soil, in addition to plant, respiration contributed to the night-time CO_2 emissions. However, as ryegrass is a herbaceous plant, the night-time plant respiration was comprised of ^{13}C -depleted leaf respiration but no stem-derived ^{13}C -enriched CO_2 . Furthermore, in contrast to the beech experiment, the input air was scrubbed of CO_2 and therefore the CO_2 in the chamber at night was only from respiration within the chamber. Since the substrate soil was not labeled, this probably led to the production of CO_2 that was not labeled, that is to say ^{13}C -depleted with respect to the labeled CO_2

injected in the chamber during daytime. Even if the plant-derived respiration is enriched relative to its substrate, the substrate is still depleted relative to the atmosphere due to discrimination during photosynthesis. The daily pattern of the ryegrass is consistent therefore with increasing atmospheric enrichment due to photosynthetic discrimination from a more depleted respiratory-derived background until steady state is reached.

We do not have the necessary information on component fluxes or end-member isotope composition to accurately characterize these diel variations in chamber air ^{13}C -composition, but these variations are large and may need to be considered in ^{13}C -labeling experiments. However, it is important to note that the majority of the CO_2 assimilated during the day was during the steady-state ^{13}C conditions of the atmosphere, when the chamber regulation and the plant activity were balanced. The slight ^{13}C -enrichment in the afternoon might be a consequence of decreasing photosynthetic rates and a proportionally greater contribution of enriched $^{13}\text{CO}_2$ respired by natural leaves.^[15,16]

Variability of leaf isotope composition

The ranges and standard deviations of $\delta^{13}\text{C}$ values measured for labeled leaves were higher than 60‰ and 15‰, respectively (Table 1). These values are much higher than those usually measured in natural leaves, which do not exceed a few per mil.^[19–22] For both experiments reported here, the ^{13}C -enrichment of late leaves compared with that of early leaves (Fig. 4) can be explained by a lower $\delta^{13}\text{C}$ value of the carbon source used by plants at the beginning of the labeling period. Two carbon sources with low ^{13}C -content can be considered: (1) the atmospheric CO_2 inside the chamber, whose ^{13}C -content reached the desired value 2 weeks after the beginning of the labeling period (Fig. 2), and (2) the seeds that were unlabeled. The dependence of leaf isotope composition on the isotope composition of resources accumulated before leaf development (e.g. from seeds or stem reserves) is well known.^[4,22–24] However, the reported isotope shifts associated with source transition from reserve carbon to newly assimilated carbon did not exceed 6‰. Since the early leaves obtained here can be ^{13}C -enriched by up to 60‰ compared with late leaves, it is likely that the low $\delta^{13}\text{CO}_2$ values at the beginning of the experiments played a major role in the observed pattern, in addition to the contribution of unlabeled carbon from seeds. The $\delta^{13}\text{CO}_2$ patterns (Fig. 2(a)) also explained the higher isotope variability among early leaves than in the late leaves in the beech experiment (Fig. 4(a)). The vertical variability of climatic parameters, which was measured in the labeling chamber (Fig. 1), might also have played a role, although limited, in the ^{13}C -variability of leaves. Indeed, light intensity, air temperature and relative humidity are known to influence plant $\delta^{13}\text{C}$ values.^[25,26]

The isotope variability measured here within natural leaves is in agreement with previous reports.^[27,28] The ^{13}C -enrichment of beech veins with respect to intercostal tissues fits the ^{13}C -enrichment of non-photosynthetic tissues in comparison with autotrophic tissues, generally observed.^[29] The much higher variability of isotope signal observed within all the labeled leaves investigated, and the non-systematic ^{13}C -enrichment of veins compared with intercostal tissues in beech leaves, are probably related to the variability of

$\delta^{13}\text{C}$ values within the chamber. Since this high intra-leaf variability affects late leaves as well as early leaves, it is might be related to the diel variation of $\delta^{13}\text{C}$ values. Nevertheless, the slightly higher variability of isotope signal within the early beech leaf is also probably related to the wide range of $\delta^{13}\text{C}$ values under which it developed. Indeed, the investigated leaf emerged before the stabilization of the chamber atmosphere. The random distribution of isotope signal within the investigated leaf laminae might be related to stomatal patchiness. Stomatal patchiness corresponds to the heterogeneous distribution of stomatal aperture within a leaf.^[30,31] Since the stable carbon isotope composition of plants is dependent on stomatal aperture,^[25] the observed isotope pattern is probably the result of stomatal patchiness in the studied leaves. Although the occurrence of stomatal patchiness has not been formally recognized in beech and ryegrass leaves, it has been reported in related species.^[30,32] The absence of patchy isotope pattern in the natural leaves, while it is clearly visible for labeled leaves, might (1) be related to different microenvironmental conditions for both leaf types and/or (2) indicate that ^{13}C -labeling enhances physiological variability.

IMPLICATIONS

This detailed investigation of isotope pattern of the leaves obtained after long-term continuous ^{13}C -labeling experiments revealed isotope variability, among and within leaves, much higher than that usually reported for natural leaves: more than 50‰ vs less than 10‰ for natural leaves. This variability appeared correlated with the intensity of the desired labeling since the range of $\delta^{13}\text{C}$ variation reached ca 60‰ for the plants averaging at ca +15‰, and ca 90‰ for the plants averaging at ca +450‰. Changing plant type and growth substrate does not avoid such an important variability since the reported experiments were achieved on a grass species (ryegrass) and a tree species (beech) growing on purely mineral substrate or on natural soil. Even the enhanced control of CO_2 level in one of the experiments (i.e. addition of a molecular sieve in the air-filtration system of the ryegrass experiment) did not prevent important leaf isotope variability. A significant part of the isotope variability measured on the labeled leaves was attributed to the short-term (i.e. diel) and long-term variability of the isotope composition of CO_2 within the labeling chamber. Therefore, precise ^{13}C regulation within the labeling chamber would probably reduce the isotope variability of the obtained tissues. At least purging the atmosphere, with inert gas or CO_2 -free air, after sealing the chamber and before the start of labeling, might limit the variability related to the delay necessary to reach stabilization of $\delta^{13}\text{C}$ values. However, such a purge would not avoid the leaf isotope variability due to diel variations of $\delta^{13}\text{C}$ values, or to unlabeled respiration from seeds, cotyledons or soil, which were relatively high at the beginning of the experiments. Anyway, the isotope pattern reported here might be generalized to other labeling devices since a high variability of isotope labeling was also recently mentioned by Wiesenberger^[33] for *Juncus effusus* and *Lolium perenne* submitted to ^{14}C -pulse labeling. Further investigations are necessary to confirm the trend revealed in this study. Nevertheless, it appears already

crucial to take into account such an important variability of isotope signal when interpreting data derived from labeled tissues. This is especially critical when dealing with small variations in small samples. Nevertheless, working on pooled and grounded samples seems to limit the isotope variability of labeled tissues.

Acknowledgements

This work was funded by grants from Fond National pour la Science (ACI JC 10051 – notification 035214) and Institut National des Sciences de l'Univers, which are greatly appreciated. We thank Katia Grira, Céline Lett and Nicolas Péchot for technical support. André Mariotti, Rolf Siegwolf and Brian Fry are thanked for their encouragement and stimulating discussions. Thanks are also due to the two anonymous referees who provided constructive reviews of the manuscript.

REFERENCES

- [1] D. A. Angers, S. Recous, C. Aita. Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -labelled wheat straw in situ. *Eur. J. Soil Sci.* **1997**, *48*, 295.
- [2] J. Moore-Kucera, R. P. Dick. Application of ^{13}C -labeled litter and root materials for *in situ* decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2485.
- [3] T. T. Nguyen Tu, C. Egasse, B. Zeller, G. Bardoux, P. Biron, J.-F. Ponge, B. David, S. Derenne. Early degradation of plant alkanes in soil: A litterbag experiment using ^{13}C -labelled leaves. *Soil Biol. Biochem.* **2011**, *43*, 2222.
- [4] A. M. Treonis, N. J. Ostle, A. W. Stott, R. Primrose, S. J. Grayston, P. Ineson. Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biol. Biochem.* **2004**, *36*, 533.
- [5] J. R. Leake, N. J. Ostle, J. I. Rangel-Castro, D. Johnson. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field $^{13}\text{CO}_2$ pulse-labelling in an upland grassland. *Appl. Soil Ecol.* **2006**, *33*, 152.
- [6] Z.-M. Ge, X. Zhou, S. Kellomäki, C. Biasi, K. Y. Wang, H. Peltola, P. J. Martikainen. Carbon assimilation and allocation (^{13}C labeling) in a boreal perennial grass (*Phalaris arundinacea*) subjected to elevated temperature and CO_2 through a growing season. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 150.
- [7] D. Epron, M. Bahn, D. Derrien, F. A. Lattanzi, J. Pumpanen, A. Gessler, P. Högberg, P. Maillard, M. Dannoura, D. Gérard, N. Buchmann. Pulse-labelling trees to study carbon allocation dynamics: a review of methods, current knowledge and future prospects. *Tree Physiol.* **2012**, *32*, 776.
- [8] C. Girardin, D. P. Rasse, P. Biron, J. Ghashghaie, C. Chenu. A method for ^{13}C -labeling of metabolic carbohydrates within French bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) for decomposition studies in soils. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1792.
- [9] Y. Rothfuss, P. Biron, I. Braud, L. Canale, J.-L. Durand, J.-P. Baudet, P. Richard, M. Vauclin, T. Bariac. Partitioning evapotranspiration fluxes into soil evaporation and plant transpiration using water stable isotopes under controlled conditions. *Hydrol. Processes* **2010**, 3177.
- [10] C. Girardin, A. Mariotti. Analyse isotopique du ^{13}C en abondance naturelle dans le carbone organique : un système automatique avec robot préparateur. *Cah. Orstom Pédol.* **1991**, *26*, 371.

- [11] H. Craig. The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1953**, 3, 53.
- [12] J. Azcón-Bieto, C. B. Osmond. Relationship between photosynthesis and respiration. The effect of carbohydrate status on the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiol.* **1983**, 71, 574.
- [13] C. Werner, F. Wegener, S. Unger, S. Nogués, P. Priault. Short-term dynamics of isotopic composition of leaf respired CO₂ upon darkening: measurements and implications. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2009**, 23, 2428.
- [14] P. Maillard, E. Deléens, F. A. Daudet, A. Lacoïnte, J. S. Frossard. Carbon and nitrogen partitioning in walnut seedlings during the acquisition of autotrophy through simultaneous ¹³C and ¹⁵N long-term labeling. *J. Exp. Bot.* **1994**, 45, 203.
- [15] C. Werner, A. Gessler. Diel variations in the carbon isotope composition of respired CO₂ and associated carbon sources: a review of dynamics and mechanisms. *Biogeosciences* **2011**, 8, 2437.
- [16] G. J. Hymus, K. Maseyk, R. Valentini, D. Yakir. Large daily variations in ¹³C-enrichment of leaf-respired CO₂ in two *Quercus* forest canopies. *New Phytol.* **2005**, 167, 377.
- [17] N. Kodama, R. L. Barnard, Y. Salomon, C. Weston, J. P. Ferrio, J. Holst, R. A. Werner, M. Saurer, H. Rennenberg, N. Buchmann, A. Gessler. Temporal dynamics of the carbon isotope composition in a *Pinus sylvestris* stand: from newly assimilated organic carbon to respired carbon dioxide. *Oecologia* **2008**, 156, 737.
- [18] A. Gessler, G. Tcherkez, O. Karyanto, C. Keitel, J. P. Ferrio, J. Ghashghaie, J. Kreuzwieser, G. Farquhar. On the metabolic origin of the carbon isotope composition of CO₂ evolved from darkened light-acclimated leaves in *Ricinus communis*. *New Phytol.* **2009**, 181, 374.
- [19] H. A. Mooney, S. H. Mooney, J. R. Ehleringer. Carbon isotope ratios of plants of a tropical dry forest in Mexico. *Funct. Ecol.* **1989**, 3, 137.
- [20] L. A. Martinelli, S. Almeida, I. F. Brown, M. Z. Moreira, R. I. Victoria, L. S. I. Sternberg, C. A. C. Ferreira, W. W. Thomas. Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in a tropical forest in Rondônia, Brazil. *Oecologia* **1998**, 114, 170.
- [21] T. H. E. Heaton. Spatial, species and temporal variations in the ¹³C/¹²C ratios of C₃ plants: Implications for palaeodiet studies. *J. Archaeol. Sci.* **1999**, 26, 637.
- [22] S.-G. Li, M. Tsujimura, A. Sugimoto, G. Davaa, D. Oyunbaatar, M. Sugita. Temporal variation of δ¹³C of larch leaves from a montane boreal forest in Mongolia. *Trees* **2007**, 21, 497.
- [23] A. Morvan-Bertrand, N. Pavis, J. Boucaud, M. P. Prud'homme. Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labeling and carbohydrate analysis. *Plant Cell Environ.* **1999**, 22, 1097.
- [24] C. Damesin, C. Lelarge. Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant Cell Environ.* **2003**, 26, 207.
- [25] G. D. Farquhar, M. H. O'Leary, J. A. Berry. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **1982**, 9, 121.
- [26] T. E. Dawson, S. Mambelli, A. H. Plamboeck, P. H. Templer, K. P. Tu. Stable isotopes in plant ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2002**, 33, 507.
- [27] R. de Visser, H. Vianden, H. Schnyder. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by ¹³C and ¹⁵N steady state-labelling. *Plant Cell Environ.* **1997**, 20, 37.
- [28] G. H. Schleser. Investigations of the δ¹³C pattern in leaves of *Fagus sylvatica* L. *J. Exp. Bot.* **1999**, 41, 565.
- [29] L. A. Cernusak, G. Therkez, C. Keitel, W. K. Cornwell, L. S. Santiago, A. Knohl, M. M. Barbour, D. G. Williams, P. B. Reich, D. S. Ellsworth, T. E. Dawson, H. G. Griffiths, G. D. Farquhar, I. J. Wright. Why are non-photosynthetic tissues generally ¹³C enriched compared with leaves in C₃ plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Funct. Plant Biol.* **2009**, 36, 199.
- [30] J. Pospíšilová, J. Šantrůček. Stomatal patchiness. *Biol. Plantarum.* **1994**, 36, 481.
- [31] W. Beyschlag, J. Eckstein. Stomatal patchiness. *Prog. Bot.* **1997**, 59, 283.
- [32] M. Lippert, K. Steiner, H.-D. Payer, S. Simons, C. Langebartels, H. Sandermann Jr. Assessing the impact of ozone on photosynthesis of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in environmental chambers. *Trees* **1996**, 10, 268.
- [33] G. Wiesenberg, B. Majumder, M. Gocke, J. Dungait, L. Dixon, R. Bol. The effect of soil moisture on biosynthesis of lipids in plants and their incorporation and preservation in soils. *25th Int. Meet. Org. Geochem.* **2011**. Abstract book, p. 632.

Appendix. Color code for Figs. 5 and 6 (δ¹³C values in ‰).

Natural leaves	Labeled beech leaves		Labeled ryegrass leaves
	old	young	
		+27	+510
		+26	+500
	-13	+25	+490
	-14	+24	+480
	-15	+23	+470
	-16	+22	+460
	-17	+21	+450
-27	-18		+440
-28	-19		+430
-29	-20		+420
-30	-21		+410



Contents lists available at ScienceDirect

Soil Biology & Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/soilbio

Early degradation of plant alkanes in soils: A litterbag experiment using ^{13}C -labelled leaves

Thanh Thuy Nguyen Tu^{a,*}, Céline Egasse^a, Bernd Zeller^b, Gérard Bardoux^c, Philippe Biron^c, Jean-François Ponge^e, Brigitte David^a, Sylvie Derenne^d

^aUMR 7207 MNHN-CNRS-UPMC CR2P, MNHN, Case courrier 48, 57 rue Cuvier, 75 231 Paris cedex 05, France

^bUR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, Centre INRA de Nancy, 54 280 Champenoux, France

^cUMR 7618 BioEMCo, Centre INRA de Versailles-Grignon, Bât EGER, 78 850 Thiverval-Grignon, France

^dUMR 7618 BioEMCo, UPMC, Case courrier 120, 4 place Jussieu, 75 252 Paris Cedex 05, France

^eUMR 7179 MNHN-CNRS, MNHN, 4 avenue du Petit-Château, 91 800 Brunoy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2011

Received in revised form

29 April 2011

Accepted 15 July 2011

Available online 27 July 2011

Keywords:

Leaf litter decomposition

Stable carbon isotopes

Lipids

Soil organic matter

n-Alkanes

ABSTRACT

We monitored the carbon isotope composition of bulk leaves and specific long-chain alkanes during a four-year litterbag experiment using ^{13}C -labelled leaves and unlabelled reference leaves of the European beech tree (*Fagus sylvatica* L.). Whereas the isotope composition of alkanes from ^{13}C -enriched leaves exhibited a marked decrease in ^{13}C -content, the isotope composition of unlabelled reference leaves remained nearly constant. We interpreted this difference as evidence for a microbial contribution to the long-chain alkane pool of the decomposing leaves and related it to the progressive invasion of leaves by soil organisms which was revealed upon microscopic examination. These results suggest that long-chain alkanes may not provide an unaltered record of organic carbon isotope composition in soils and sediments.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The carbon isotope composition of organic matter in soils and sediments has proven useful in documenting past environments, carbon dynamics and the sources of organic matter. However, the isotope composition of bulk organic matter may be altered during decomposition and/or by diagenesis. Indeed, the isotope composition of bulk organic matter corresponds to the weighted mean comprised by the isotope composition of each of its individual constituents. Therefore, the isotope composition of bulk organic matter can be disproportionately altered if the constituents lost by degradation have an isotope composition which differs substantially from that of the preserved constituents (Deines, 1980; Balesdent et al., 1993). Consequently, the isotope analysis of specific compounds having high preservation potential may minimize degradation biases and is becoming increasingly favoured (Wiesenberg et al., 2004; Yamamoto et al., 2010). Among such biomarkers, long-chain fatty lipids such as *n*-alkanes and *n*-acids

are the most commonly investigated molecules for specific compound isotope analyses. Indeed, these typical plant components exhibit a rather high preservation potential and are relatively easy to analyse. However, these long-chain lipids may not be completely resistant to degradation and their relative distribution may be modified in the early phases of organic matter degradation (Cranwell, 1981; Buggle et al., 2010). Previous investigations on the effects of degradation on the isotope composition of these specific lipids led to contrasting results: either the ^{13}C -content of these compounds was unaffected over time or it exhibited a trend towards ^{13}C -enrichment of specific molecules (Stahl, 1980; Huang et al., 1997; Mansuy et al., 1997; Mazéas et al., 2002; Nguyen Tu et al., 2004; Chikaraishi and Naraoka, 2006). The observed ^{13}C -enrichment of fatty lipids was suggested to have two possible causes: (i) an isotope discrimination effect had occurred during degradation and/or (ii) the fatty lipids were contaminated by long-chain lipids derived from microbes. In the absence of categorical evidence, neither of these two alternatives could be favoured or excluded by the previous authors (Nguyen Tu et al., 2004; Chikaraishi and Naraoka, 2006). Nevertheless, the disparity in the reported ^{13}C -content trends is likely to be related to differences in the environments investigated: i.e. oxic vs. anoxic, well-drained vs.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 140798064; fax: +33 (0) 140793739.
E-mail address: ttnguyen@snv.jussieu.fr (T. T. Nguyen Tu).

stagnant water, soil organic matter vs. oil spills, etc. Such a disparity calls for complementary studies in other environments, to better constrain the potential for bias in the isotope record of (paleo) environments.

The present study aimed to determine the precise effects of early degradation on the isotope composition of specific alkanes. A major challenge to investigating the degradation of organic matter is the multiplicity and diversity of its sources. Indeed, it can be difficult to distinguish the actual effects of decomposition from those related to variations in the relative contributions of its sources. An alternative approach is to study materials that are precisely identified, such as the plant leaves that provide the main source of long-chain alkanes in soils and sediments (Eglinton and Hamilton, 1967). Litterbag experiments constitute a prime technique to monitor the fate of leaves through litter decomposition. Indeed, this method allows plant debris to be sampled at specific ages, even at high levels of decomposition (Bocock and Gilbert, 1957; Smith and Bradford, 2003). The present study was thus based on a decay experiment in which beech leaves were enclosed in litterbags. European beech (*Fagus sylvatica* L.) was chosen as a source because it is a common inhabitant of temperate forests.

Monitoring the fate of ^{13}C -labelled molecules has proven useful to unravel biogeochemical processes in ecological studies (Crossman et al., 2005; Bahri et al., 2008). Therefore, our experiment was carried out using ^{13}C -labelled leaves in order to trace the original plant alkanes and to test for possible contamination by microbial alkanes. Stable isotope labelling of plants generally led to ^{13}C -enrichment in the order of several hundred-fold per mil (Angers et al., 1997; Zeller et al., 2000; Bahri et al., 2008). However, it may be technically difficult to measure small isotope effects when dealing with such intense labelling. Limited labelling (i.e. lower than 50‰) provides the opportunity to detect even minor microbial contribution. We thus used slightly ^{13}C -enriched beech leaves to monitor the effects of decomposition during a four-year experiment in natural forest soil. To our knowledge, this study represents the first time ^{13}C -labelled leaves have been used to investigate, in the field, the effects of degradation on the isotope composition of specific lipids. Our data provide a better understanding of the sources of potential bias related to degradation effects, and hence will allow specific compound isotope analysis in (paleo) environmental studies to be used with greater accuracy and significance.

2. Materials and methods

2.1. ^{13}C -labelling of beech leaves

Beech seeds were germinated at the end of May 2004. Young seedlings were transferred at the cotyledon stage to a controlled chamber at the beginning of June 2004. In order to minimize isotope effects linked to soil respiration, plants were grown on vermiculite and fed three times per week with a previously described nutritional solution (Coïc and Lesaint, 1983). The $p\text{CO}_2$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ were maintained at 380 ppmv and +40‰, respectively. Climate conditions in the chamber were held constant during the five months of labelling: 70% relative humidity and 20 °C day temperature. Four Osram HQI/D Daylight lamps (400 W/D) provided a light intensity of approximately $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ of photosynthetically active radiation during a 15 h period per day (i.e. 7 h–20 h). The chamber is described in detail elsewhere (Girardin et al., 2009). Three weeks before the end of the experiment, the conditions were modified in order to induce leaf senescence. The temperature was reduced to 18 °C, the daylight range was reduced to 8 h (9 h–17 h) and nutritional solution was provided only once per week. The leaves thus obtained exhibited a mean $\delta^{13}\text{C}$ value of +25.0‰ and ranged between +16.3‰ and +35.3‰.

2.2. Degradation experiment

2.2.1. Experimental site

The degradation experiment was established in the “Breuil-Chenué” experimental forest site located in Burgundy, France (47°18'10"N, 4°4'44"E). This forest is part of the “Parc Naturel Régional du Morvan”, a protected area where urban pollution is minimal. The field is situated on a shelf at 650 m above sea level and exhibits a slight northwest-facing slope. Mean annual temperature and precipitation at the site are 9 °C and 1280 mm, respectively. The bedrock is the alkaline granite of “La Pierre qui Vire” covered by a thin layer of eolian silt. Soils are classified as dystric cambisol (WRB, 2006) with a thick moder on top (~10 cm). They are acidic soils with pH values of 4–4.5 and have a poorly saturated cation exchange complex. More information on the experimental site is available elsewhere (Moukoui et al., 2006; Andrianarisoa et al., 2010). The incubation took place in a stand planted with 30 year-old European beech trees (*F. sylvatica* L.). Unlabelled senescent leaves were also incubated as reference material. They were harvested in October 2004, in the stand where the incubation took place. The leaves were collected at the same height (~1.5 m) from the branches of several different trees in order to obtain mean composition and to minimize biases linked to intrapopulation variability.

2.2.2. Selection of senescent leaves

After harvesting, leaves were rinsed with distilled water to remove extraneous particles and dried at 45 °C until they attained a constant weight. Leaves were then examined under a dissecting microscope to monitor morphological changes. One milligram was removed from each leaf for elemental and isotope analyses (see Section 2.3.1) to determine the main biochemical characteristics of the leaves at the initial stage of degradation. Each batch was composed of 10–15 leaves and corresponded to approximately one gram of organic matter. Batches were assembled using leaves from as many different trees/plants as possible to obtain equivalent batches. ^{13}C -enriched leaves were selected to constitute batches having isotope variabilities similar to those of natural leaves (i.e. a standard deviation $\leq 0.8\%$). The mean isotope composition of the batches of labelled leaves varied within a rather large range (i.e. +16.3‰ to +36.8‰) that precluded direct comparison between batches. Moreover, labelled and unlabelled leaves were grown in different conditions and exhibited slightly different biochemical characteristics. Therefore, to avoid biases linked to differences between the ^{13}C -enriched leaf batches and the wild leaf batches at the initial stage, the following discussion will be based primarily on the comparison of degradation trends (i.e. $\Delta^{13}\text{C}_{\text{degradation}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{degraded}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}}$).

2.2.3. Litterbag incubation

Preliminary investigations showed that in contrast to aluminium nets, the nylon and polypropylene nets generally used for litterbags may release substantial amounts of contaminants that could be potentially extracted with the leaf lipids. Accordingly, the litterbags (9.5 × 14.5 cm) were made of aluminium wire. The mesh size was 1.4 × 1.8 mm and was small enough to contain small leaf litter debris yet large enough to permit aerobic microbial activity and free entry of small soil animals. Indeed, soil fauna at the experimental site was dominated in biomass by enchytraeids, and contained to a lesser extent, mites and springtails, as it is generally the case in moders (Swift et al., 1979; Ponge et al., 1997). Before being enclosed in litterbags, the leaves were weighed and then re-moistened with distilled water to recreate the natural moisture conditions of leaf fall in autumn. The litterbags were placed in the field at the end of autumn 2004, on the surface of the existing forest litter layer, akin to

leaves falling naturally in autumn. Samples were retrieved from the field at 5, 10, 15, 20, 30, 40, 52, 79, 129 and 207 weeks (four years). At each sampling date, two bags of natural leaves and two bags of labelled leaves were taken.

2.3. Analyses

The recovered material was first rinsed with distilled water to remove obvious extraneous particles such as mosses, roots or arthropods. Leaves were then scanned, dried to constant weight at 45 °C, weighed and examined under a dissecting microscope. Samples were stored dark in aluminium foil at 5 °C until analysis. All the leaves of each litterbag were then combined and ground fine enough to pass through a 500 µm mesh. An aliquot of the so-obtained powder (~1 mg) was taken for bulk elemental and isotope characterization (see Section 2.3.1) and the rest was submitted to the extraction procedure.

2.3.1. Isotope and elemental analyses of bulk leaves

Stable isotope ratios were measured using an automated unit that combines an elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer. The samples were combusted in a Carlo-Erba CHN elemental analyser connected to a VG-SIRA 10, isotope ratio mass spectrometer. After flash combustion with copper oxide at 1000 °C, CO₂ was cryogenically distilled, purified and introduced on-line into the mass spectrometer to determine carbon isotope ratios (Girardin and Mariotti, 1991). The δ¹³C values were measured with a precision of 0.1‰ (1σ).

2.3.2. Lipid extraction and alkane fractionation

Leaf powder was ultrasonically extracted for 20 min with 30 ml dichloromethane/methanol (2/1; v/v). The mixture was centrifuged (10 min at 4000 rpm) and the extracted lipids were recovered in the supernatant. The extraction procedure was repeated six times with the centrifugation residue (pellet). The combined extracts were concentrated by rotary evaporation and then dried under nitrogen gas. The extract yield was determined by weighing the dried

combined extracts. The total extract was then fractionated on an alumina column (1 g alumina per 10 mg dry extract, Sigma–Aldrich 507C ~150 mesh) deactivated to Brockmann grade IV by adding 0.1% by weight of distilled water. Alkanes were recovered in the apolar fraction after elution with heptane (4 ml for 1 g of alumina). A known amount of an internal standard (i.e. tetratriacontane) was introduced in the fraction for quantification purposes.

2.3.3. Alkane-specific isotope analyses

Alkanes were identified by gas chromatography using an Agilent 6890N gas chromatograph (GC) equipped with a split/splitless injector and fitted with a fused silica capillary column, coated with VF5-MS (50 m × 0.32 mm i.d., 0.12 µm film thickness). For GC the temperature was increased from 80 °C to 100 °C at 10 °C/min, then increased to 325 °C at 4 °C/min, then held at 325 °C for 30 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow of 2 ml/min. The splitless injector and flame ionization detector temperatures were held at 350 °C. Compound-specific δ¹³C values of the dominant alkanes were determined with a Micromass IsoChrom III coupling, comprised by an IsoChrom isotope ratio mass spectrometer coupled to a GC via a Micromass combustion interface (CuO combustion furnace at 850 °C and cryogenic trap at –100 °C). δ¹³C values were measured with a precision (1σ) of 0.5‰. Each sample was run in triplicate. To enable comparison between leaves that exhibited a rather large range of isotope variability, the isotope compositions of specific alkanes were expressed relative to the bulk isotope composition of undegraded leaves according to: $\Gamma^{13}\text{C}_{\text{alkane}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{alkane}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{undegraded leaves}}$.

3. Results and discussion

3.1. Bulk degradation patterns

Microscopic examination of the leaves revealed traces of epiphytic microflora beginning at the initial/senescent stage. Indeed, fungal fructifications (Fig. 1a) and mycelia (Fig. 1b) were detected on several leaves. During the experiment, the leaves

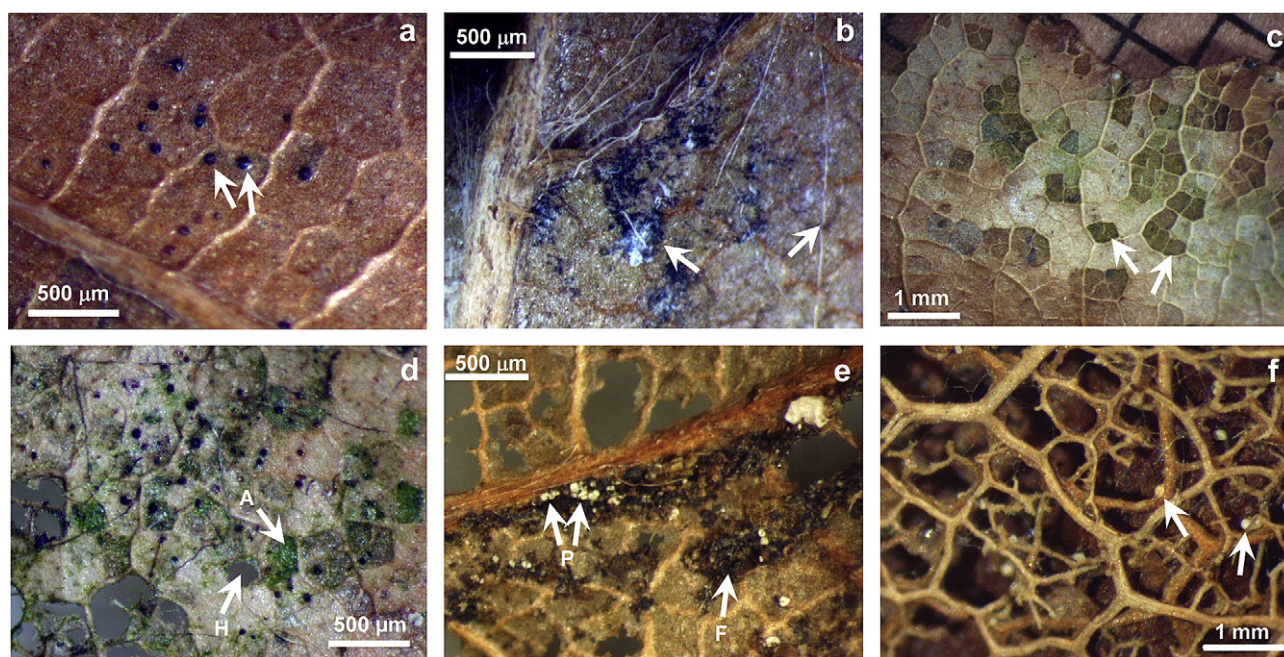


Fig. 1. Typical beech leaf decomposition patterns observed under dissecting microscope. Epiphytic fungi on senescent leaves: fructifications (a.) and mycelia (b.). Marks of grazing by soil fauna after 1.5 years of decomposition (c.). Decomposition patterns after 2.5 years of decay: skeletonization of leaves (d. arrow H and f.), increasing invasion by fungi (d.) and algae (d. arrow A), faecal material (e. arrow F) and conifer pollen grains (e. arrows P and f. arrows).

exhibited progressive degradation patterns. The first evidence of grazing by soil fauna, in which the lower cuticle was missing between the tertiary/quaternary veins, was detected after five weeks of decomposition in the field. The lower cuticle of leaves degrades more easily than the upper cuticle and the veins are much thicker and decay more slowly. These grazing patterns are typical of litter-consuming fauna, notably the enchytraeids that are very abundant in moders (Ponge, 1999). These grazing marks became frequently observed after 10 weeks of decomposition (Fig. 1c). After one year, the upper cuticle of leaves showed evidence of grazing, leading to complete holes between veins (Fig. 1d and e) and to a progressive skeletonization of the leaves (Fig. 1f). After decomposing for four years, the only original material remaining consisted of bundles of skeletonized leaf fragments (Fig. 1f). Exogenous material also accumulated on the leaves during the experiment. Fungi progressively invaded the leaf surfaces (Fig. 1d); on leaves exposed to light, micro-algae colonized the gaps left by grazing fauna (Fig. 1d); faecal material was deposited by soil fauna (Fig. 1e); and conifer pollen grains probably originating from adjacent stands were also deposited (Fig. 1e and f). Labelled and unlabelled leaves exhibited similar degradation patterns upon microscopic examination.

After four years of decomposition in the field, the litter leaves had lost 50–90% of their initial dry weight (Fig. 2a). A rather large weight loss was observed during the first several days followed by slower decomposition rates afterwards. This decomposition trend is in agreement with other studies that reported the decomposition patterns of beech litters under similar conditions (Cortez, 1998; Ono et al., 2009). ^{13}C -labelled leaves appeared to degrade slightly more quickly than natural leaves during the first three years (Fig. 2a). Nevertheless, both leaf types eventually lost equivalent weights after four years (Fig. 2a). The difference in initial decomposition rates of the natural and the labelled leaves probably reflected differences in initial leaf quality. Among other factors, the C/N ratio was lower in labelled leaves than in natural leaves at the initial stage (with means of 19.6 and 26.9 for labelled and unlabelled leaves, respectively). This lower C/N ratio probably contributed significantly to the difference in decomposition rate, and has been suggested previously (Melin, 1930; Witkamp, 1966; Taylor et al., 1989). Litter quality differences may be attributed to growing conditions that were probably more favourable in the labelling chamber than in the field. To avoid potential bias linked to this difference in litter quality, we based our discussion on degradation trends calculated relative to the initial/undegraded stage of each batch, rather than on direct comparisons between the two crude datasets. Regardless of the dataset, no specific trends were evident with respect to the carbon content or the C/N ratio, both of which remained relatively constant during the experiment (~ 450 mg/g and ~ 20 , respectively; data not shown). These values agree with those previously reported for beech leaves and litter found at the experimental site (Zeller et al., 2007).

Lipids of senescent leaves (i.e. at the initial stage of degradation) accounted for ~ 11 wt.% and ~ 16 wt.% of the dry material for unlabelled and ^{13}C -labelled leaves, respectively. Here again, the higher lipid content of the labelled leaves compared to that of the natural leaves was probably due to differences in growing conditions. Nevertheless, both leaf types exhibited similar degradation patterns for lipids (Fig. 2b). Lipid content decreased sharply during the first month of the experiment, reaching ~ 6 wt.% of dry material. Leaf lipid content then progressively decreased to become >1 wt.% after four years of degradation (Fig. 2b). Final lipid loss was greater than 99 wt.% of the initial lipid content, which was much higher than the bulk weight loss (i.e. ~ 80 wt.% of initial leaves). Accordingly, lipids were degraded to a greater extent than were the non-lipidic constituents of the leaves. The chemical composition of

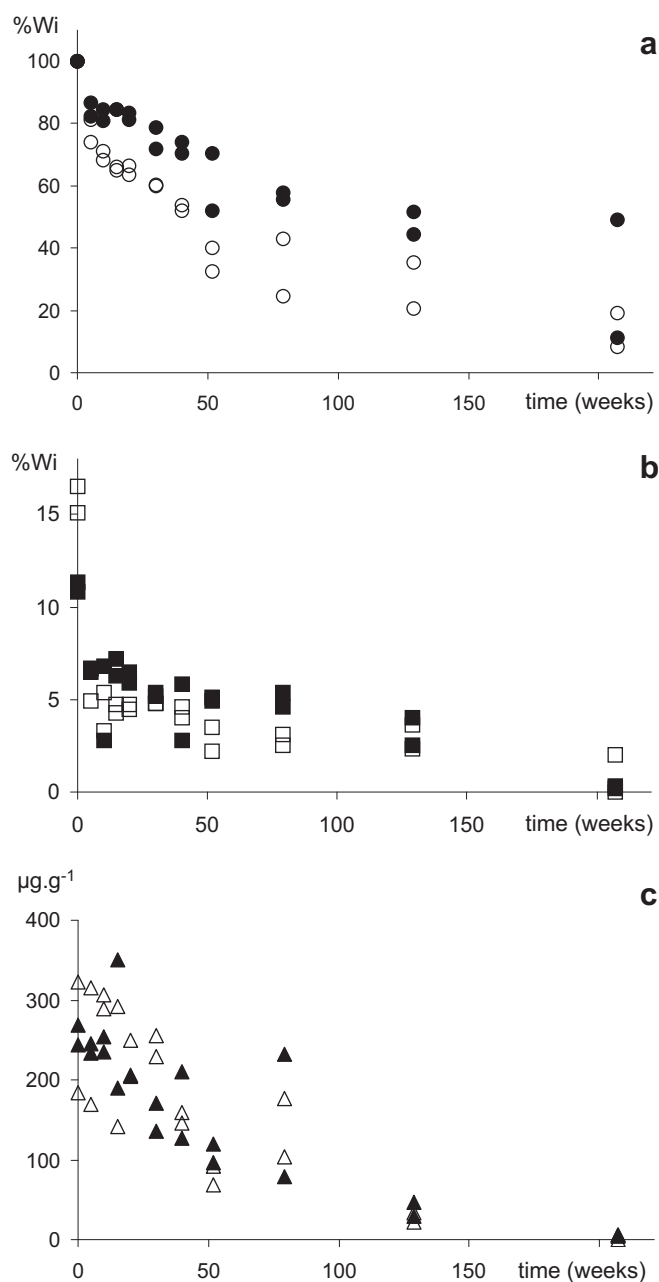


Fig. 2. Changes in geochemical parameters measured for bulk beech leaves. Solid symbols: unlabelled leaves, open symbols: ^{13}C -labelled leaves. a. Bulk weight (percentage of initial weight). b. Lipid content (percentage of initial leaf weight). c. Heptacosane content (with respect to initial leaf weight).

lipids from senescent beech leaves has been reported previously (Nguyen Tu et al., 2007): most *n*-alkanes consisted of between 16 and 29 carbon atoms and were markedly dominated by the C_{27} homologue. The initial alkane content present in senescent leaves decreased substantially during the four-year decomposition, as illustrated by the amount of the C_{27} homologue (Fig. 2c).

3.2. Isotope degradation patterns

The bulk isotope composition of unlabelled leaves remained nearly constant during decomposition, whereas that of the ^{13}C -labelled leaves exhibited a significant decrease over time (i.e. ^{13}C -depletion, Fig. 3a). This ^{13}C -depletion reached 12‰ after the

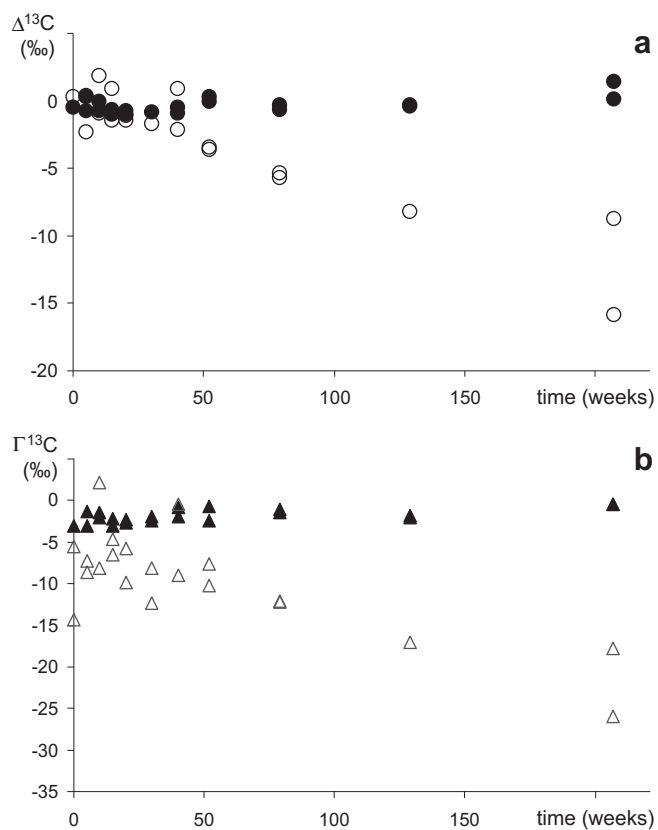


Fig. 3. Changes in isotope composition. Solid symbols: unlabelled leaves; open symbols: ^{13}C -labelled leaves. a. ^{13}C -content of bulk leaves ($\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{degraded}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{initial}}$). b. Specific ^{13}C -content of heptacosane ($\Gamma^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{heptacosane}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk undegraded leaves}}$).

four-year decomposition period. In agreement with previous reports (Collister et al., 1994; Chikaraishi et al., 2004), specific alkanes appeared to be ^{13}C -depleted compared to the bulk leaves. The ^{13}C -content of specific alkanes exhibited degradation patterns similar to that of bulk leaves. For example, the ^{13}C -content of the C_{27} homologue (Fig. 3b) remained nearly constant in the unlabelled leaves but exhibited a decrease $\sim 20\%$ in the ^{13}C -enriched leaves. The C_{25} and C_{29} homologues exhibited degradation patterns similar to that of C_{27} (data not shown). At the bulk leaf scale, as well as at the molecular scale, previous authors observed either increasing $\delta^{13}\text{C}$ values or unchanging isotope content during organic matter degradation (Balesdent et al., 1993; Connin et al., 2001). These studies dealt with unlabelled material and reported ^{13}C -enrichments of up to 6% . ^{13}C -depletion in the context of unlabelled organic matter decomposition was reported in only one early study of bulk *Spartina* rhizomes decaying in salt marsh sediments (Benner et al., 1987). The observed variability in the trends of ^{13}C -content that has been documented in the literature is likely due to the wide range of environments employed to investigate decomposition. In a recent experiment dealing with highly ^{13}C -enriched (i.e. $\delta^{13}\text{C} \approx 166\%$) poplar leaves, Rubino et al. (2010) reported a decrease of 41% in $\delta^{13}\text{C}$ after one year of litter degradation.

Disproportionate changes in isotope content during degradation may reflect either contributions from exogenous material having different isotope compositions or an "isotope effect" (Natelhoff and Fry, 1988; Balesdent et al., 1993). The latter phenomenon describes the selective degradation of chemical compounds having $\delta^{13}\text{C}$ values deviating from that of bulk leaves and/or kinetic discrimination during metabolism of leaf constituents by degrading

microorganisms (i.e. preferential metabolism of the material that is ^{13}C -depleted). Kinetic discrimination would be expected to generate similar patterns for a given species in a given environment. This explanation can thus be ruled out in our experiment since ^{13}C -labelled and unlabelled leaves exhibited different isotope depletion patterns. The preferential degradation of the lipids noted in Section 3.1 did not likely account for the observed isotope trends because lipids corresponded to only between 1 and 15% of the bulk leaf weight. Moreover, lipids are ^{13}C -depleted compared to the bulk leaves (Park and Epstein, 1960; Monson and Hayes, 1982). Selective degradation of ^{13}C -enriched molecules such as carbohydrates may partly explain the isotope content trends detected in bulk leaves. Indeed, ^{13}C -labelled leaves were grown in optimal conditions which may have led to them having higher carbohydrate content than the unlabelled leaves. Since carbohydrates can be ^{13}C -enriched up to 5% with respect to bulk leaves (Ehleringer, 1991), this may have played a role in the different behaviours of the isotope content in labelled and unlabelled leaves. Nevertheless, the depletion observed here for bulk labelled leaves reached 12% after four years of degradation. A complementary explanation is thus necessary to fully explain the observed isotope patterns, especially with respect to those observed for specific alkanes. Accordingly, this is most likely due to a contribution from exogenous organic matter that is of a $\delta^{13}\text{C}$ value lower than that of the labelled leaves. Such an exogenous contribution may be linked to the progressive invasion and/or accumulation of algae, faeces and fungi which were revealed upon microscopic examination. Although such soil-derived microbial biomass is generally considered to be devoid of long-chain lipids such as *n*-alkanes, microbes such as fungi or algae may contain long-chain lipids (Jones and Young, 1970; Rezanka and Sokolov, 1993; Volkman et al., 1998).

The isotope composition of the exogenous organic matter that may have contributed to the decaying leaves is likely similar to or slightly enriched in ^{13}C with respect to the original unlabelled material, whether at the bulk leaf level or the molecular level. Indeed, soil microbial biomass is generally considered to be ^{13}C -enriched by $1\text{--}3\%$ compared to soil organic matter (Werth and Kuzyakov, 2010; and reference therein). Fungi can be either slightly ^{13}C -depleted or ^{13}C -enriched relative to the ^{13}C -content of the substrate, depending on the fungus taxon and on the substrate (Gleixner et al., 1993; Hobbie et al., 2001; Abraham and Hesse, 2003; Ruess et al., 2005; Cowie et al., 2009). The sporophores of the saprophytic fungi from our experimental site were shown to be ^{13}C -enriched by $\sim 4\%$ with respect to their substrate (Zeller et al., 2007). Specific lipids from heterotrophic microorganisms have been shown to be either ^{13}C -enriched or ^{13}C -depleted by a few per mill, with respect to their total biomass, according to the taxon and to the environment (Teece et al., 1999; Abraham and Hesse, 2003; Cowie et al., 2009). The carbon isotope composition of faeces relative to diet is poorly known for soil fauna and seems to vary among taxa for small metazoans (DeNiro and Epstein, 1978; Tamelander et al., 2006). Specific compounds of faeces from soil fauna may reflect that of their diet as shown for copepod sterols (Grice et al., 1998). Therefore, the exogenous contribution to the original plant material probably had an isotope composition similar to or slightly higher than that of the unlabelled leaves. This implies that fungi, other microbes and the animals that produced the faeces in the litter likely derived mostly their diet from unlabelled organic matter that was the main substrate in the experimental site.

By comparing degradation patterns in ^{13}C -labelled and unlabelled leaves, this study provides evidence for microbial contributions to decaying litter at the level of bulk organic material and at the level of specific alkanes. This exogenous contribution was probably substantive but relatively small when compared to the bulk mass of the leaves in our samples. In this way, no isotope trend

would be expected for unlabelled leaves while ^{13}C -enriched leaves would be expected to exhibit decreasing $\delta^{13}\text{C}$ values throughout the decay period. While contribution from microbial organic matter to bulk plant organic matter has been well established previously, this has not been reported for long-chain alkanes. These molecules have been generally considered to be typical of plants, although recent studies suggested that microbial alkanes may contribute to degrading plant alkanes in soils and sediments (Bugge et al., 2010). The present study thus provides direct isotope arguments in favour of microbial contribution rather than isotope discrimination effects to explain the ^{13}C -enrichment trends previously reported for plant alkanes in soils (Nguyen Tu et al., 2004; Chikaraishi and Naraoka, 2006). Although microbial contribution appeared to be relatively limited for unlabelled/natural litter for this four-year-incubation, results from other studies suggest that it may lead to a ^{13}C -enrichment of up to 4‰ (Chikaraishi and Naraoka, 2006). This result was actually based on lipids extracted from bulk soils sampled from the horizon underlying the litter layer (i.e. 2–10 cm in depth). Therefore, it may be suggested that the high ^{13}C -enrichment detected by Chikaraishi and Naraoka (2006) corresponded to the accumulation over time of an increase in ^{13}C -content that was negligible at first but that led to a measurable effect in the long-term. Chikaraishi and Naraoka (2006) found that long-chain *n*-alkanols and *n*-alkanoic acids can also undergo significant ^{13}C -enrichment during leaf degradation in soils. We may therefore generalize our findings to other long-chain fatty lipids, which may also be contaminated by microbial lipids. Thus, circumspection is called for when considering long-chain fatty lipids as unaltered record of organic carbon isotope composition.

Acknowledgements

We are indebted to Thierry Bariac for access to the controlled chamber and to Patricia Richard for technical support during the labelling experiment. Thanks are also due to Jacques Ranger for access to the experimental site of Breuil-Chenue forest and Dominique Gelhaye and Jean-Pierre Calmet for their assistance in the field. We are grateful to Christelle Anquetil, Nicolas Péchot and Valérie Pouteau for mass spectrometry facilities as well as Stéphane Lemettré and Florent Zanetti for help in lipid preparation. We also thank Jorge Cubo, Yongsong Huang and Gladys Loranger for helpful discussions along with Stéphane Peigné and Son Nguyen Tu for technical assistance. Thanks are due to the two anonymous referees who provided constructive reviews and to Kurt Liittschwager for correction of the English of the manuscript. This work was funded by a grant from Fond National pour la Science (ACI JC 10051 – notification 035214) which was greatly appreciated.

References

- Abraham, W.-R., Hesse, C., 2003. Isotope fractionations in the biosynthesis of cell components by different fungi: a basis for environmental carbon flux studies. *FEMS Microbiology Ecology* 46, 121–128.
- Andrianarisoa, K., Zeller, B., Poly, F., Siegenfuhr, H., Bienaimé, S., Ranger, J., Dambrine, E., 2010. Control of nitrification by tree species in a common-garden experiment. *Ecosystems* 13, 1171–1187.
- Angers, D.A., Recous, S., Aita, C., 1997. Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -labelled wheat straw in situ. *European Journal of Soil Science* 48, 295–300.
- Bahri, H., Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.-F., Bardoux, G., Mariotti, A., 2008. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by ^{13}C isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1916–1922.
- Balesdent, J., Girardin, C., Mariotti, A., 1993. Site related $\delta^{13}\text{C}$ of tree leaves and soil organic matter in a temperate forest. *Ecology* 74, 1713–1721.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Bockock, K.L., Gilbert, O.J.W., 1957. The disappearance of leaf litter under different woodland conditions. *Plant and Soil* 9, 179–185.
- Bugge, B., Wiesenberg, G.L.B., Glaser, B., 2010. Is there a possibility to correct fossil *n*-alkane data for post sedimentary alteration effects? *Applied Geochemistry* 25, 947–957.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., 2006. Carbon and hydrogen isotope variation of plant biomarkers in a plant–soil system. *Chemical Geology* 231, 190–202.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H., Poulson, S.R., 2004. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*). *Phytochemistry* 65, 323–330.
- Coïc, Y., Lesaint, C., 1983. *Cultures Hydroponiques*. Flammarion, Paris.
- Collister, J.W., Rieley, G., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Organic Geochemistry* 21, 619–627.
- Connin, S.L., Feng, X., Virginia, R.A., 2001. Isotopic discrimination during long-term decomposition in an arid land ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 41–51.
- Cortez, J., 1998. Field decomposition of leaf litters: relationships between decomposition rates and soil moisture, soil temperature and earthworm activity. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 783–793.
- Cowie, B.R., Slater, G.F., Bernier, L., Warren, L.A., 2009. Carbon isotope fractionation in phospholipid fatty acid biomarkers of bacteria and fungi native to an acid mine drainage lake. *Organic Geochemistry* 40, 956–962.
- Cranwell, P.A., 1981. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* 3, 79–89.
- Crossman, Z.M., Ineson, P., Evershed, R.P., 2005. The use of ^{13}C labelling of bacterial lipids in the characterisation of ambient methane-oxidising bacteria in soils. *Organic Geochemistry* 36, 769–778.
- Deines, P., 1980. The isotopic composition of reduced organic carbon. In: Fritz, P., Fontes, J.C. (Eds.), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, vol. 1. Elsevier, London, pp. 329–406.
- DeNiro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322–1335.
- Ehleringer, J.R., 1991. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionation and its utility in terrestrial plant studies. In: Coleman, D.C., Fry, B. (Eds.), *Carbon Isotope Techniques*. Academic Press, San Diego, pp. 187–201.
- Girardin, C., Mariotti, A., 1991. Analyse isotopique du ^{13}C en abondance naturelle dans le carbone organique: un système automatique avec robot préparateur. *Cahiers Orstom – Série Pédologie* 26, 371–380.
- Girardin, C., Rasse, D.P., Biron, P., Ghashghaie, J., Chen, C., 2009. A method for ^{13}C -labelling of metabolic carbohydrates within French bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) for decomposition studies in soils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 1792–1800.
- Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A., Schmidt, H.L., 1993. Correlation between the ^{13}C content of primary and secondary products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiology* 102, 1287–1290.
- Grice, K., Klein Breteler, W.C.M., Schouten, S., Grossi, V., de Leeuw, J.W., Sinnighe Damsté, J.S., 1998. Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography* 13, 686–693.
- Hobbie, E.A., Weber, N.S., Trappe, J.M., 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* 150, 601–610.
- Huang, Y., Eglinton, G., Ineson, P., Latter, P.M., Bol, R., Harkness, D.D., 1997. Absence of carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes in a 23-year field decomposition experiment with *Calluna vulgaris*. *Organic Geochemistry* 26, 497–501.
- Jones, J.G., Young, B.V., 1970. Major paraffin constituents of microbial cells with particular references to *Chromatium* sp. *Archives of Microbiology* 70, 82–88.
- Mansuy, L., Philp, R.P., Allen, J., 1997. Source identification of oil spills based on the isotopic composition of individual components in weathered oil samples. *Environmental Science and Technology* 31, 3417–3425.
- Mazéas, L., Budzinski, H., Raymond, N., 2002. Absence of stable carbon isotope fractionation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic bacterial biodegradation. *Organic Geochemistry* 33, 1259–1272.
- Melin, E., 1930. Biological decomposition of some types of litter from North American forests. *Ecology* 11, 72–101.
- Monson, K.D., Hayes, J.M., 1982. Carbon isotopic fractionation in the biosynthesis of bacterial fatty acids. Ozonolysis of unsaturated fatty acids as a means of determining the intramolecular distribution of carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 139–149.
- Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Berthelin, J., Ranger, J., 2006. Effect of tree species substitution on organic matter biodegradability and mineral nutrient availability in a temperate topsoil. *Annals of Forest Science* 63, 763–771.
- Natelhoffer, K.J., Fry, B., 1988. Controls on natural nitrogen-15 and carbon-13 abundances in forest soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1633–1640.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Bardoux, G., Mariotti, A., 2004. Diagenesis effects on specific carbon isotope composition of plant *n*-alkanes. *Organic Geochemistry* 35, 317–329.
- Nguyen Tu, T.T., Egasse, C., Zeller, B., Derenne, S., 2007. Chemotaxonomical investigations of fossil and extant beeches. I. Leaf lipids from the extant *Fagus sylvatica* L. *Comptes Rendus Palevol* 6, 451–461.
- Ono, K., Hirai, K., Morita, S., Ohse, K., Hiradate, S., 2009. Organic carbon accumulation processes on a forest floor during an early humification stage in a temperate deciduous forest in Japan: evaluations of chemical compositional changes by ^{13}C NMR and their decomposition rates from litterbag experiment. *Geoderma* 151, 351–356.

- Park, R., Epstein, S., 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 21, 110–126.
- Ponge, J.F., Arpin, P., Sondag, F., Delecour, F., 1997. Soil fauna and site assessment in beech stands of the Belgian Ardennes. *Canadian Journal of Forest Research* 27, 2053–2064.
- Ponge, J.-F., 1999. Horizons and humus forms in beech forests of the Belgian Ardennes. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1888–1901.
- Rezanka, T., Sokolov, M.Y., 1993. Rapid method for the enrichment of very long-chain fatty acids from microorganisms. *Journal of Chromatography A* 636, 249–254.
- Rubino, M., Dungait, J.A.J., Evershed, R.P., Bertolini, T., De Angelis, P., D'Onofrio, A., Lagomarsino, A., Lubritto, C., Merola, A., Terrasi, F., Cotrufo, M.F., 2010. Carbon input below ground is the major C flux contributing to leaf litter mass loss: evidences from a ^{13}C labelled-leaf litter experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1009–1016.
- Ruess, L., Tiunov, A., Haubert, D., Richnow, H.H., Häggblom, M.M., Scheu, S., 2005. Carbon stable isotope fractionation and trophic transfer of fatty acids in fungal based soil food chains. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 945–953.
- Smith, V.C., Bradford, M.A., 2003. Litter quality impacts on grassland litter decomposition are differently dependent on soil fauna across time. *Applied Soil Ecology* 24, 197–203.
- Stahl, W.J., 1980. Compositional changes and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionation during the degradation of hydrocarbons by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1903–1907.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. University of California Press, Berkeley.
- Tamelaender, T., Søreide, J.E., Hop, H., Carroll, M.L., 2006. Fractionation of stable isotopes in the Arctic marine copepod *Calanus glacialis*: effects on the isotopic composition of marine particulate organic matter. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333, 231–240.
- Taylor, B.R., Parkinson, D., Parsons, W.F.J., 1989. Nitrogen and Lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology* 70, 97–104.
- Teece, M.A., Fogel, M.L., Dollhopf, M.E., Neelson, K.H., 1999. Isotopic fractionation associated with biosynthesis of fatty acids by a marine bacterium under oxic and anoxic conditions. *Organic Geochemistry* 30, 1571–1579.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.J., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research development. *Organic Geochemistry* 29, 1163–1179.
- Werth, M., Kuzyakov, Y., 2010. ^{13}C fractionation at the root–microorganisms–soil interface: a review and outlook for partitioning studies. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1372–1384.
- Wiesenberg, G.L.B., Schwarzbauer, J., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., 2004. Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from *n*-alkane/*n*-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. *Organic Geochemistry* 35, 1371–1393.
- Witkamp, M., 1966. Decomposition of leaf litter in relation to environment, microflora, and microbial respiration. *Ecology* 47, 194–201.
- WRB, 2006. 2006. IUSS Working Group. *World Reference Base for Soil Resources*. World Soil Resources Reports No. 13, second ed. FAO, Rome.
- Yamamoto, S., Kawamura, K., Seki, O., Meyers, P.A., Zheng, Y., Zhou, W., 2010. Paleoenvironmental significance of compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ variations in *n*-alkanes in the Hongyuan peat sequence from southwest China over the last 13 ka. *Organic Geochemistry* 41, 491–497.
- Zeller, B., Colin-Belgrand, M., Dambrine, E., Martin, F., Bottner, P., 2000. Decomposition of ^{15}N -labelled beech litter and fate of nitrogen derived from litter in a beech forest. *Oecologia* 123, 550–559.
- Zeller, B., Brechet, C., Maurice, J.-P., Le Tacon, F., 2007. ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Forest Science* 64, 419–429.