Ecole Thématique MISTRAMO
(Paris/Sèvres 2017)

Isotopes stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$) pour étudier le fonctionnement des plantes

Jaleh Ghashghaie

Lab. Ecologie, Systématique & Evolution
Université de Paris-Sud, Paris-Saclay, Orsay

Environnement

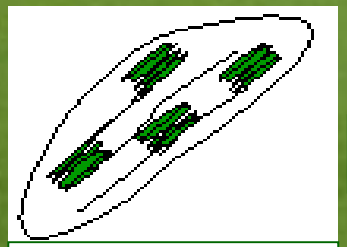
$[CO_2]$

$^{13}CO_2$

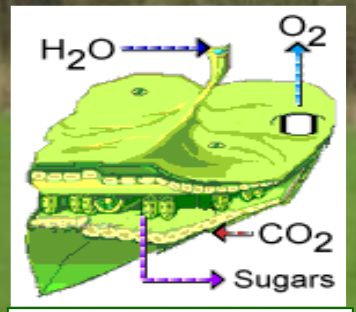
$^{12}CO_2$

Assimilation

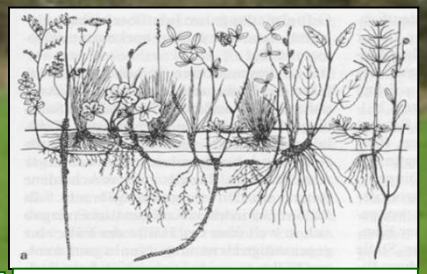
Respiration



Cellule



Leaf



Roots

Plant

Pourquoi et comment les isotopes stables du C sont utilisés pour étudier le fonctionnement des plantes?

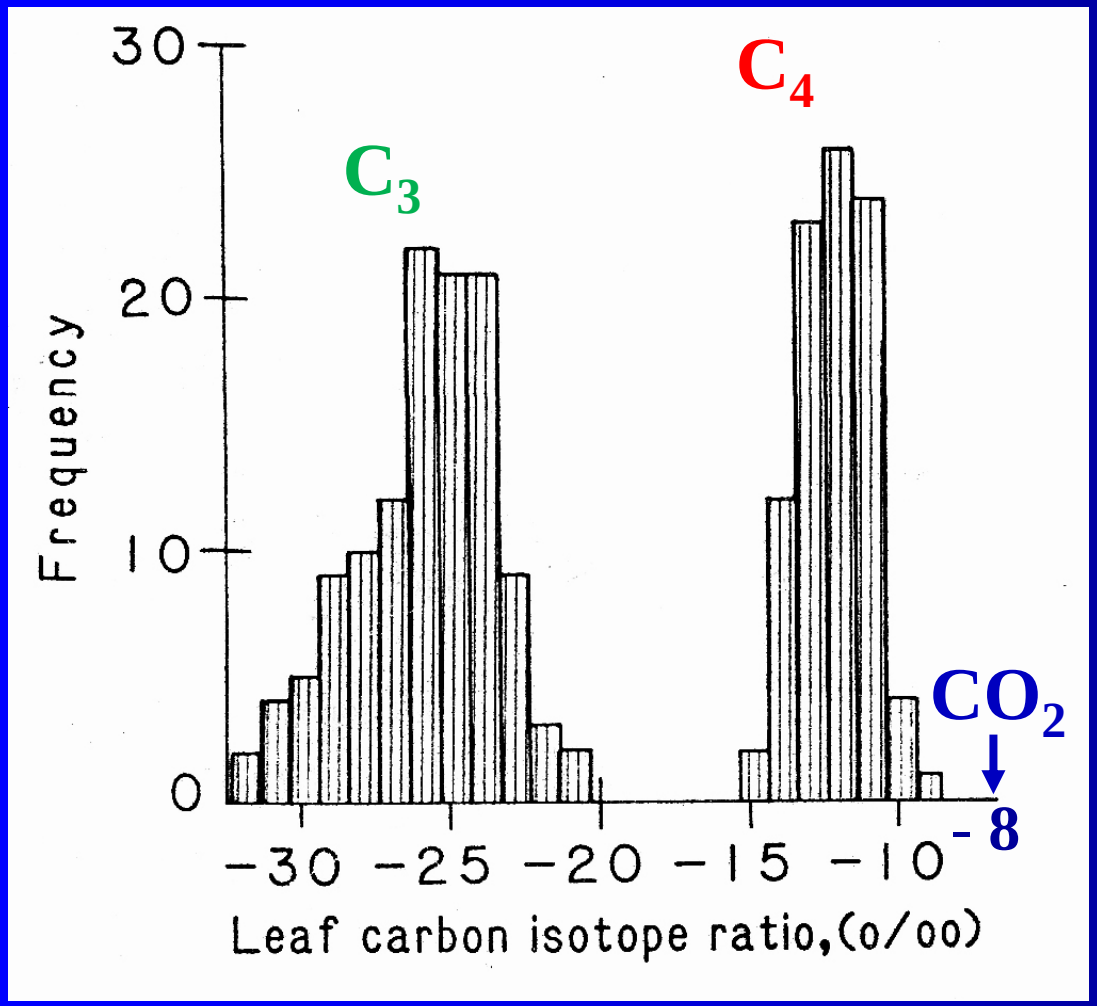
- **Abondances naturelles**

Traceurs naturels pour étudier les systèmes biologiques.

- **Marquage isotopique**

Non-radioactifs (faciles à utiliser).

Composition isotopique du carbone ($\delta^{13}C$) dans les plantes



Plantes discriminent contre isotope lourd du carbone (^{13}C) lors de la photosynthèse

DONC,

Matière organique (MO) végétale est appauvrie en ^{13}C comparée au CO_2 de l'air.

Wickman (1952)

Discrimination isotopique du carbone par les plants (Δ)

Substrat ⟶ Produit

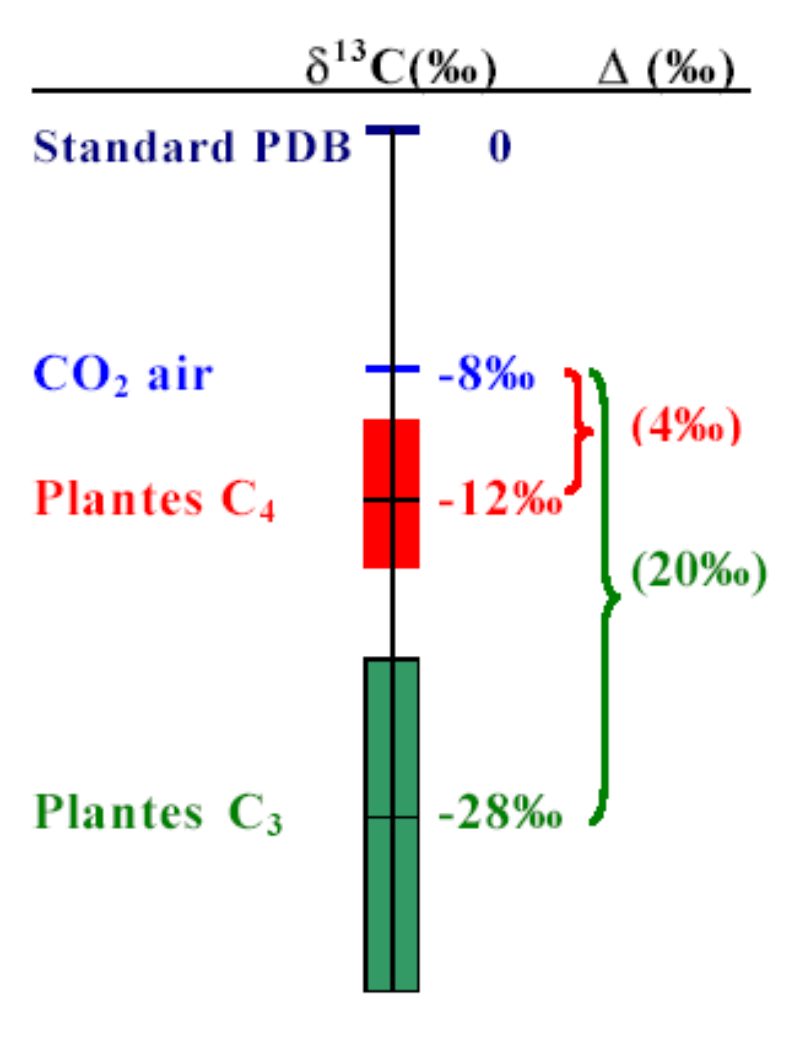
$$\Delta \approx \delta^{13}C(\text{source}) - \delta^{13}C(\text{produit})$$

Exemples:

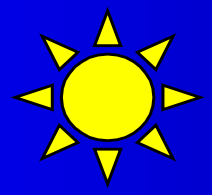
$$\Delta\,(‰) \approx \delta^{13}C\ (\text{air}) - \delta^{13}C\ (\text{plant})$$

$$\Delta_3\,(‰) \approx (-8‰) - (-28‰) \approx 20‰$$

$$\Delta_4\,(‰) \approx (-8‰) - (-12‰) \approx 4‰$$



Discrimination isotopique lors de la photosynthèse des plantes C_3

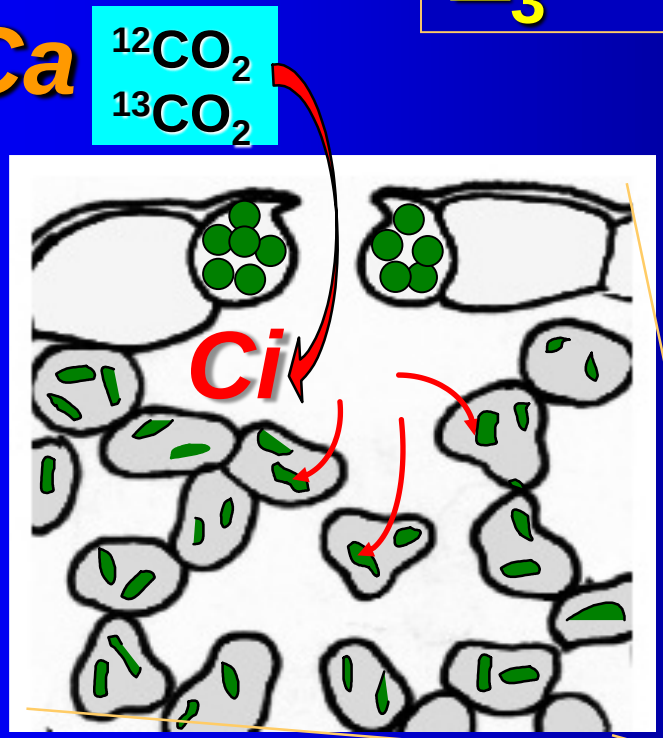


$\delta^{13}CO_2 = -8$ ‰

Conductance stomatique

$$\Delta_3 = a + (b - a) \,.\, Ci/Ca$$

Farquhar *et al.* (1982)

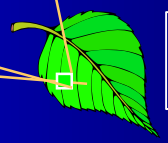


Diffusion
(a = 4.4 ‰)

Rubisco
(b = 29 ‰)

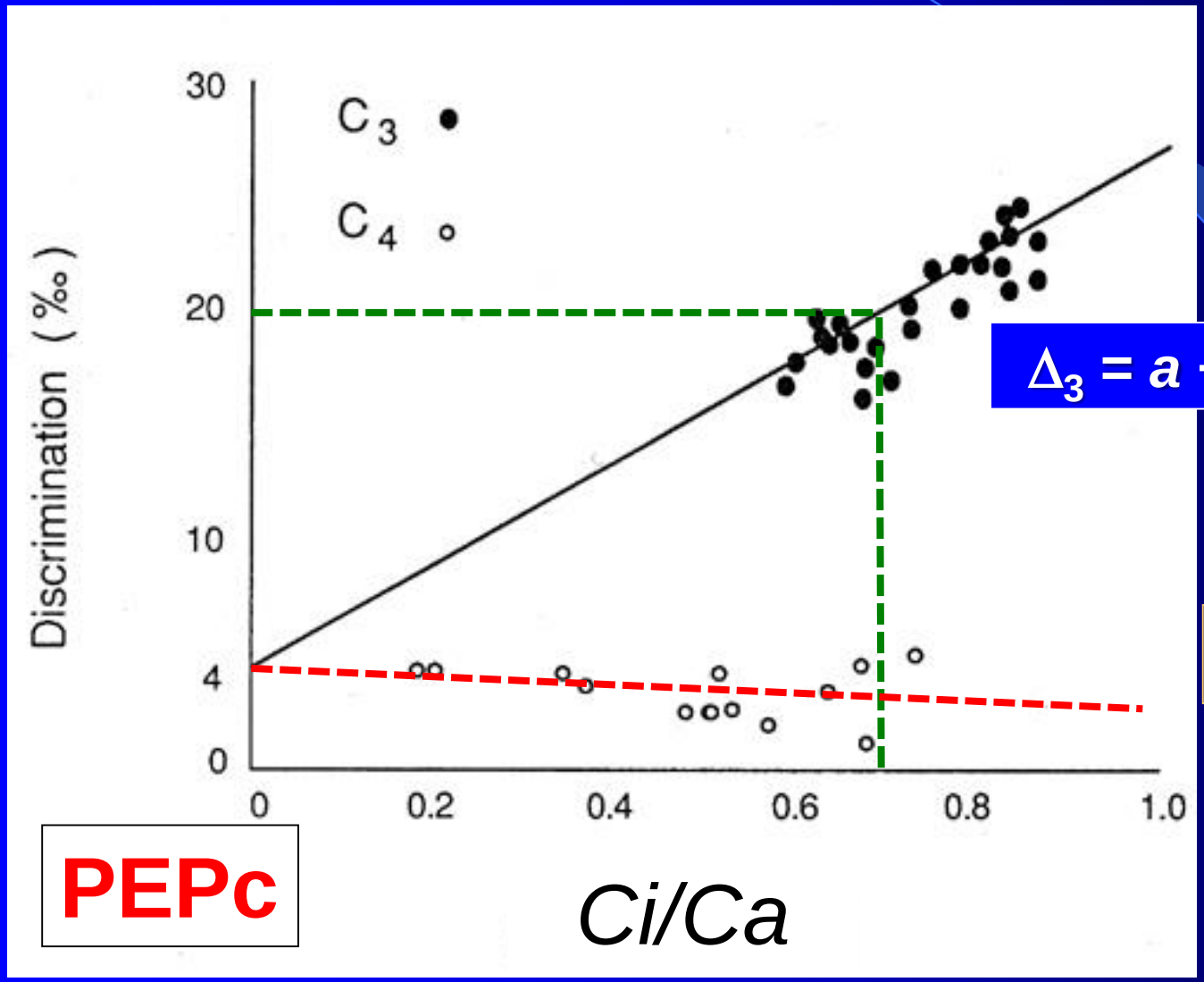
Dissolution
(s = 1.1 ‰)

Discrimination
$\Delta_3 \cong 20$‰



$\delta^{13}C$ OM = – 28 ‰

Modèle de Discrimination Isotopique Photosynthétique (Δ_3) validé



Farquhar *et al.* **(1982)**

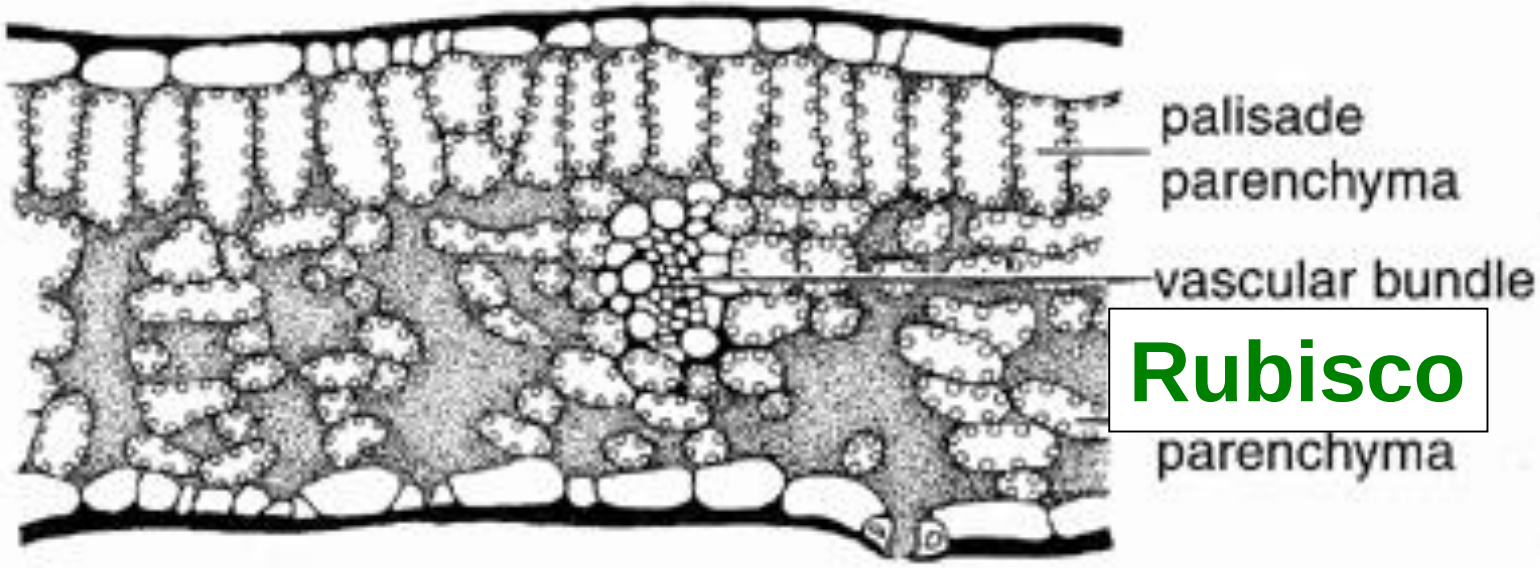
$$\Delta_3 = a + (b - a) \cdot Ci/Ca$$

$Ci/Ca \approx 0.7$

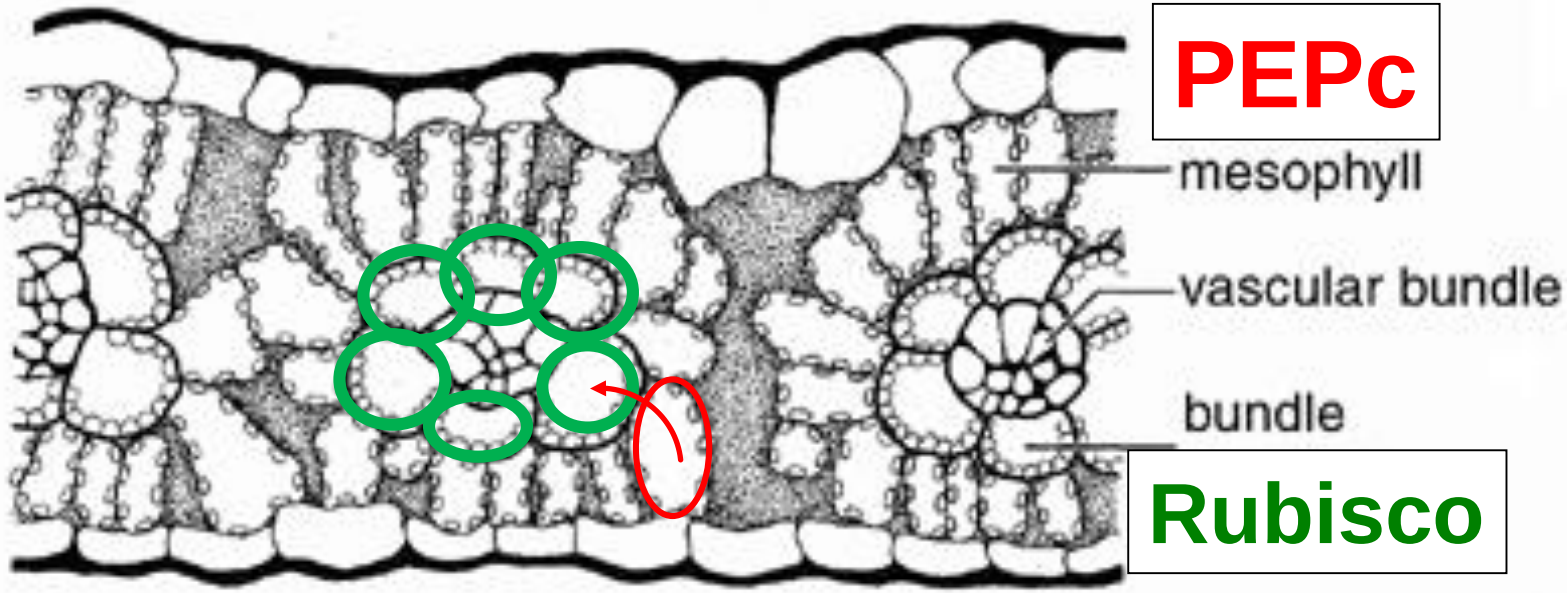
$\Delta_3 \approx 20$ ‰

Structure des feuilles C_3 et C_4

C_3



C_4



Discrimination isotopique chez les plantes CAM

Nuit: stomates ouverts
CO_2 fixé par la PEPc
Accumulation de malate (vacuole)
(C4)

Jour: stomates fermés
Décarboxylation du malate
Fixation du CO_2 par la Rubisco (chloroplastes)
(C3)

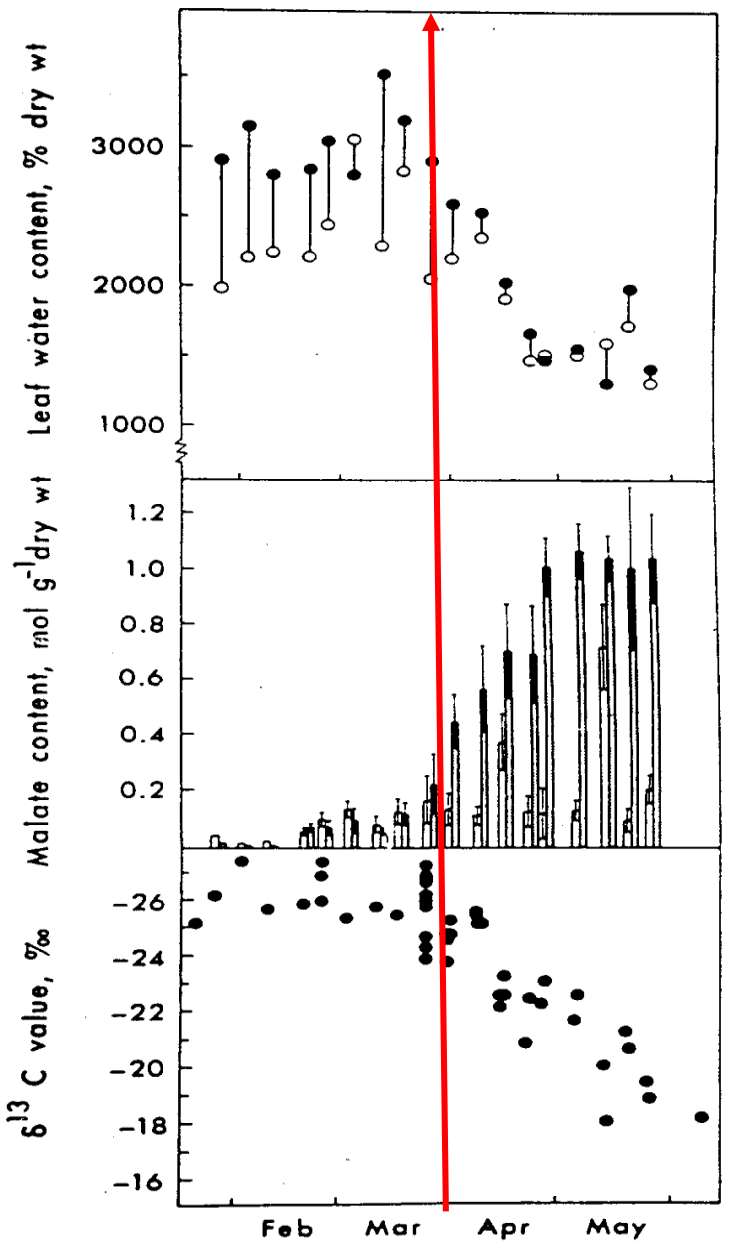
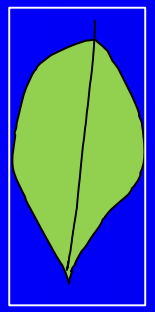


Fig. 13.5 Seasonal courses of leaf water content, malate content and leaf carbon isotope ratio of *Mesembryanthemum cristallinum* (redrawn from Winter *et al.*, 1978).

$\delta^{13}C$ de la matière organique totale (bulk OM) foliaire est en général utilisé comme indicateur du fonctionnement des plantes.



Couper, enfermer.

Plonger dans N liquide.

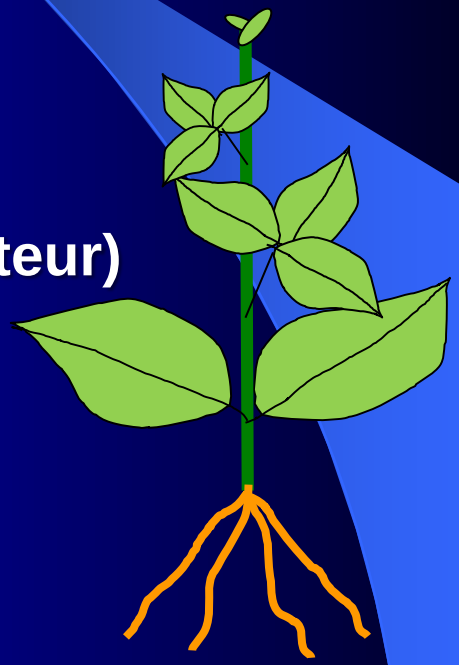
Conserver à -80°C.

Sécher (étuve 70°C ou lyophilisateur)

Broyer finement.

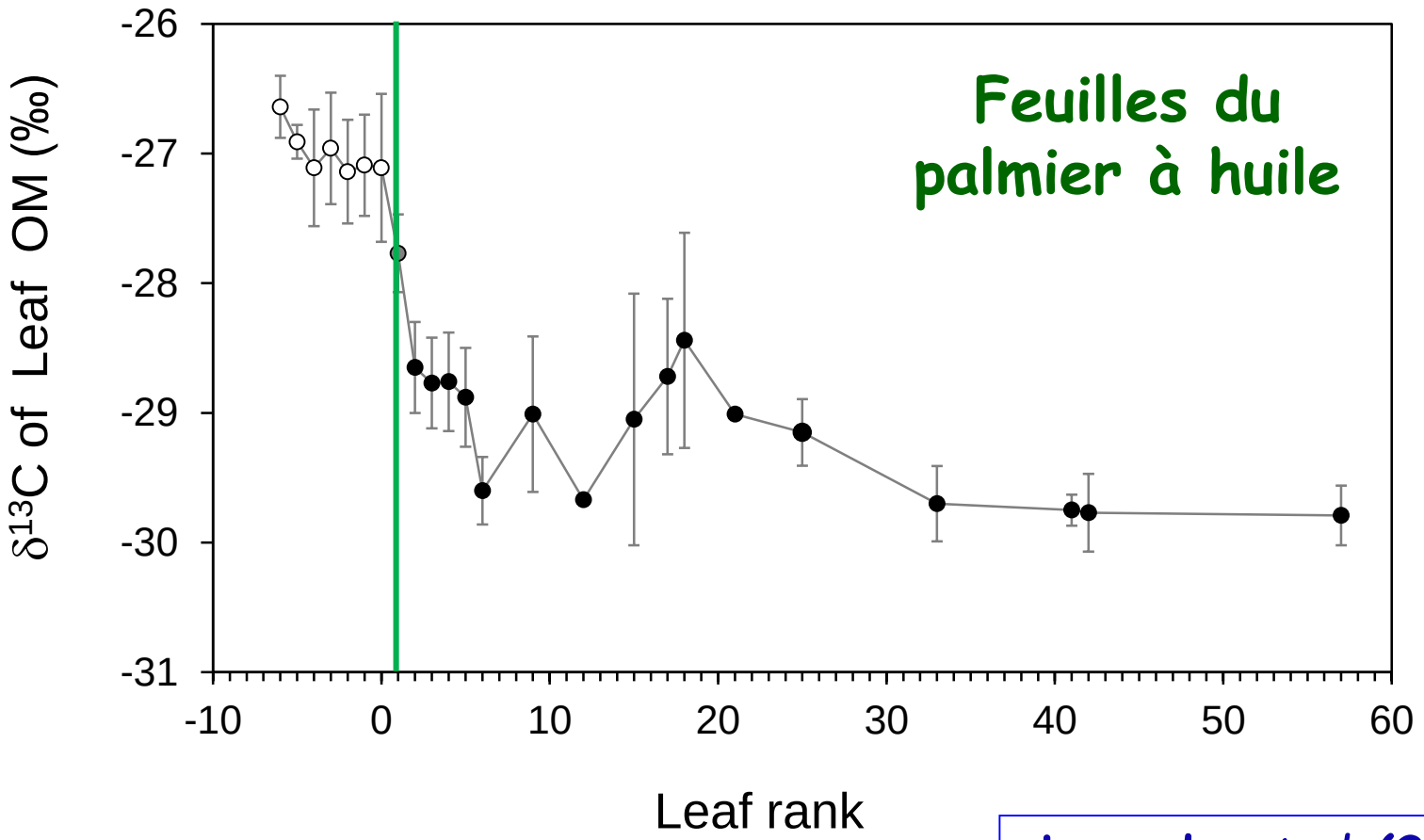
Préparer les nacelles.

Analyse $\delta^{13}C$ (bulk OM).



Quelle feuille choisir?

$\delta^{13}C$ de MO foliaire au cours de la transition de l'hétérotrophie à l'autotrophie

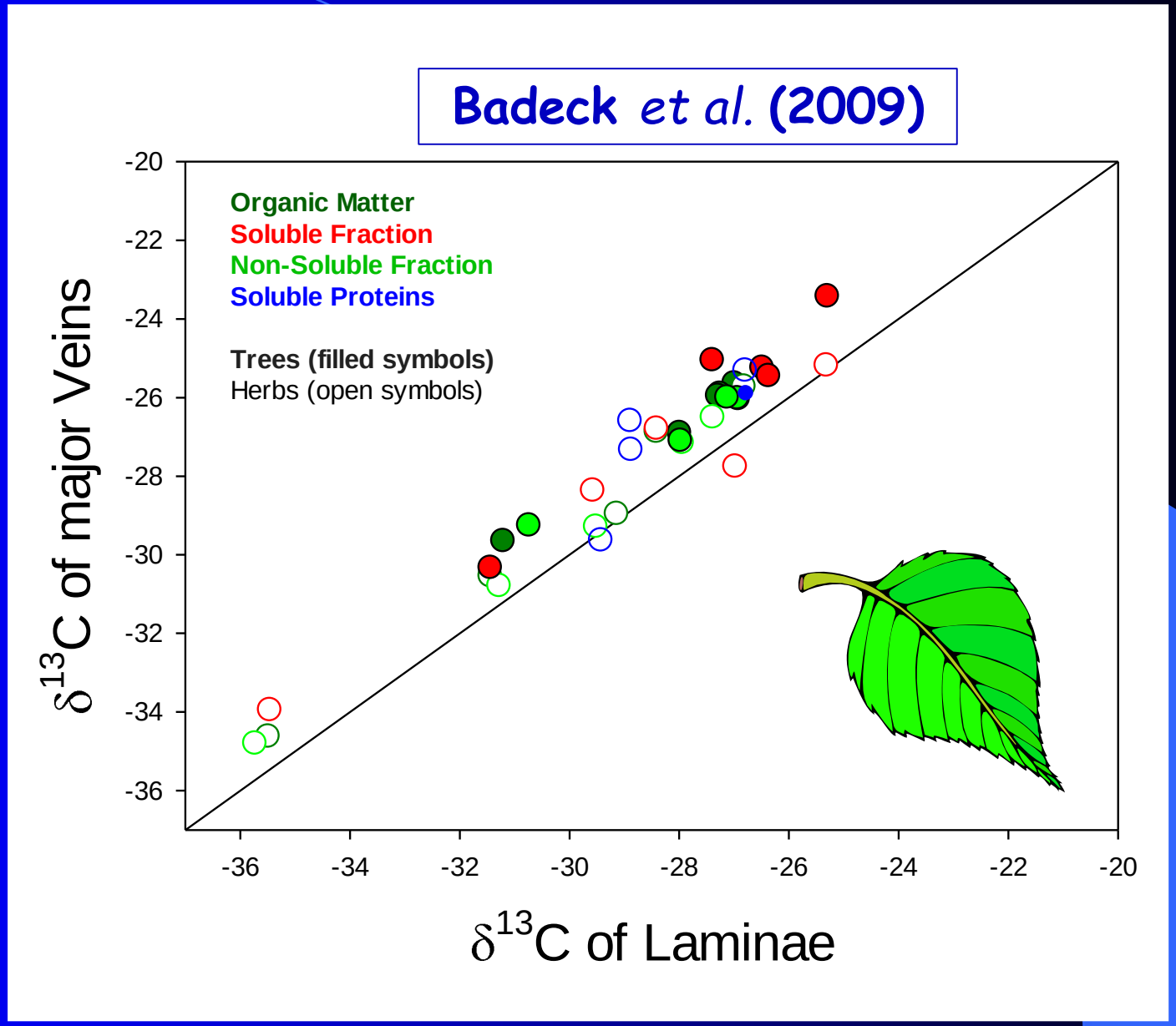


Lamade *et al.* (2009)
RCM

Différence de $\delta^{13}C$ entre limbe & nervure

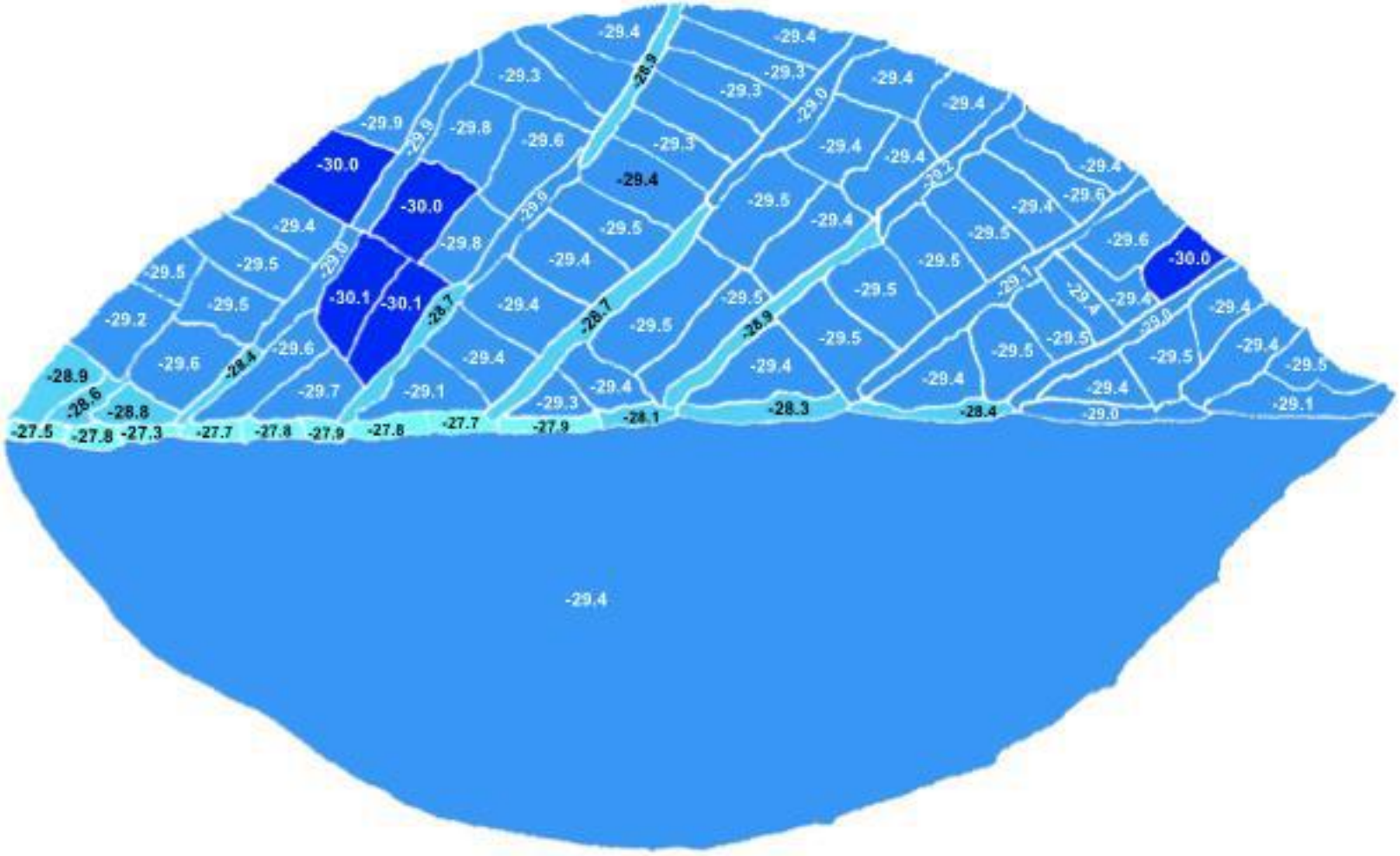
Herbes
Haricot
Tournesol
Tabac
Plantin
Lierre

Arbres
Hêtre
Chêne
Orme
Châtaigner
Erable



Hétérogénéité de $\delta^{13}C$ au niveau d'une feuille (hêtre)

Nguyen *et al.* **2013**



Hétérogénéité de $\delta^{13}C$ au niveau d'une feuille (hêtre)

Puisqu'il faut très peu de matériel pour analyse isotopique, c'est mieux de prendre un grand échantillon et obtenir un broyat homogène, et prendre ensuite un aliquote représentatif.

$\delta^{13}C$ (bulk OM) foliaire (ou graine) intègre le fonctionnement de la plante durant toute la période de sa croissance, donc donne une valeur moyenne de l'ensemble des évènements subis par la plante.

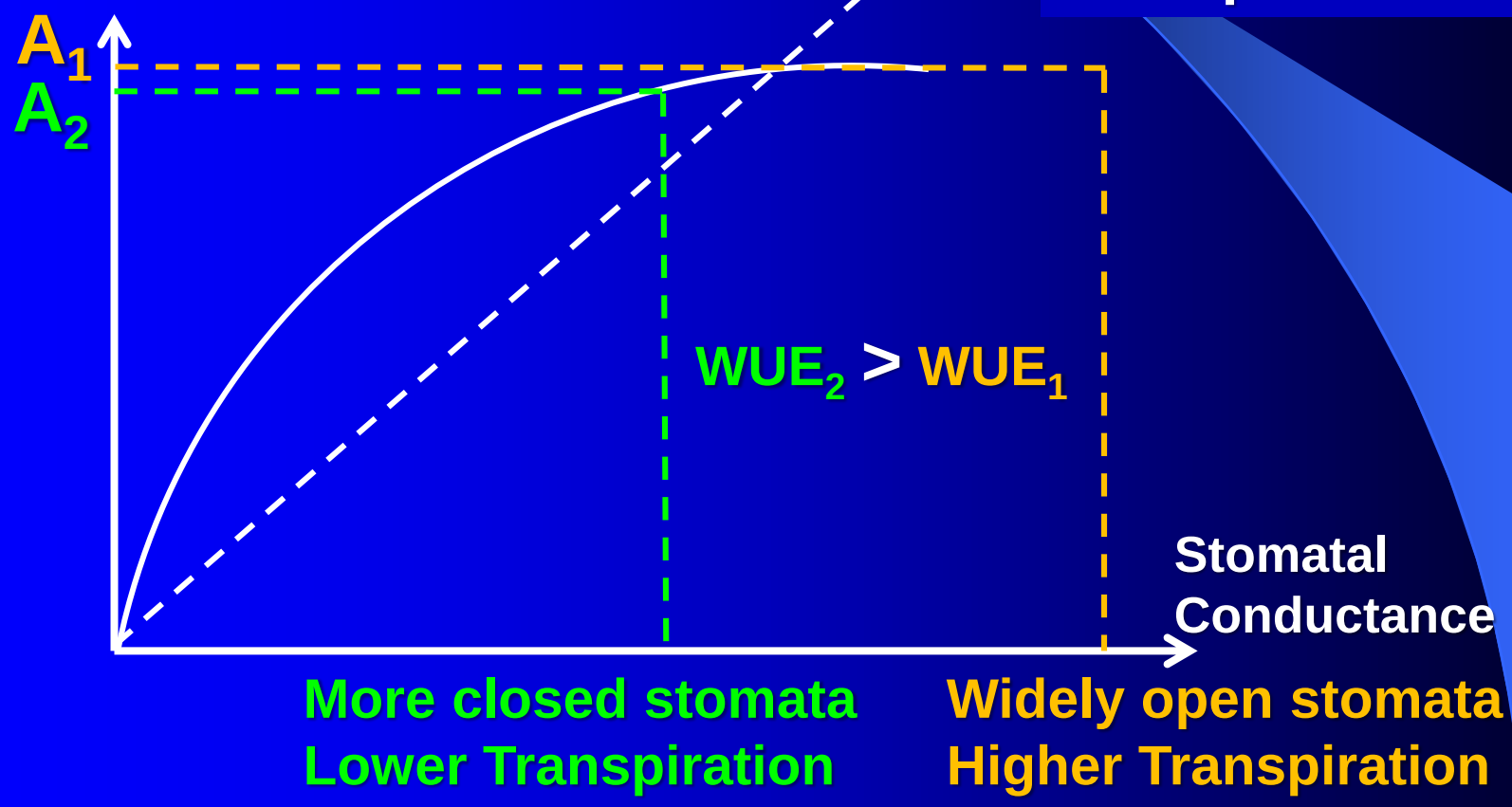
$\delta^{13}C$ des produits récents de la photosynthèse (par ex. après une période de sécheresse) refléterait mieux le changement dans le fonctionnement de la plante (comparé au bulk OM).

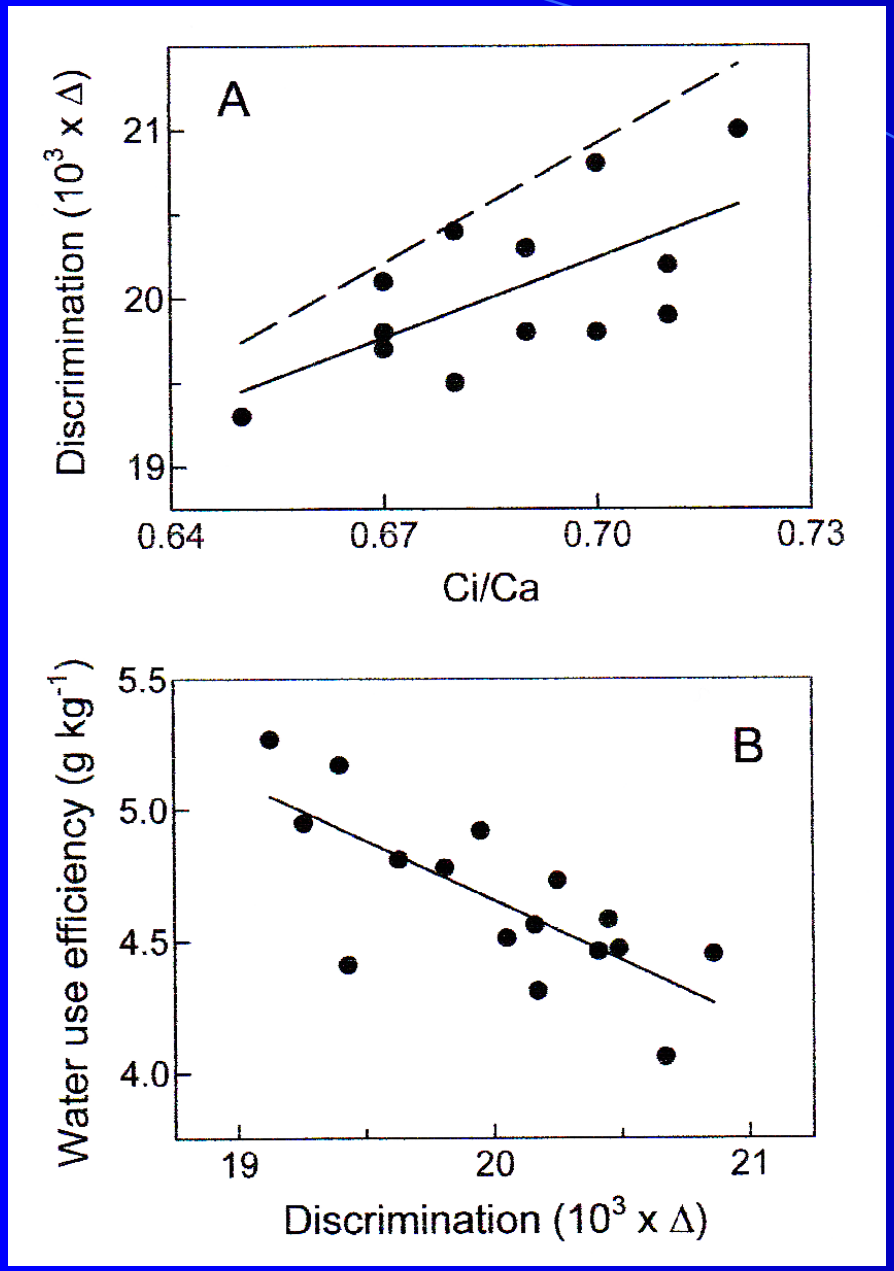
DONC, la modalité de l'échantillonnage est important pour la représentativité ainsi que pour répondre aux questions posées.

- Le choix de l'échantillon
- La taille de l'échantillon
- Le nombre de l'échantillon (répétitions)

Application agronomique:
Relation entre Discrimination (Δ_3) & Water Use Efficiency (WUE)

$$WUE = \frac{\text{Photosynthèse}}{\text{Transpiration}}$$





Application agronomique:

Δ_3 indicateur de WUE

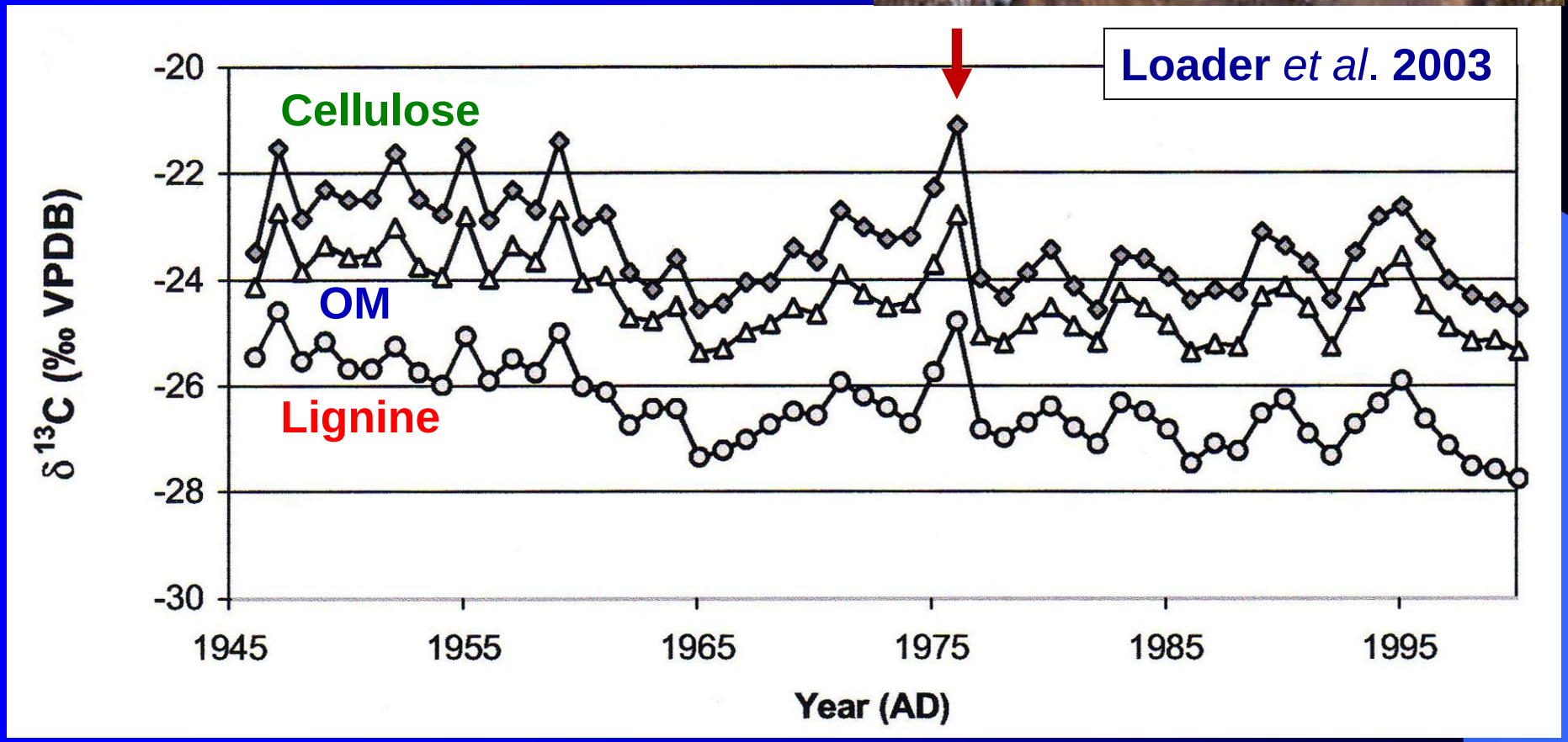
Critère de résistance à la sécheresse

Programmes de sélection chez les céréales

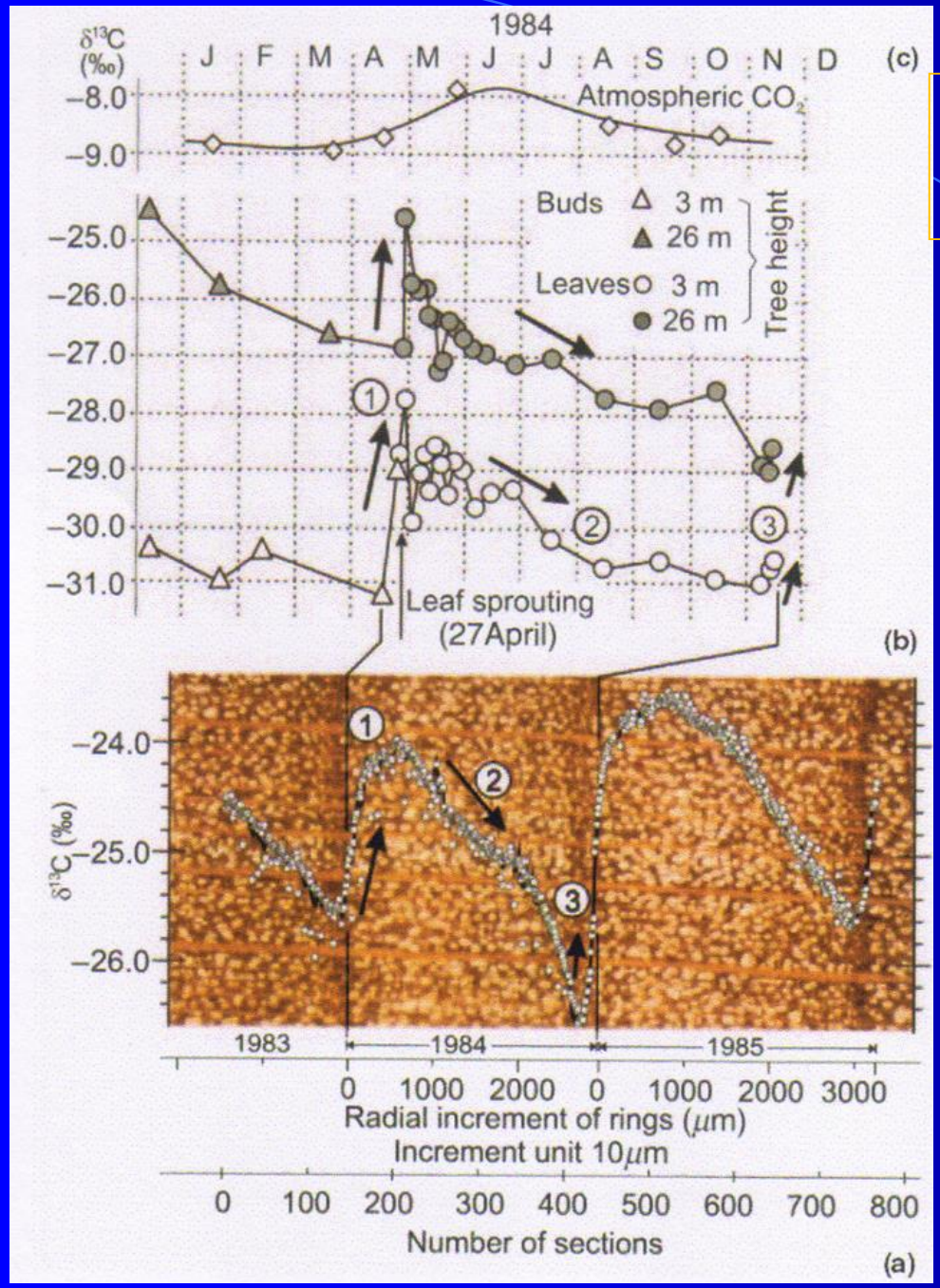
Condon *et al.* (2004)

Différents génotypes de blé

Application écologique: $\delta^{13}C$ de cernes des arbres C_3 est utilisé pour la reconstruction du climat du passé



Variations intra-annuelles du $\delta^{13}C$ de cernes d'arbres



Différence de $\delta^{13}C$ entre bois de printemps et bois d'été

Profile de $\delta^{13}C$ du cerne de l'année n change avec le climat de l'année n-1 (taille de réserve et son $\delta^{13}C$)

Helle & Schleser (2004)

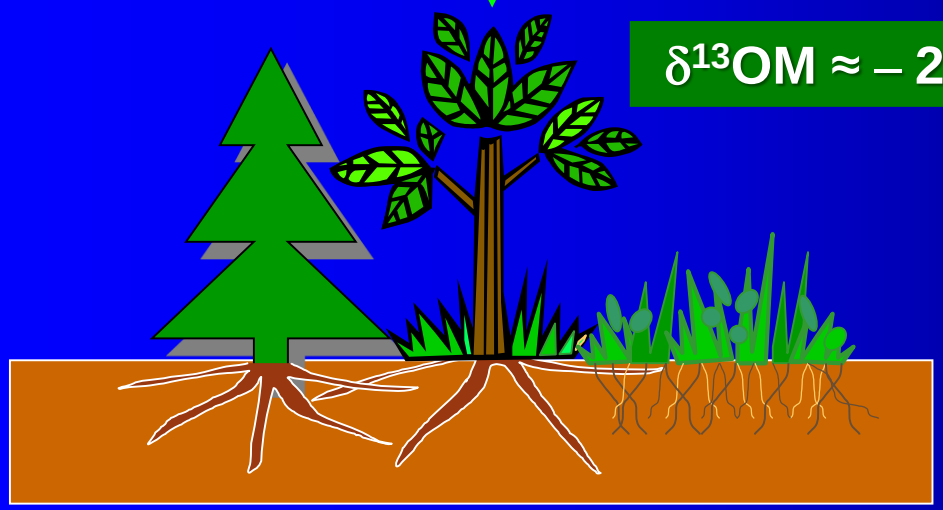
Mais, $\delta^{13}C$ de la MO ne représente pas la discrimination isotopique lors de la photosynthèse uniquement...

Si pas de discrimination isotopique après la fixation photosynthétique du CO_2

$\delta^{13}CO_2 \approx -8$ ‰

$\Delta = 20$ ‰

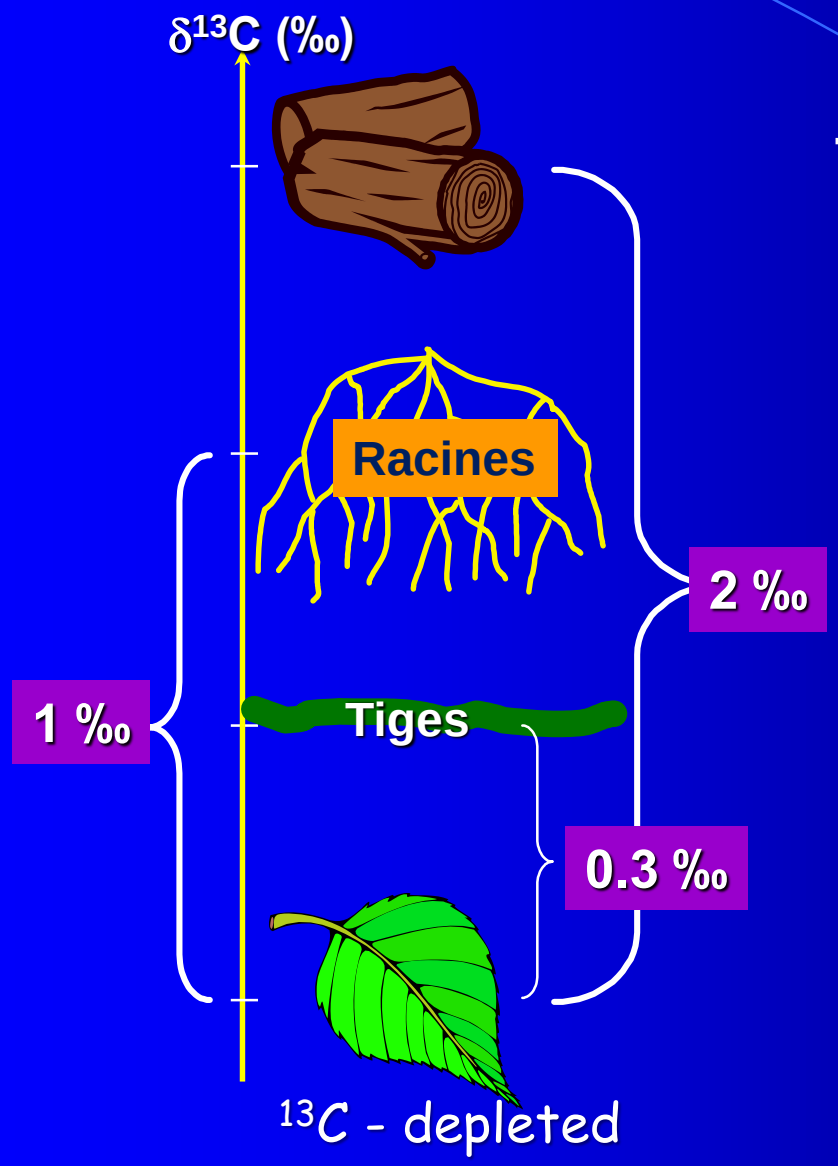
$\delta^{13}OM \approx -28$ ‰



Distribution homogène de ^{13}C entre différents organes et entre métabolites…

Mais, ce n'est pas le cas…

Différences de $\delta^{13}C$ entre organes



Analyse statistique:

400 données

80 espèces :

C_3 - C_4

Annuelles - pérennes

Arbres - herbes

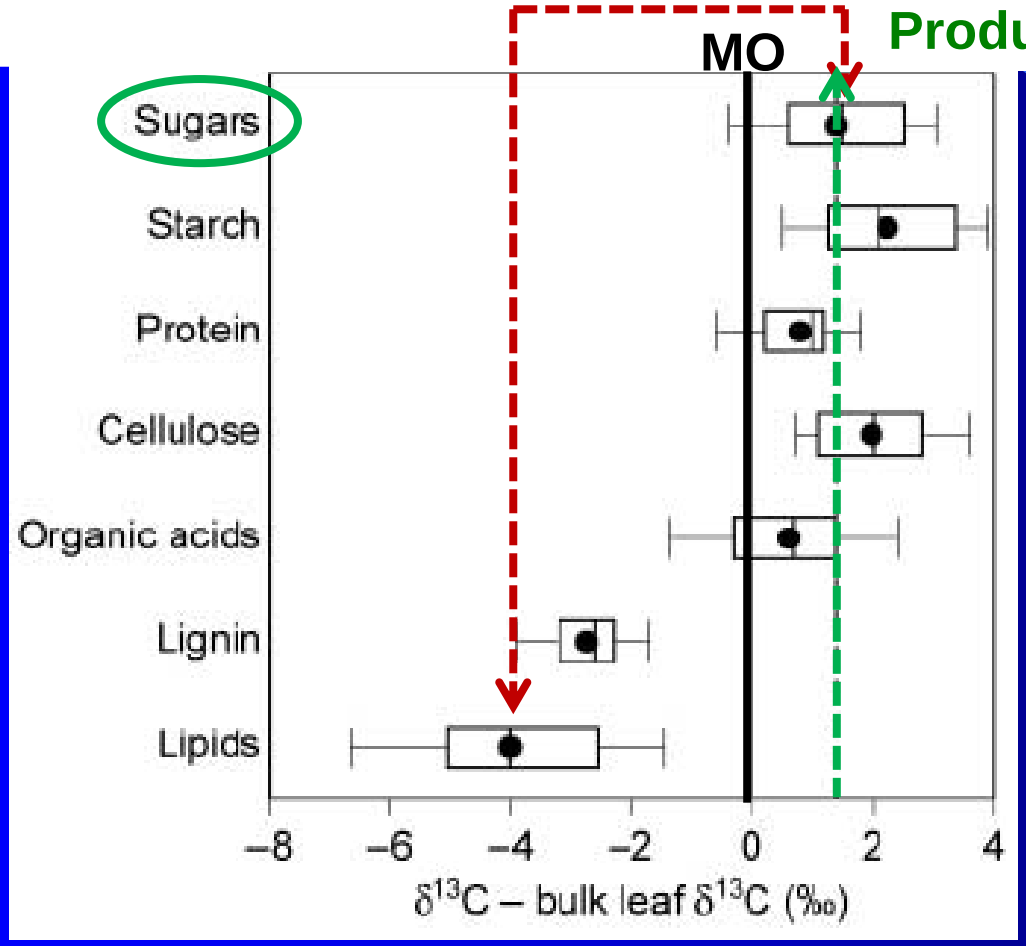
Discriminations Post-photosynthetiques

Badeck *et al.* **(2005)**

RCM

Différence de $\delta^{13}C$ entre fractions métaboliques

Discriminations post-photosynthétiques

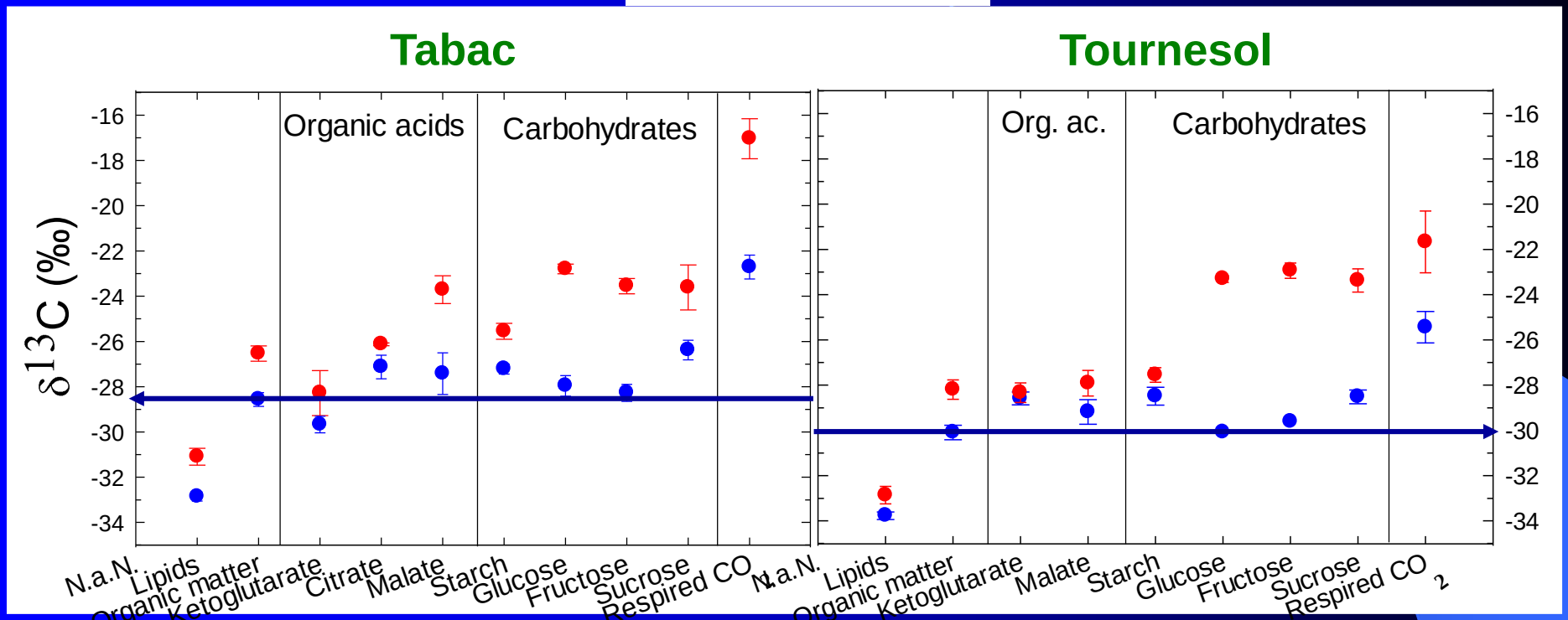


Bowling et al. (2008)

Observation commune dans toutes les plantes et organes.

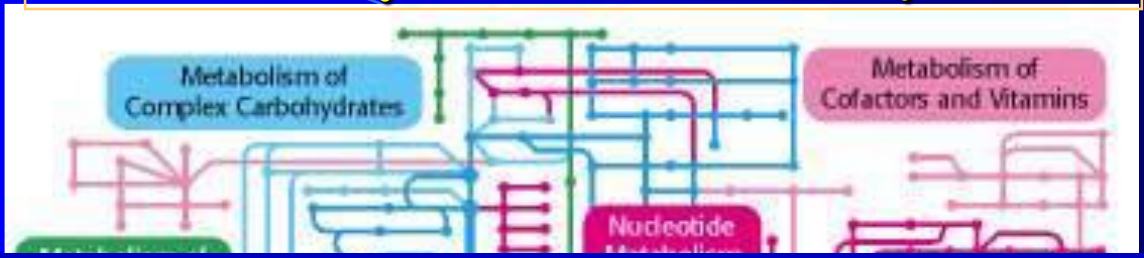
Différence de $\delta^{13}C$ entre métabolites

Témoins
Sécheresse



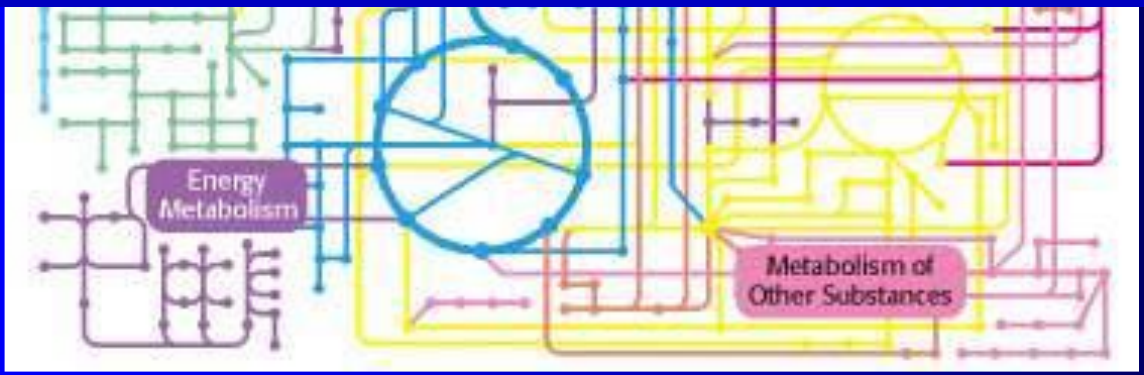
Ghashghaie *et al.* **(2001)**
PCE

Isotopie métabolique



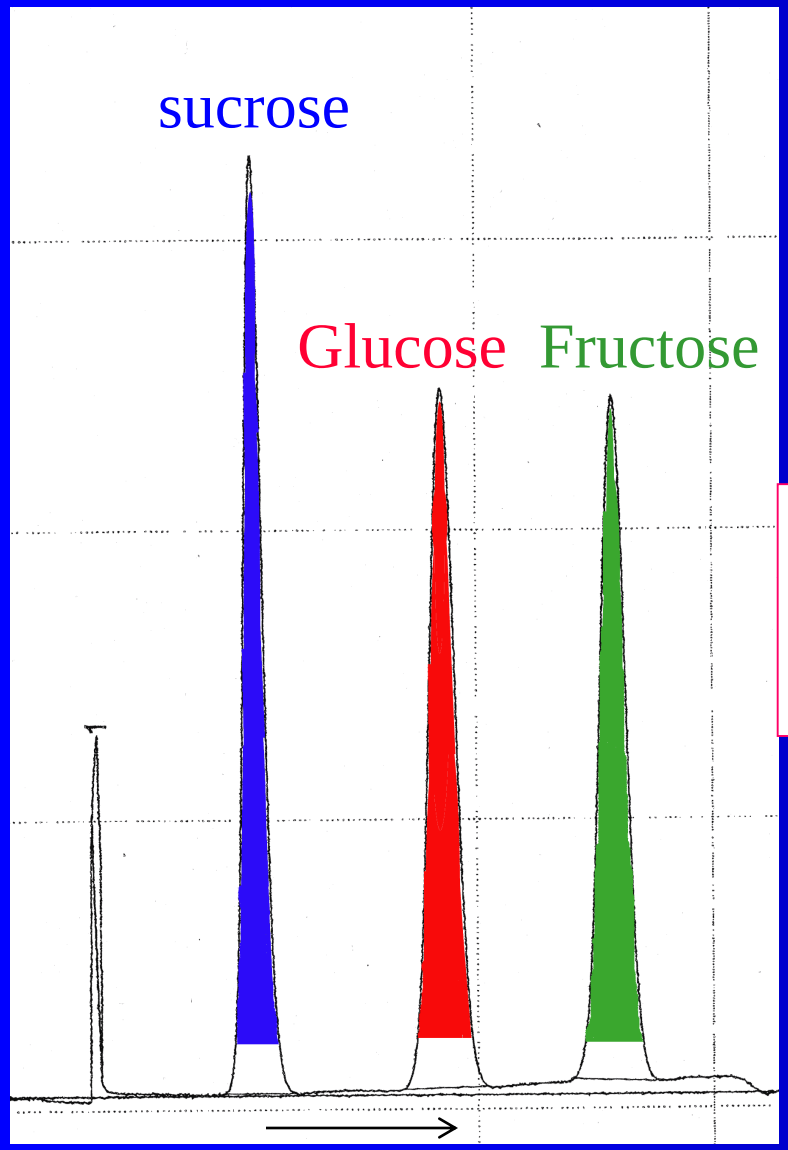
Extraction/purification de métabolites pour analyses isotopiques:

- Chimiques (amidon: HCl & Méthanol)
- HPLC (sucres solubles, acides organiques)
- LC-C-IRMS
- GC-C-IRMS (produits volatiles)

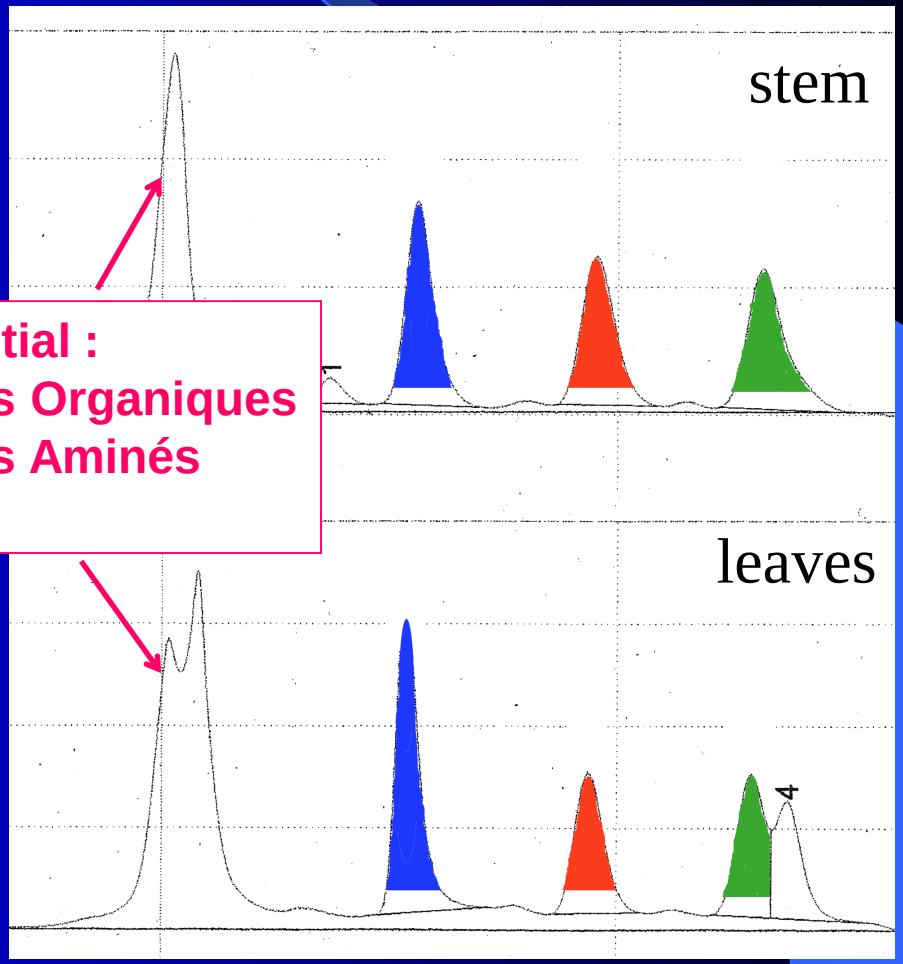


Purification des sucres soluble (HPLC)

Sucres commerciaux

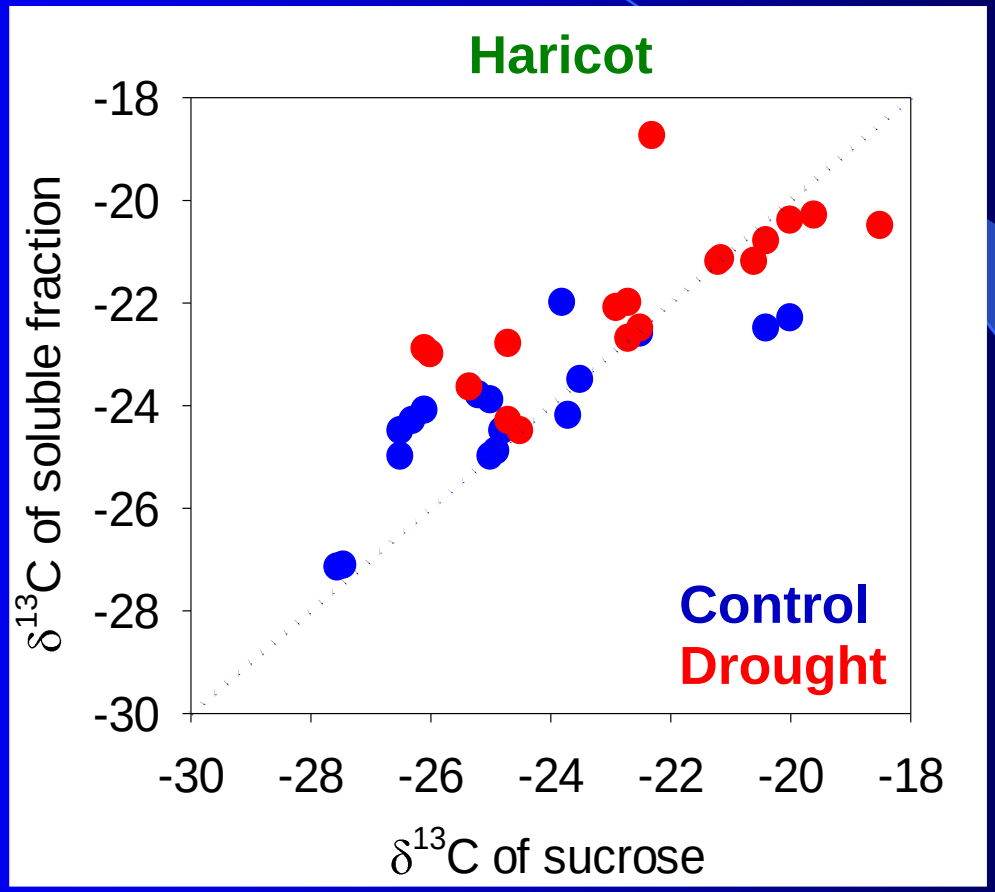


Extrait aqueux de feuilles et tiges de hêtre



Pic initial :
Acides Organiques
Acides Aminés
…

Les approximations sont-elles possibles?



Ghashghaie *et al.* **(non-publié)**

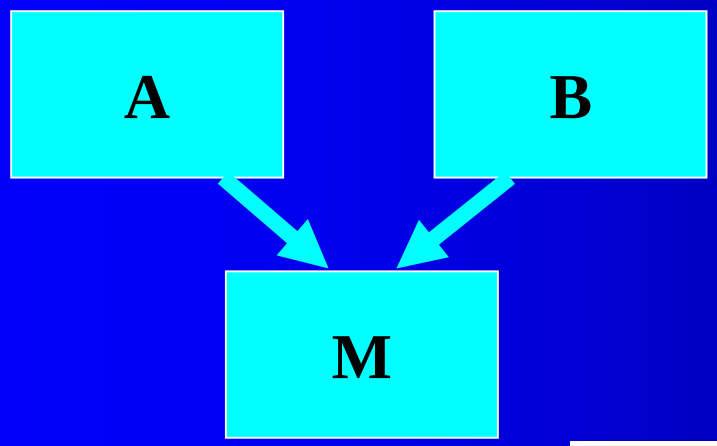
Marquage isotopique

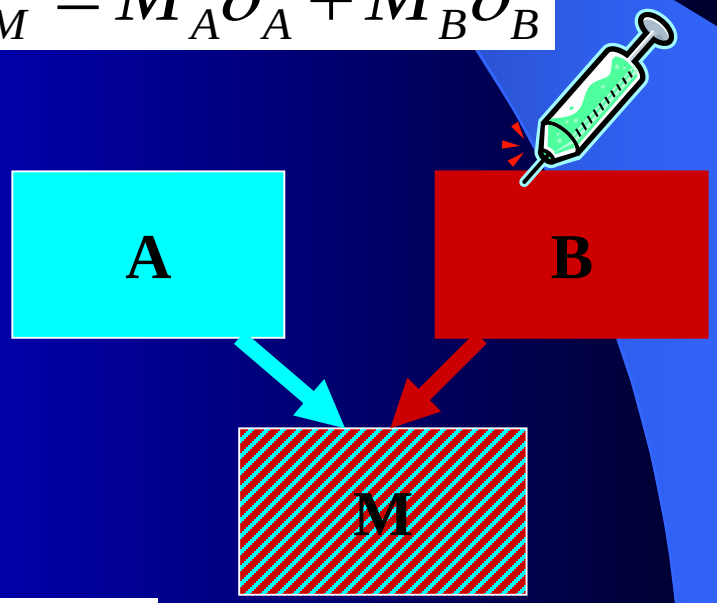
Mixing model: contribution/mélange de 2 sources.

Peut être utilisé aussi lorsque les sources sont pas marquées mais leurs $\delta^{13}C$ sont différents (ex. Plantes C_3 et C_4)

$$M_M = M_A + M_B$$

$$M_M \delta_M = M_A \delta_A + M_B \delta_B$$





D'après Epron D.

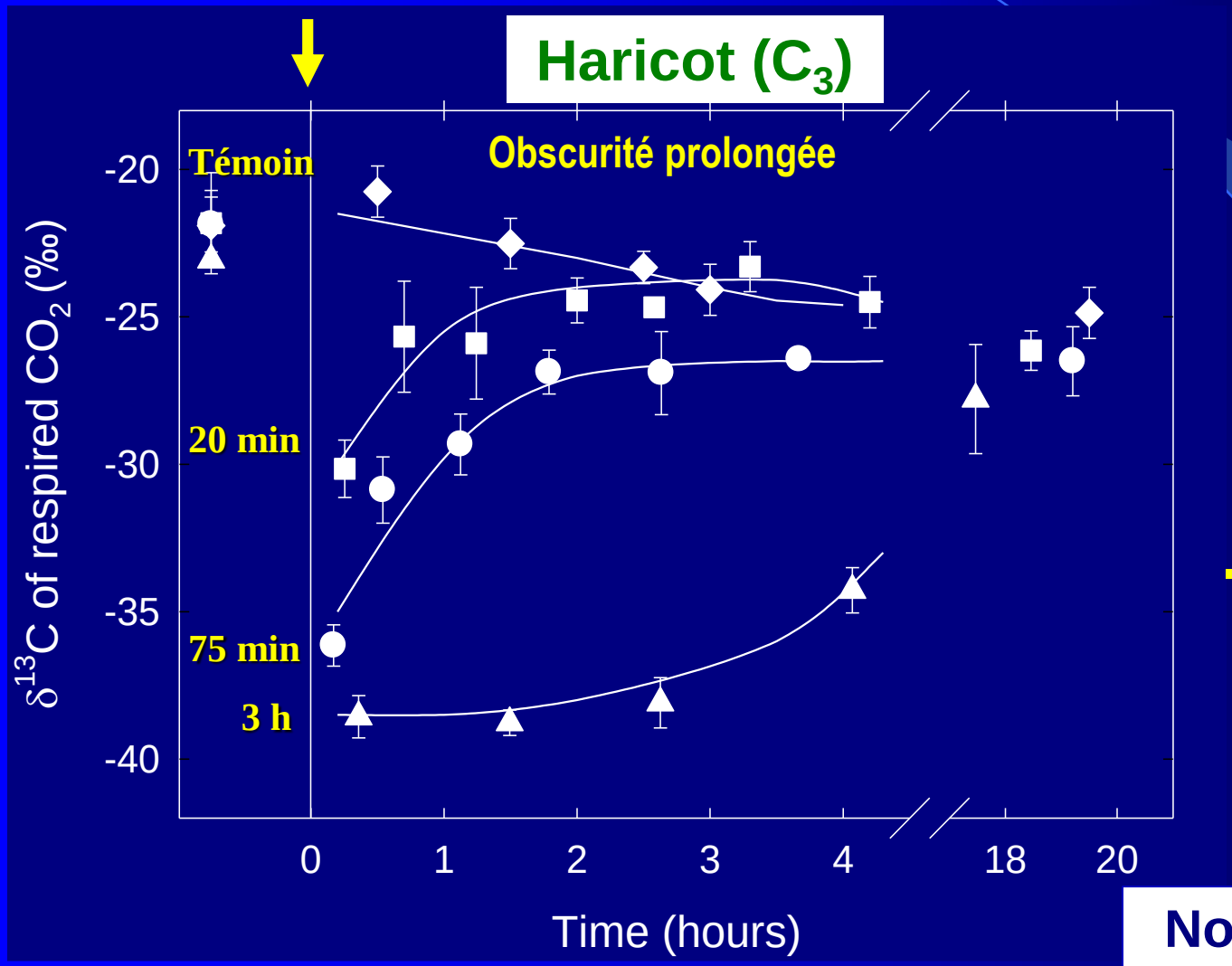
Différents types de Marquage isotopique

Pulse-chase: Marquage niveau élevé (%).
Ex. quelques heures à **99% $^{13}CO_2$**.
- Incorporation rapide du ^{13}C dans différents pools de métabolites.

Long-terme (ex. FACE): Marquage niveau faible (‰).
Plusieurs années de marquage au **$\delta^{13}CO_2$ avec -30 ou -50‰**
- Incorporation cumulative de ^{13}C dans différents pools de C.
- Le temps nécessaire pour remplacer le C ancien par le nouveau C dans différents organes.

Marquage des produits photosynthétiques

$^{13}CO_2$ = -50 ‰ | Δ = 20‰ C nouveau = -70 ‰

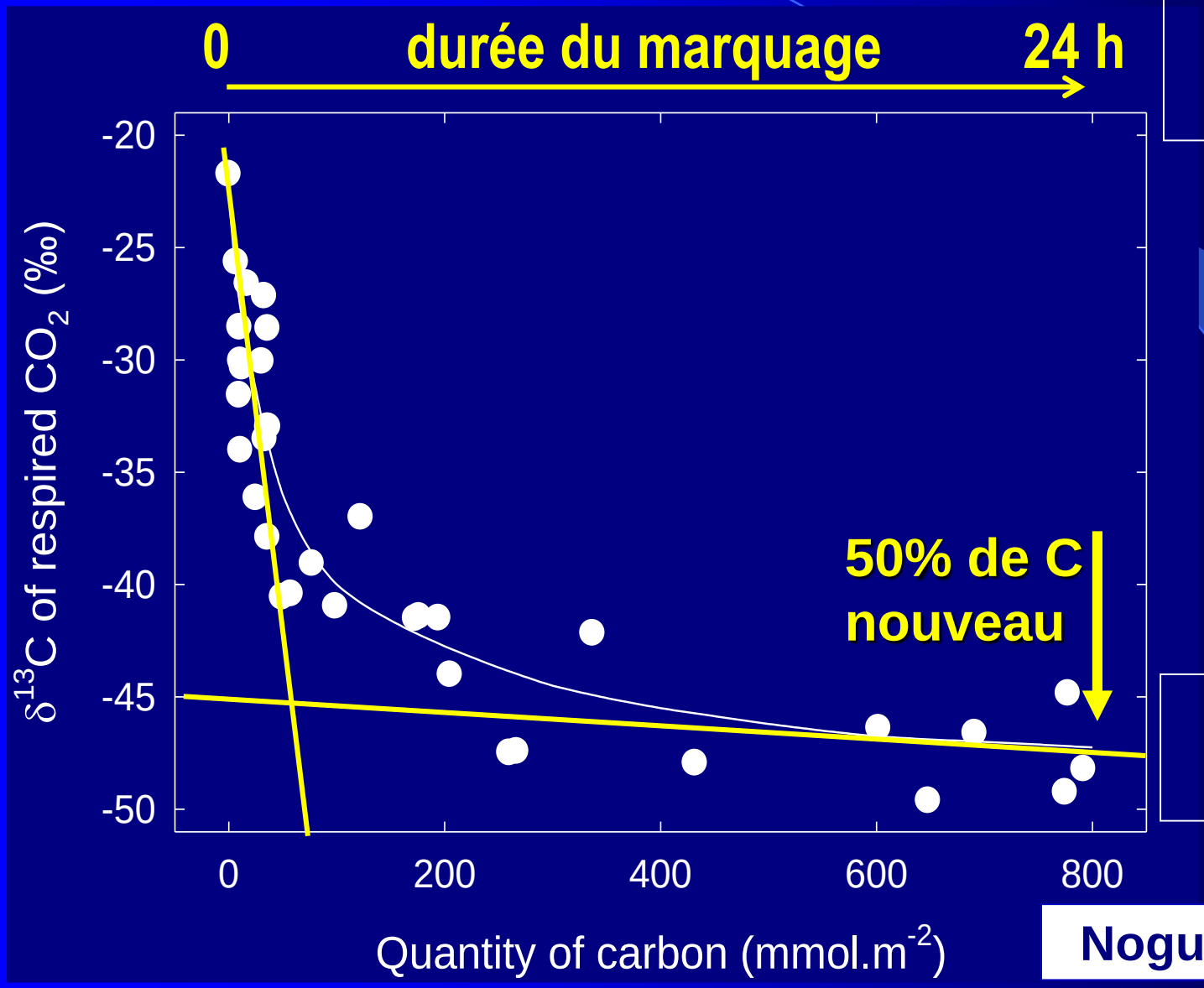


Au moins 2 pools respiratoires

- turnover rapide
- turnover lent

Nogués *et al.* (2004)

Respiration du C nouvellement assimilé

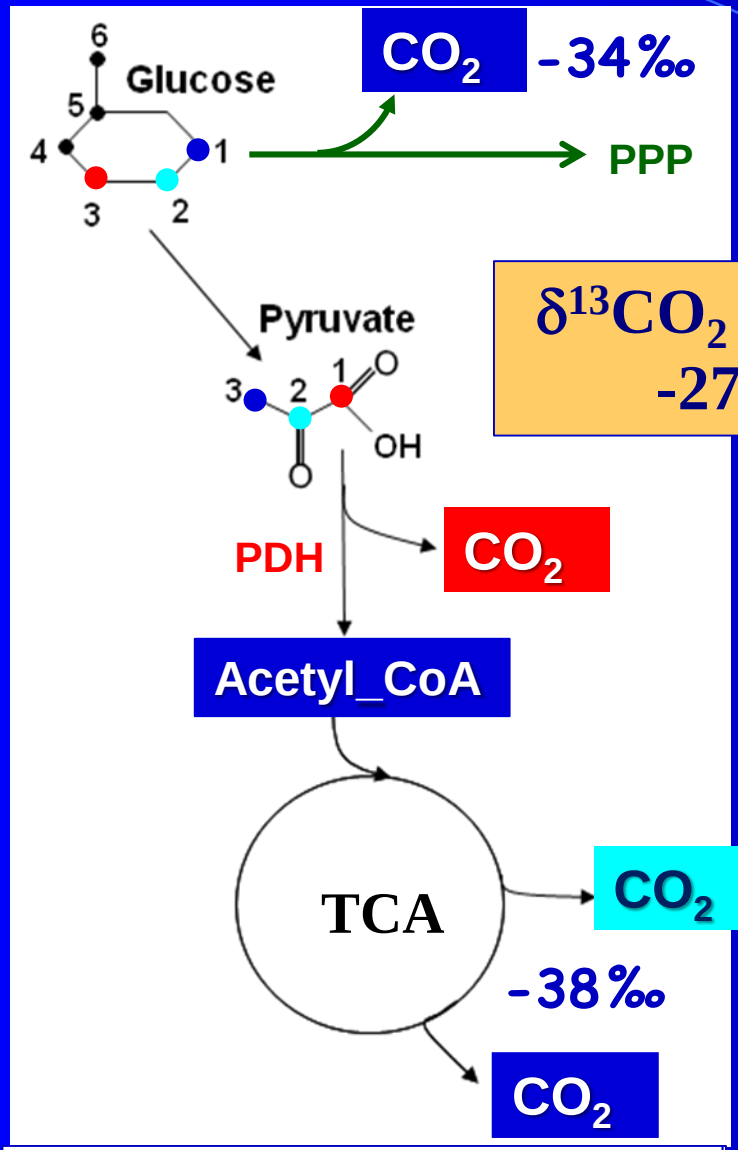


CO_2 marqué
$\delta^{13}C$ = - 50‰

CO_2 respiré
$\delta^{13}C$ = - 47‰

Nogués *et al.* **(2004)**

Marquage positionnel au ^{13}C des substrats (racines C_3)



$$R\,\delta = R_{PDH}\,\delta + R_K\,\delta/2$$

$\delta^{13}CO_2$ respiré par racines:
-27 ‰ to -30.6 ‰

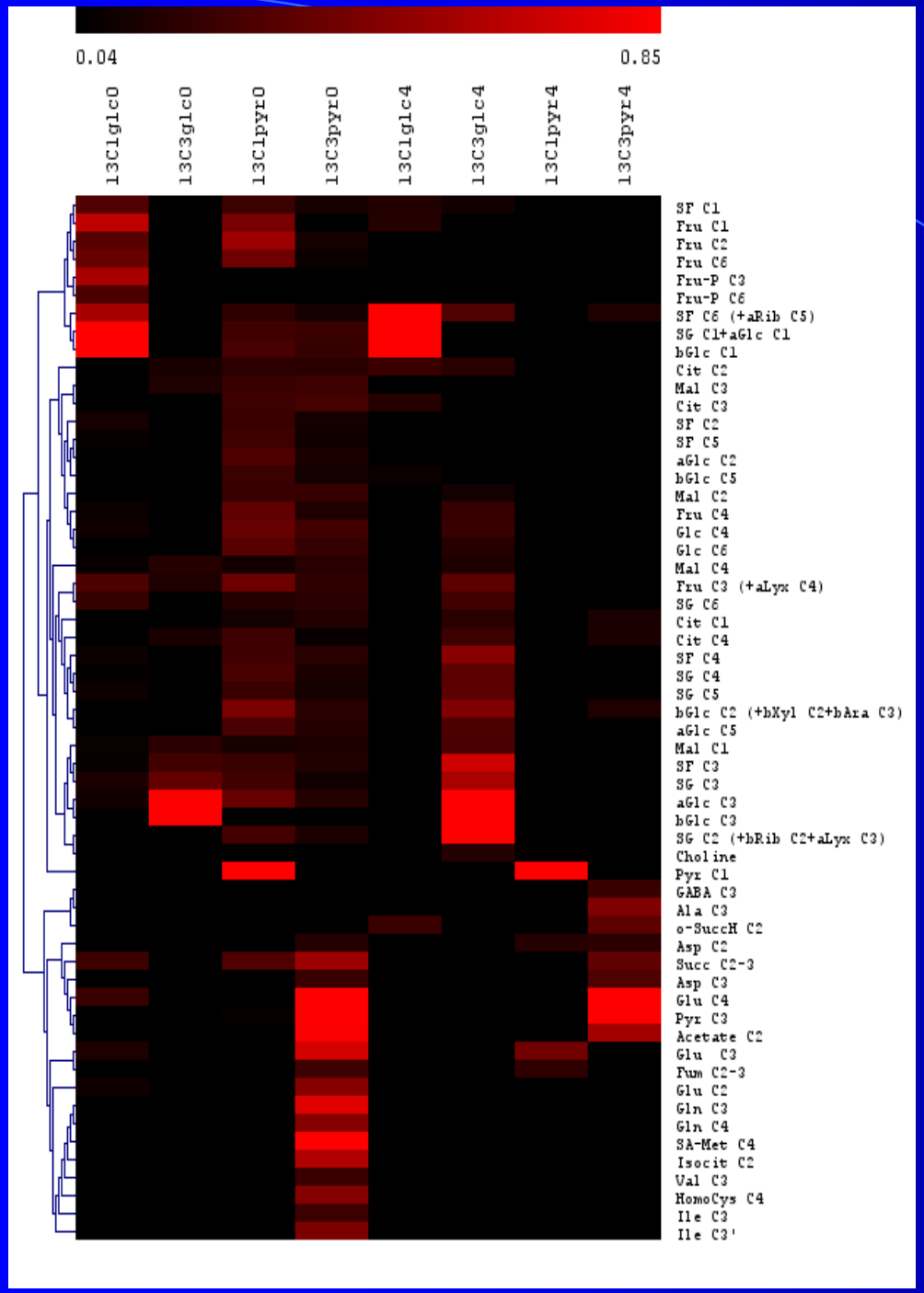
$R_{PDH} \cong 28\%$

$R_{TCA} \cong 50\%$

$R_{PPP} \cong 22\%$

Bathellier *et al.* **(2009)**
New Phytologist

Isotopomique



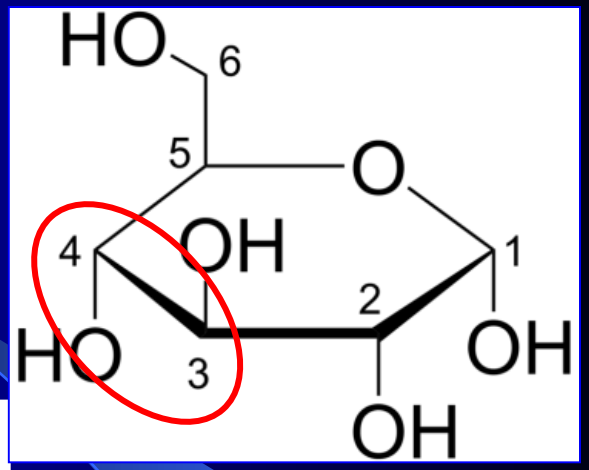
Marquage positionnel fort.

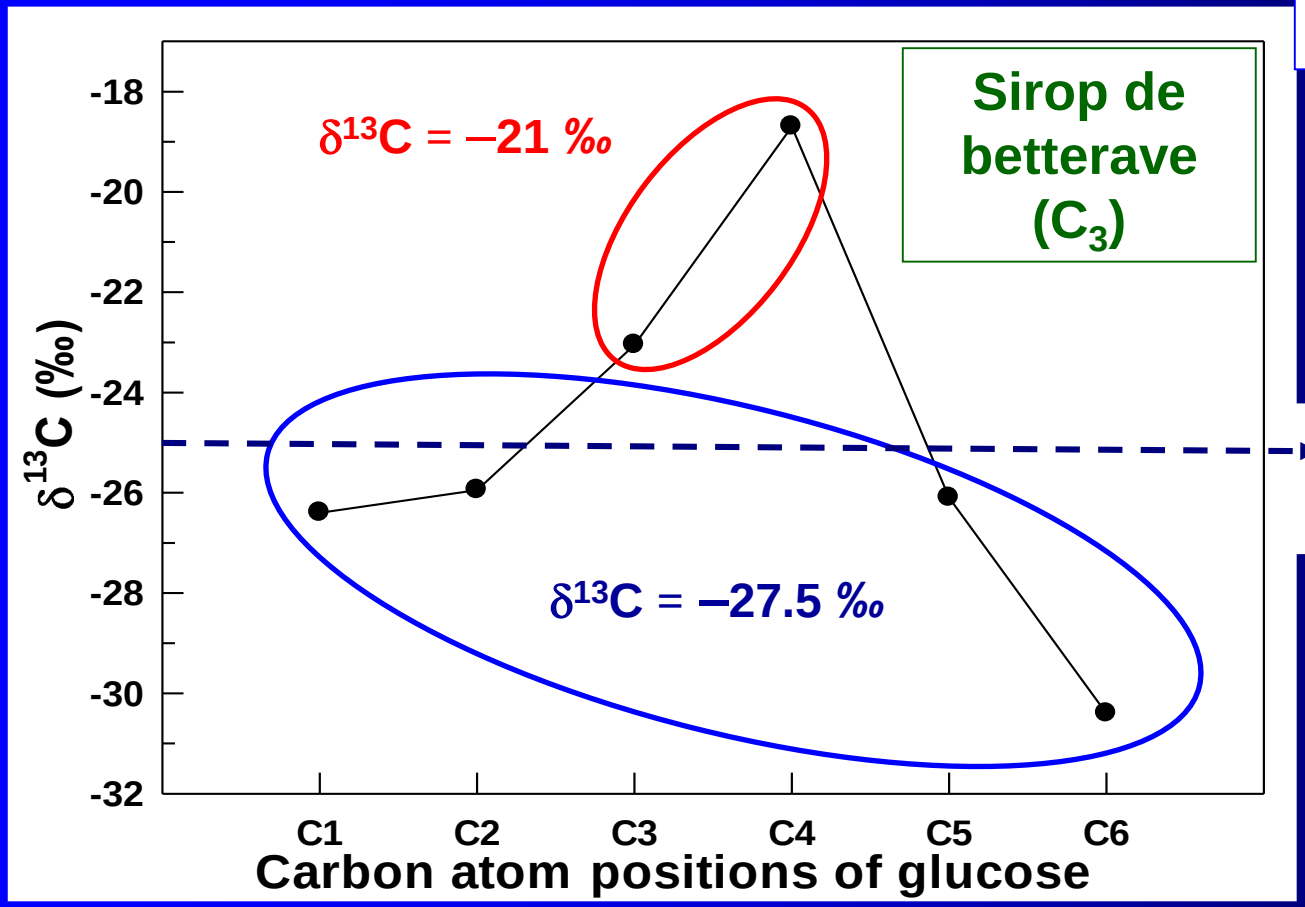
Analyse RMN des métabolites.

Bathellier *et al.* **(2009)**
New Phytologist

Distribution intramoléculaire du ^{13}C est hétérogène au sein d'une molécule d'hexose

Rossmann *et al.* (1991)





Validé pour sucre C_4

–25 ‰ valeur pour le sucre entier

RMN
Richard Robins
(Univ. de Nantes)